

製品コード 7700

研究用

Takara

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative)

説明書

v202503Da

微生物の検出および同定には主として培養法が用いられていますが、より簡便かつ迅速に結果が得られる方法として、PCR 法等の遺伝子検出技術を応用した手法が注目され、現在では食品検査や微生物検査などにおいても一般的な手法として普及しつつあります。しかし、遺伝子検出技術の課題として、生菌だけでなく死菌由来 DNA も検出されるため、偽陽性率が高くなる点が指摘されてきました。

タカラバイオの Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズは、EMA-PCR 法（下図）により生菌由来 DNA を選択的に検出するために、選択的膜透過性色素（EMA：ethidium monoazide）を用いて検体の前処理を行うキットです。独自の技術で EMA 修飾の反応性向上を実現したことにより、非常に効率よく死菌由来 DNA を EMA 修飾することができ、修飾を受けた DNA は PCR 増幅できない状態となります。死菌由来 DNA の修飾効果が向上したことで、リアルタイム PCR のように増幅サイズが短い場合にも効果的に死菌由来 DNA の影響を排除することができるようになり、高感度なリアルタイム PCR による生菌由来 DNA の選択的な検出が可能になりました。

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) は、大腸菌などのグラム陰性菌を対象として EMA-PCR を行うための前処理用キットです。本製品を用いて対象とする細菌の前処理（EMA 処理）条件を最適化し、効率よく死菌由来 DNA の修飾を行うことで、リアルタイム PCR（qPCR）やエンドポイント PCR により、生菌由来 DNA のみを選択的に検出する系を構築することができます。

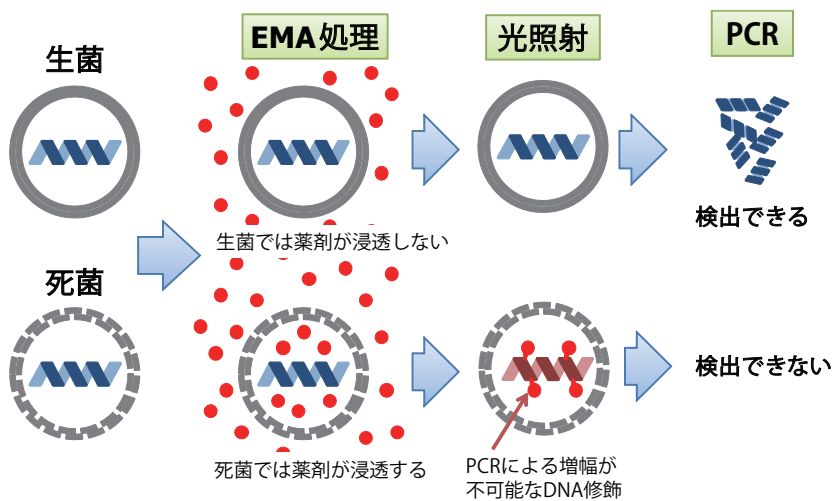


図 1. EMA-PCR 法の原理

【注記】

別売の Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)（製品コード CY290）を併せて使用することで、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズを用いた EMA 処理操作が、検体由来成分による反応阻害などを受けることなく正しく行われたかどうかを確認することができます。Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズの試薬コンポーネントには反応確認用のプラスミド DNA があらかじめ混合されており、検体に対する EMA 処理が正しく行われると、このプラスミド DNA も同時に修飾され、PCR 増幅できない状態になります。従って、EMA 処理を行った検体に対して、このプラスミド DNA 上の領域をターゲットとする PCR 増幅を行うことで、EMA 処理操作の成否を確認することが可能です。

I. 内容 (100 検体分)

1. Solution A-gn 250 μ l \times 4
2. Solution B-gn* 200 μ l \times 8

*：光による化学反応により物質性状が変化し、核酸修飾能力が減衰しますので、遮光に留意してください。

Solution A-gn：核酸修飾反応の促進試薬です。EMA 処理操作の成否を確認するためのプラスミド DNA を含みます。

Solution B-gn：選択的膜透過性色素 (EMA) を含む溶液です。

II. 保存 - 20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

1.5 ml マイクロチューブ
卓上遠心機
微量高速冷却遠心機
マイクロピペット
マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付)
ボルテックスミキサー

