# 腸内細菌遺伝子検出キット
# —シングル検出—

(Code No. FIK-361：サルモネラ検出用）
(Code No. FIK-362：腸管出血性大腸菌検出用)
(Code No. FIK-363：赤痢菌検出用)

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] 検出対象菌種と測定チャネル ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 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] 関連商品 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

ご注意

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

腸内細菌遺伝子検出キットーシングル検出ーは、食中毒原因菌であるサルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌をそれぞれ PCR 法により検出する 3 種類のキットです。50 検体以内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あり、陽性検体のスクリーニング用途としてご利用になれます。

| Code No. | 検出菌種 |
|---|---|
| FIK-361 | サルモネラ |
| FIK-362 | 腸管出血性大腸菌 |
| FIK-363 | 赤痢菌 |

**本製品の特長**

(1) 迅速な判定ができます。

本製品を用いることで 50 検体以内のプールから菌種別に陽性検体を絞り込むことが可能です。
解析時間が約 50 分と短く、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。

(2) 腸管出血性大腸菌の遺伝子型を判定できます。

腸管出血性大腸菌が産生するベロ毒素（VT）は、2 つのサブタイプ（VT1 と VT2）に大別されます。
本製品では蛍光波長の違いによりサブタイプを判定することが可能です。

(3) 偽陰性を判別できます。

本製品では内部標準遺伝子を同時に検出するため、PCR 阻害による偽陰性を判別することが可能です。

(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 グリコシラーゼによる増幅産物の分解を行います。

**「腸内細菌遺伝子検出キット-プローブ検出-（Code No.FIK-351）」と本製品を組み合わせたスクリーニング方法のご提案**

「腸内細菌遺伝子検出キット-プローブ検出-（Code No.FIK-351）」は 50 検体の検便検体プールからマルチプレックス PCR 法によりサルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌の三菌種を同時にスクリーニングすることが可能なキットです。「腸内細菌遺伝子検出キット-プローブ検出-（Code No.FIK-351）」と本製品を組み合わせてスクリーニングすることで、より効率的に陽性検体を絞り込むことが可能です。以下に使用例を示します。

1) FIK-351 を使用し、50 検体プールからの 1 次スクリーニングを実施します。
2) 陽性プールに含まれる 50 検体を 10 検体程度ずつ再度プールします。
3) 本製品を用いて 2 次スクリーニングを実施します。
（1 次スクリーニングにて陽性となった菌種に対応する製品を使用）
4) 陽性プールに含まれる検体を個別に塗抹培養することで陽性検体を確定します。

## [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 PCR200 回用です。

| Code No. | 検出対象菌種 | 内容 | 容量 |
|---|---|---|---|
| FIK-361 | サルモネラ | PCR Master Mix | 3.36mL (1.68mL×2) |
| | | 5×Primer・Probe Mix | 0.96mL |
| FIK-362 | 腸管出血性大腸菌 | PCR Master Mix | 3.36mL (1.68mL×2) |
| | | 5×Primer・Probe Mix | 0.96mL |
| FIK-363 | 赤痢菌 | PCR Master Mix | 3.36mL (1.68mL×2) |
| | | 5×Primer・Probe Mix | 0.96mL |

**PCR Master Mix**

・反応バッファー、dNTPs、$Mg^{2+}$、DNA ポリメラーゼおよび、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により混入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。

**5×Primer・Probe Mix**

・サルモネラ(invA 遺伝子)、腸管出血性大腸菌(VT1/VT2 遺伝子)、赤痢菌(ipaH 遺伝子)に対する増幅用プライマー、検出用プローブをそれぞれ含んでいます。
・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および内部標準コントロール増幅用プライマー・プローブを含んでいます。

**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。
・5×Primer・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 と 5×Primer・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、Cy5、ROX チャネルの検出が可能な機種 |
| 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] 検出対象菌種と測定チャネル

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。

| Code No. | 菌種 | 測定チャネル | 遺伝子 | 備考 |
|---|---|---|---|---|
| FIK-361 | サルモネラ | ROX | invA | 血清型の判定はできません |
| FIK-362 | 腸管出血性大腸菌 | Cy5 | VT1 | 血清型の判定はできません |
| | | ROX | VT2,VT2vha, VT2vhb, VT2vp1 | 血清型の判定はできません |
| FIK-363 | 赤痢菌 | ROX | ipaH | ipaH をもつ腸管侵入性大腸菌も検出します |

＊各キットとも FAM チャネルで内部標準遺伝子を検出します。

# [5] 使用方法

**<u>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。</u>**
**<u>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。</u>**

