腸内細菌遺伝子検出キット
—プローブ検出—

（Code No. FIK-351）

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

ー 目 次 ー

[1] はじめに ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2
[2] 製品内容・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
[3] 製品のほかに用意するもの・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
[4] 検出される菌種と検出される遺伝子・・・・・・・・・・・・・・・ 4
[5] 使用方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
[6] 判定・・・ 7
[7] トラブルシューティング ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8
[8] キャリーオーバー汚染について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
[9] 関連商品 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10

本製品に含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断および臨床検査には使用しないでください。本製品は臨床診断薬ではありません。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

本製品は、食中毒原因菌として知られるサルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌をマルチプレックス PCR 法により検出するキットです。本製品を用いることにより、50 個の検便検体をプールした場合でも培養法と同等以上の感度で検出することが可能です。

プール・マルチプレックス PCR 法による検便検査のスクリーニングのご提案

調理従事者などを対象とする健康保菌者の抽出を目的とした検便検査の場合、その陽性率は 0.1%以下であり、大部分が陰性です。このような場合、検体をプールしてスクリーニングを行い、大部分の陰性検体をまとめて判定することが有効です。スクリーニングで陽性となったプールについて個別の検体を培養法で検査し、陽性検体を判定します。本製品は、50 個までのプール検体であれば、培養法と同等以上の感度で検出することが可能であり、検査の精度に影響を及ぼしません。本製品を用いたスクリーニングにより 90～95%程度の陰性検体を判定できますので、培養法の検体数を約 10 分の 1 以下に低減できます。

本製品の特長

(1) 共感染を同時に検出できます。

プローブ法の採用により、複数の菌種が感染したプール検体（共感染検体）において複数菌種を同時に検出することが可能になりました。10^4 コピーと 10 コピーの共感染検体において、両菌種の同時検出が可能であることを確認しています。

(2) 塗抹培養枚数が削減できます。

融解曲線解析タイプの検査キットでは陽性プールに対して、すべての菌種に対応する培地に塗抹培養する必要がありました。本製品では菌種の識別も明確であり、共感染の同時検出が可能となったため、PCR 陽性菌種に対応する培地のみに塗抹培養することが可能であり、塗抹枚数の削減が可能です。

(3) 迅速に陰性の判定ができます。

本製品は約 50 分で解析が完了するため、迅速な陰性判定が行えます。専用の判定ソフトウェアにより、陰性・陽性の判定も容易です。

(4) キャリーオーバー汚染を防止します。

本製品は、キャリーオーバー汚染防止のため、ウラシル DNA グリコシダーゼによる増幅産物の分解を行います。

ご注意

(1) 本製品は臨床診断薬ではありません。診断および臨床検査には使用しないでください。

(2) 本製品を用いてスクリーニングを行う際の検体のプール数の上限は 50 検体です。50 検体を超えるプール数でのスクリーニングは行わないでください。

(3) 本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。本製品は PCR480 回用であり、50 検体をプールした際に 24,000 検体の検査が可能です。

品名および内容	保存	容量
PCR Master Mix	-20°C	8.4mL (1.68mL×5)
10×Primer Mix	-20°C	1.2mL
10×Probe Mix	-20°C	1.2mL

PCR Master Mix

・反応バッファー、dNTPs、Mg^{2+}、DNA ポリメラーゼ及び、抗 DNA ポリメラーゼ抗体などを含むプレミックス溶液です。
・キャリーオーバー汚染した増幅産物を分解することが可能なウラシル DNA グリコシラーゼ(UNG)を含みます。
・キャリーオーバー汚染とは、PCR で生成した増幅産物が次回以降の PCR 反応液に混入してしまうことです。混入した増幅産物を鋳型として増幅が起こるため、偽陽性の原因となります。本製品では、UNG により、10^3～10^4 コピー/反応程度の混入した増幅産物を分解し、偽陽性を防止することが可能です。

10×Primer Mix, 10×Probe Mix

・サルモネラ（invA 遺伝子）、腸管出血性大腸菌（VT 遺伝子）、赤痢菌（ipaH 遺伝子）に対するマルチプレックス PCR の増幅用プライマー、検出用プローブを含んでいます。
・PCR の阻害による偽陰性を回避するために、内部標準コントロールを含んでいます。