【前処理操作 (EMA による死菌由来 DNA の修飾)】

光照射装置

- LED Crosslinker 30 (製品コード EM300)

または LED Crosslinker 12 (製品コード EM200：終売)

ヒートブロック (95°C で使用可能なもの)

1.5 ml マイクロチューブ*1

【DNA 抽出】

NucloSpin Tissue XS (製品コード 740901.10/.50/.250)*2

特級エタノール (> 99%)

ヒートブロック (56°C および 70°C で使用可能なもの)

【対象となるグラム陰性菌の遺伝子検出】

リアルタイム PCR 検出またはエンドポイント PCR 検出に必要な試薬類、プライマー、装置などをそれぞれ用意してください。

* 1：透明チューブの使用を推奨します。弊社では下記のチューブで実績があります。

- DNA LoBind チューブ, 1.5 ml PCR clean (Eppendorf：Code. 0030108051)

- 1.5 ml ループ付凍結保存チューブ (SARSTEDT：Code. 72.692.100)

* 2：使用検体に着色や濁りがあるなど夾雑物の混入が疑われる場合は NucloSpin Soil (製品コード 740780.10/.50/.250) の使用をお勧めします。

IV. 使用に関して

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

測定結果： 本製品はリアルタイム PCR やエンドポイント PCR と組み合わせて用いることにより、グラム陰性菌の生菌由来 DNA を死菌由来 DNA と区別して検出することを目的としたものですが、死菌の量や検体組成によっては EMA 処理に影響が生じ、死菌由来 DNA が検出される場合もあります。従って、培養法による検出も実施の上で、総合的に結果を判定することをお勧めします。
(結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。)

廃棄： 試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃ で 20 分間以上加熱滅菌処理、または 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。EMA を含む試薬を廃棄する際は活性炭に通して色素を吸着させてから捨ててください。この際に使用した活性炭は危険物として処理してください。プラスチックの試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

V. 操作上の注意

1. 装置および試薬などの取扱いは該当品の取扱説明書に従ってください。
2. 万一、Solution B-gn が光により劣化すると、死菌由来 DNA への修飾効果が薄れ、生菌および死菌由来 DNA の区別を行うことができません。操作中は遮光に細心の注意を払ってください。使用しない間は、チューブをアルミホイルなどで覆って遮光してください。使用後は、アルミパックに入れて早めに冷凍庫に戻してください。
3. Solution A-gn は粘性が高いため、注意深くゆっくりとピペティングを行ってください。

VI. 実験の進め方について

VI-1. 前処理 (EMA 処理) 条件の検討

(1) はじめに

微生物の菌種や PCR 検出系によって最適な前処理 (EMA 処理) の条件が異なるため、実検体の測定を行う前に純培養菌を用いて条件検討を行います。具体的には、純培養菌の生菌と死菌 (生菌を熱処理したものなど) を準備し、EMA 処理の時間や回数を変えて、その効果を確認します。

[死菌を用いての確認]

対象の菌種について、死菌抑制効果を確認します。

死菌サンプルを用いて、最適な死菌抑制効果が得られる EMA 処理条件を検討します。またその条件で EMA 処理を行った際に、どの菌数まで死菌抑制効果があるかを確認します。

[生菌を用いての確認]

対象の菌種について、EMA 処理の生菌への影響を確認します。

生菌サンプルを用いて、EMA 処理あり／なしの結果を比較し、検出感度に影響を与えない EMA 処理条件を検討します。

(2) 実験の流れ

純培養菌の生菌と死菌を準備し、各種条件でそれぞれEMA処理を行います。まず、EMA処理時間を5分に設定して、EMA処理回数(1、2、3回)の検討を行います。PCR増幅サイズが短い(100 bp前後)場合には3回、PCR増幅サイズが長い(1 kb程度)場合には1回が標準的な条件です。死菌の抑制効果が不十分な場合は、続いてEMA処理時間の検討を行います。多くの場合、EMA処理時間は5分で十分ですが、菌種によっては15分程度まで延長すると効果が高くなる場合があります。