**(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 検体未満の場合は、3)のプール液に滅菌水を加えプール液の全量が 500μL になるように調整してください。

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 を分注します。
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ます。
5) チューブのふたを閉め、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 |
| 5×Primer・Probe Mix | 4μL |
| 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) 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 チャネルの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)

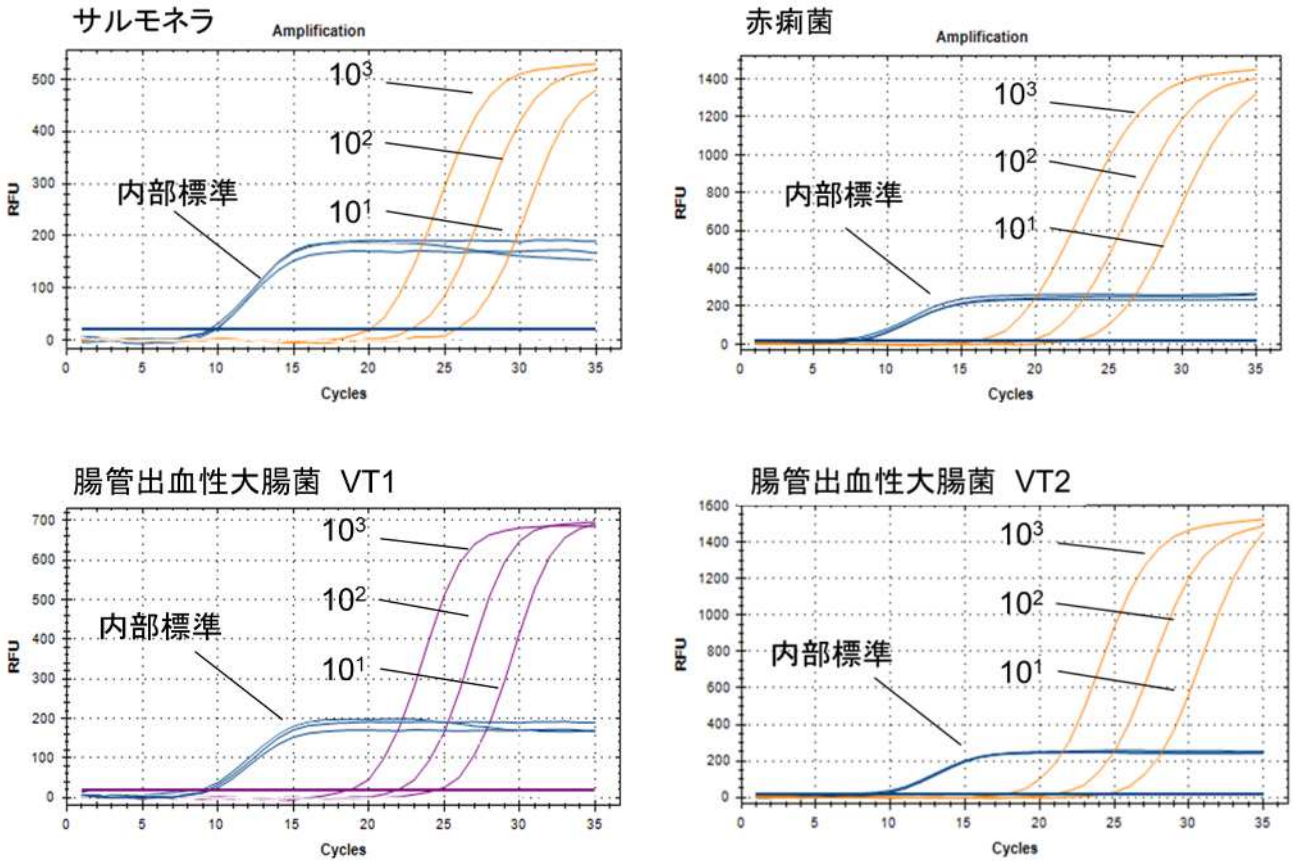
| | | |
|---|---|---|
| プレ変性 | 96℃, 20秒 | |
| 変性 | 96℃, 2秒 | X10サイクル |
| 会合・伸長 | 63℃, 20秒 | |
| 変性 | 96℃, 2秒 | X35サイクル |
| 会合・伸長 | 63℃, 20秒 （検出） | |

# [6] 判定

## (1) 検出例

本製品では、内部標準遺伝子は FAM チャネル、検出対象菌種は Cy5 チャネルおよび ROX 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、三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<br>腸管出血性大腸菌<br>赤痢菌 | 検査結果 |
|---|---|---|
| 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） |

## [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。<br><br>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、沈殿が不十分である場合は、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 | 上記の対策を実施して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となる。 | 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] 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 -プローブ検出- | 480 回用 | FIK-351 |
| 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<br>-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<br>-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<br>-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/