本製品の保存、使用について

・製品到着後は、-20°C で保存してください。
・使用時は、融解させた後、ゆるやかに転倒混和し、溶液を均質化した上でご使用ください。
・使用後は、再度凍結して保管してください。10 回程度の凍結融解の繰り返しは、品質に影響がないことを確認しています。
・10×Probe Mix については、蛍光色素を含みます。蛍光減衰を防ぐため、保存の際は遮光してください。
・PCR Master Mix、10 x Primer Mix、10 x Probe Mix を混合した PCR 反応溶液は、冷蔵にて保管の上、当日中にご使用ください。4℃で 48 時間の保管後にも、品質に影響がないことを確認しています。

[3] 製品のほかに用意するもの

本製品のほかに、以下の試薬・機器類をご用意ください。

品名	推奨仕様
リアルタイム PCR 装置	FAM、ROX、HEX、Cy5 検出用チャネルを有し、全チャネルの同時検出が可能な機種
ヒートブロック	1.5mL チューブを 95°C 以上の加熱処理が可能なもの
遠心分離機	12,000rpm の遠心が可能なもの
スピンダウン用小型遠心機	
竹串	滅菌済みのもの
5mL チューブ	キャップ付のもの
PCR 用プレートまたはチューブ	リアルタイム PCR 装置専用のプレート、またはチューブ
1.5mL チューブ	
マイクロピペット	
チップ	フィルター付のもの
滅菌水	

[4] 検出される菌種と検出される遺伝子

菌種	遺伝子	備考
サルモネラ	invA	血清型の判定はできません
腸管出血性大腸菌	VT1, VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vp1	血清型の判定はできません
赤痢菌	ipaH	ipaH をもつ腸管侵入性大腸菌も検出します

[5] 使用方法

糞便検体はキャリブレア培地採便管に採取されたものを使用します。

(1) 糞便検体の懸濁液の作製

下記 A, B いずれかの方法でプール懸濁液を作製します。

A 検体ごとに懸濁液を作製してからプールする方法

1) 1.5mL チューブに滅菌水 50μL をとります。
2) 採便管から採便棒を抜き、1)のチューブに浸し、1~2 秒激しくボルテックスします。
3) 懸濁液を 10μL ずつ新しい 1.5mL チューブ 1 本に集め、50 本分プールします。
4) チューブのふたを閉め、2~3 回転倒混和、または軽くボルテックスします。

＊50 検体に満たない場合は、プール液の全量が 500μL になるように、3)のプールした液に滅菌水を加えてください

B ひとつの液に多数の糞便検体を懸濁してプールする方法

1) 5mL チューブに滅菌水 2.5mL をとります。
2) 採便管から採便棒を抜き、採便管に竹串を挿し、2~3 回上下します。
3) 竹串を 1)のチューブに挿し、2~3 回上下します。
4) 50 個の検体について、新しい竹串を使いながらひとつのチューブに懸濁していきます。
5) チューブにふたをし、2~3 回転倒混和します。
6) 5)の懸濁液 0.5mL を新しい 1.5mL チューブに移します。

(2) 加熱処理、遠心分離

1) 1.5mL チューブに入った懸濁液（プールした懸濁液）を 95℃、5 分間加熱します。
2) 12,000rpm×3 分間 遠心分離します。
3) 遠心上清 2μL を熱処理済糞便懸濁液として使用します。

・熱処理済糞便懸濁液は PCR 反応液を調製するまで 4℃以下で保存してください。
・作製当日に PCR を行わない場合は凍結してください。数日間凍結保存可能ですが、お早めにご使用ください。
・加熱処理をしていない懸濁液は保存できません。

(3) PCR 反応液の調製

1) 凍結している試薬を完全に融解し、転倒混和にて攪拌します。
2) 軽くスピンダウンしてキャップの裏についている試薬を落とします。
3) 1 反応あたり以下の分量が必要です。必要反応数の 1 割増し程度で PCR 反応液を調製します。

	使用量（1 反応分）
PCR Master Mix	14μL
10×Primer Mix	2μL
10×Probe Mix	2μL
合計液量	18μL

*調製後の反応液は 4℃で保存の上、当日中にご使用ください。

4) PCR 反応液を 18μL ずつ、リアルタイム PCR 反応プレートまたは、チューブに分注します。
5) (2) 3)の熱処理済糞便懸濁液の上清を 2μL ずつ添加します。