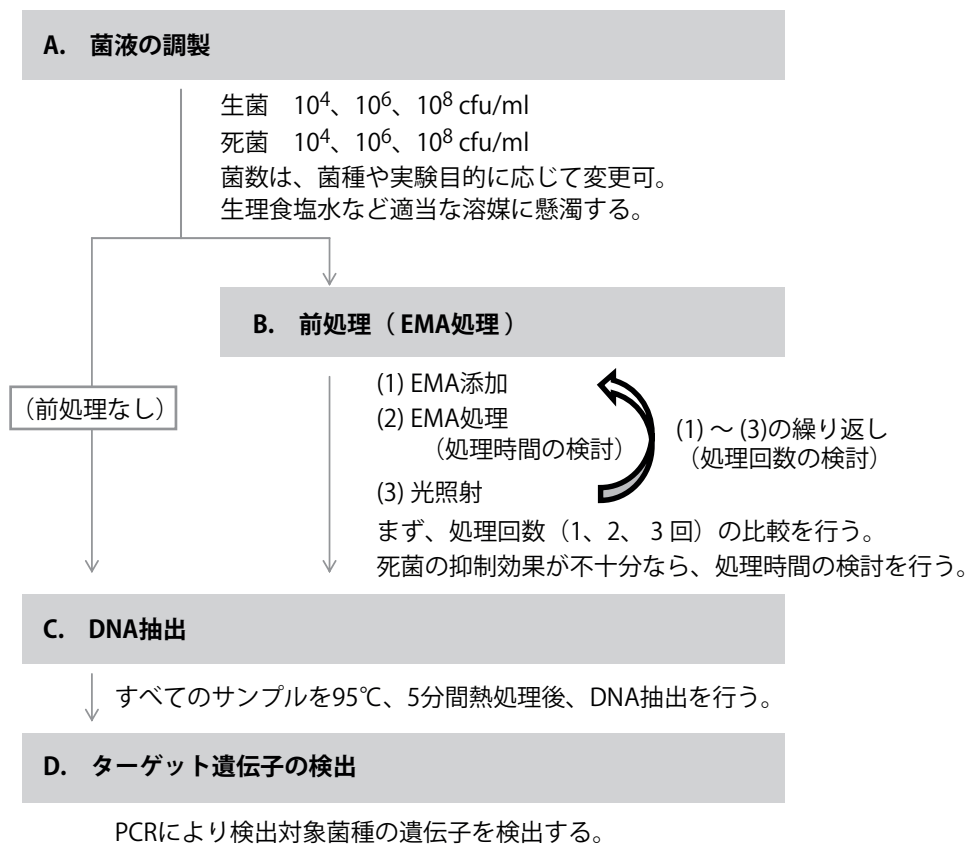


図2. 条件検討のフロー

(3) 結果の解析

リアルタイム PCR の場合

EMA 処理なしの結果と各種条件で EMA 処理を行った結果を比較して、生菌への影響と死菌抑制効果を確認します。

図 3 は、EMA 処理の回数を検討した実験例です。左図には Ct 値を、右図には EMA 処理なしとありの Ct 値の差 (Δ Ct 値) を示しています。

[生菌への影響]

生菌を用いた際の EMA 処理ありとなしの Ct 値の差 (Δ Ct 値) が EMA 処理による生菌の検出感度の低下を表します。適切な EMA 処理条件では、 Δ Ct 値は 2~4 程度となることが多く、その値が小さい程、生菌への影響が小さい EMA 処理条件です。EMA は死菌由来 DNA を効率よく修飾しますが、菌種や菌数、処理条件によっては生菌にも若干の影響を与えることが知られています。

図 3 の実験例では、 Δ Ct 値がいずれも 4 より小さい値を示しています。

[死菌抑制効果]

死菌を用いた際の EMA 処理ありとなしの Ct 値の差 (Δ Ct 値) が死菌抑制効果を表します。適切な EMA 処理条件では、 Δ Ct 値は 8~15 程度となることが多く、その値が大きい程、効果的に死菌を抑制できる EMA 処理条件です。結果を正しく解釈するために、どの程度まで死菌抑制効果があるかをあらかじめ確認しておくことが重要です。

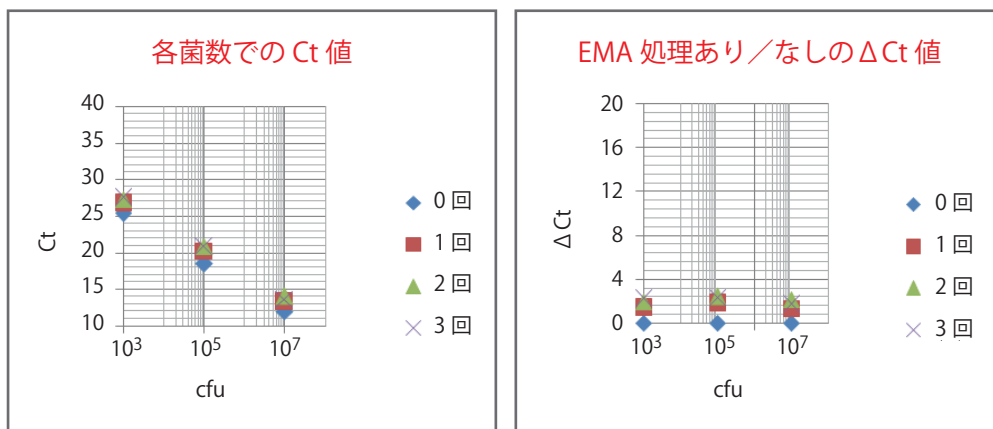
図 3 の実験例では、 10^3 cfu の死菌を処理した場合などで検出限界以下となり、Ct 値が得られませんでした。また、Ct 値が得られたケースでは Δ Ct 値が 12 以上を示したことから、3~4 log 程度の死菌抑制効果があると推測されます。死菌抑制効果を正確に測定するには、VIII. 実験例の「● 死菌抑制効果の確認」のように、10 倍の希釈系列を調製して実験を行います。

[EMA 処理条件の選定]

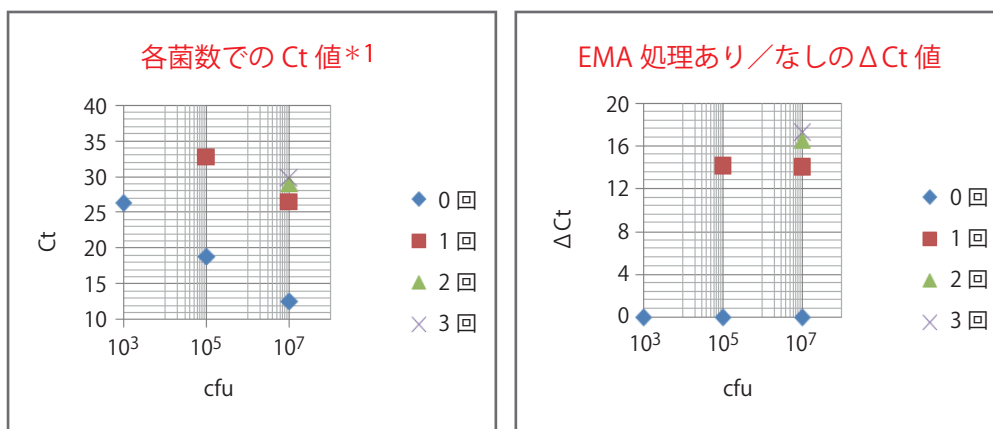
生菌と死菌の結果を踏まえて、生菌への影響が小さく、死菌抑制効果が十分な EMA 処理条件を選択します。

図 3 の実験例では、生菌への影響は EMA 処理 1~3 回のいずれでも小さく、どの回数でも問題ありませんでした。一方、死菌抑制効果は EMA 処理 1 回よりも 2 回の方が大きく、2 回と 3 回はほぼ同等なので、操作が簡便な EMA 処理 2 回を選択します。

生菌の結果



死菌の結果



* 1 : 10³ cfu の死菌で EMA 処理が 1~3 回の場合、および 10⁵ cfu の死菌で EMA 処理が 2~3 回の場合は、Ct 値が得られませんでした (検出限界以下でした)。