(4) PCR 解析

リアルタイム PCR 装置にて PCR 解析を実施します。FAM、Cy5、ROX、HEX 検出用チャネルを有し、全チャネルの同時検出が可能なリアルタイム PCR 装置が使用可能です。使用するリアルタイム PCR 装置によって、サイクル条件が異なる場合があります。使用可能なリアルタイム PCR 装置およびサイクル条件は弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

例)CFX96 Touch™ Deep Well (Bio-Rad)

プレ変性	96℃, 20秒	
変性	96℃, 2秒	X10サイクル
会合・伸長	63℃, 20秒	
変性	96℃, 2秒	X35サイクル
会合・伸長	63℃, 20秒 （検出）	

(5) 測定遺伝子とチャネル

本製品では、以下の表に示す測定チャネルにおいて、測定対象遺伝子の増幅が検出されます。

測定対象遺伝子	測定チャネル
内部標準遺伝子(IC)	FAM
invA 遺伝子（サルモネラ）	Cy5
VT 遺伝子（腸管出血性大腸菌）	ROX
ipaH 遺伝子（赤痢菌）	HEX

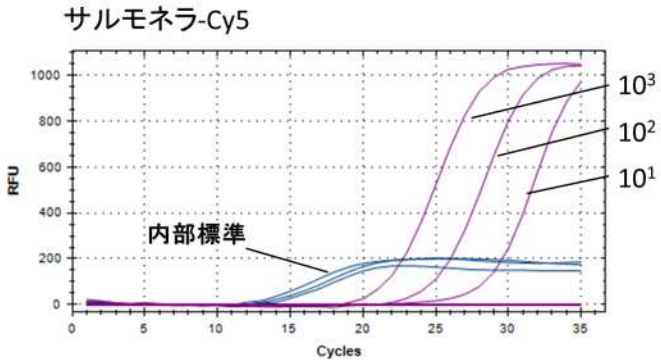
[6] 判定

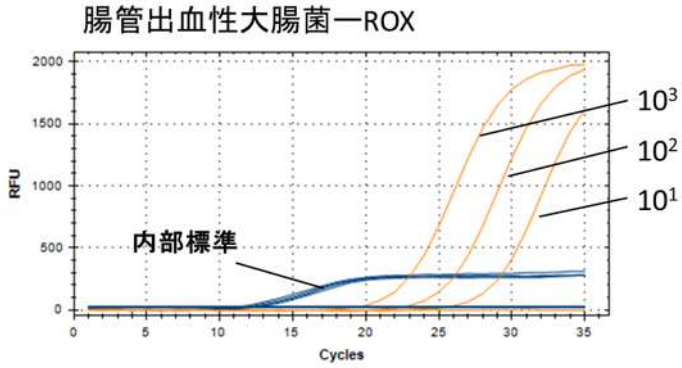
判定をパソコンで行うソフトウェアをご用意しております。詳細は弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。

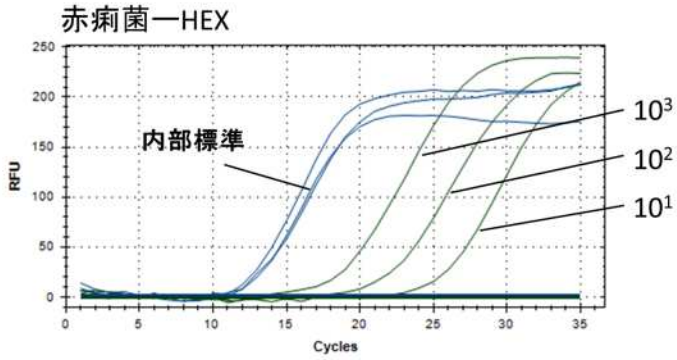
(1) 検出例

本製品では、検出用プローブの増幅シグナルが各測定チャネルにて検出されます。

陽性判定となる蛍光強度は、ご使用のリアルタイム PCR 機器によって異なります。詳しくは弊社テクニカルラインまでお問い合わせください。







(2) 検査結果

内部標準、3 菌種のシグナルの有無によって判定します。

内部標準	サルモネラ 腸管出血性大腸菌 赤痢菌	検査結果と次工程
陽性	陰性	陰性判定
陽性	陽性	陽性判定*
陰性	陽性	陽性判定*
陰性	陰性	判定不能 （反応が進行していません）

*サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌の増幅シグナルが検出された場合は、当該菌種のみが陽性となります。増幅シグナルが検出されなかった菌種については、陰性判定となります。増幅シグナルが検出された場合は、次工程の塗抹培養において、該当する菌種に対応する培地に塗抹培養してください。

[7] トラブルシューティング

現象	原因	対策
判定不能になる シグナルが出ない	糞便の量が極端に多い	熱処理済糞便懸濁液を更に 10 倍程度滅菌水等で希釈してご使用ください。
	加熱処理が不十分	ヒートブロックの温度、加熱時間をご確認ください。
	遠心分離が不十分	遠心後、沈殿が不十分の場合は、遠心分離の時間を延長してください。
	PCR 反応液を長期間放置した	調製後の PCR 反応液は 4℃で保存の上、当日中にご使用ください。
	キャリーオーバー汚染	上記の対策でも解決しない場合は、キャリーオーバー汚染が発生している可能性があります。試薬・水を廃棄後、汚染除去作業（拭き取り、UV 照射等）を実施してください。
陰性コントロールが陽性になる すべての検体が陽性になる	反応液への培養液（糞便液）の持込量が多い	反応液への培養液（糞便液）の持込量が極端に多い場合は、非特異増幅が発生する場合があります。 熱処理済糞便懸濁液を更に 10 倍程度滅菌水等で希釈してご使用ください。
	キャリーオーバー汚染	キャリーオーバー汚染が発生している可能性があります。試薬・水を廃棄後、汚染除去作業（拭き取り、UV 照射等）を実施してください。

[8]キャリーオーバー汚染について

(1) キャリーオーバー汚染とは

PCR で生成した増幅産物が次回以降の PCR 反応液に混入してしまうことです。混入した増幅産物を鋳型として増幅が起こり、誤って陽性と判定（偽陽性）することになります。

(2) キャリーオーバー汚染の症状

以下のような現象が観察される場合、キャリーオーバー汚染が疑われます。

・陽性となる検体の比率が異常に多い。
・内部標準のシグナルの立ち上がりが非常に遅い。
・内部標準のシグナルも含め、シグナルがまったく観察されない。

(3) キャリーオーバー汚染を回避するためには

PCR 反応後のチューブを開閉しないでください。96 穴プレートをご使用の際は、シールが剥がれないようお気を付けください。反応液の調製時には、グローブ等を着用し、ピペット、チップ（フィルター付を推奨します）は専用の物をご使用ください。

本製品は電気泳動での菌種判定はできません。電気泳動の実施はご遠慮ください。

(4) さらなる対策として

本製品では PCR で dTTP にかわって dUTP を使用し増幅産物を合成します。また、反応液にウラシル DNA グリコシラーゼ（UNG）を含んでいます。
UNG は dUTP を含んで合成された PCR 増幅産物を分解しますが、dTTP のみを含む天然の DNA を分解しません。キャリーオーバー汚染が起こった場合でも、反応液に添加した UNG が PCR 増幅産物を分解するので、偽陽性を回避できます。

(5) UNG の処理能力には限界があります

UNG の処理能力には限界があります。本製品ではおよそ 10^3～10^4 コピー/反応までの増幅産物を消去可能です。キャリーオーバー汚染を起こさないよう、細心の注意を払って作業してください。

[9] 関連商品

品　名	包装	Code.No.
腸内細菌遺伝子検出キット -高速蛍光検出-	480 回用	FIK-311
腸内細菌遺伝子検出キット -シングル検出-	200 回用	FIK-361, 362, 363
ノロウイルス検出キット G1/G2 -融解曲線解析-	100 回用	FIK-203
ノロウイルス検出キット G1/G2 -高速プローブ検出 Quick Step-	100 回用	FIK-273
ノロウイルス定量キット G1/G2	50 回用	FIT-101
ノロウイルス検出キット G1/G2 -ふき取り- <3 色プローブ検出>	50 回用	FIW-101
ノロウイルス検出キット G1/G2 -ふき取り- <2 色プローブ検出>	50 回用	FIW-201

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

https://lifescience.toyobo.co.jp/

TOYOBO

【製造・販売元】

ー在庫・価格に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部（大阪）
〒530-0001　大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部（東京）
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号　住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819　FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 （土日祝日、休日を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ https://lifescience.toyobo.co.jp/