図 3. 生菌への影響および死菌抑制効果

エンドポイント PCR の場合

エンドポイント PCR の場合は、目的サイズのバンドの有無で、EMA 処理効果を判断します。死菌抑制効果が不十分な場合には、前述の通り、EMA 処理回数や EMA 処理時間を変更する他、PCR 増幅サイズを大きくすることによって効果を上げることができます。

VI-2. 実検体の測定

(1) はじめに

「VI-1. 前処理 (EMA 処理) 条件の検討」で決めた条件で実検体の EMA 処理を行います。この場合にも、EMA 処理なしと EMA 処理ありの比較を行います。EMA 処理なしの結果は生菌と死菌を合わせた総菌数を、EMA 処理ありの結果は主に生菌数を表しますので、これらの結果から生菌および死菌の存在を推定することができます。なお、実検体にはさまざまな夾雑物が含まれ EMA 処理に影響を及ぼす可能性がありますので、EMA 処理を行った検体に関しては、別途 Control Test Kit を用いて EMA 処理効果の確認を行います。

(2) 実験の流れ

EMA 処理に供する菌数は、その処理条件で抑制可能な死菌数以下になるようにします。また、検体に含まれる夾雑物が EMA 処理に影響を及ぼすことが明らかな場合は、必要に応じて検体を希釈します。

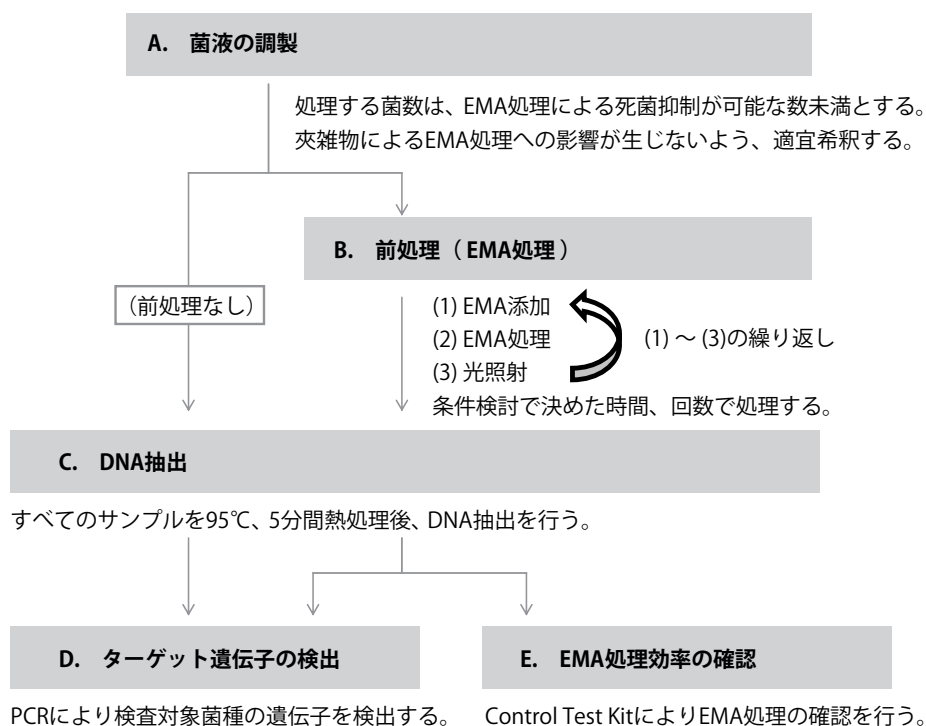


図 4. 実検体での実験フロー

(3) 結果の解析

同一検体由来の EMA 処理あり／なしの結果を比較して、生菌と死菌の存在の有無を下表の通り判断します (陽性コントロール、陰性コントロール、インターナルコントロールが妥当な結果を示すことを前提とする)。

		前処理 (EMA 処理) あり	
		検出	不検出
前処理 (EMA 処理) なし	検出	生菌 + / - *4 死菌 + / -	生菌 - *3 死菌 +
	不検出		生菌 - *2 死菌 -

* 2 : パターン 1

EMA 処理ありサンプルで不検出 → 生菌由来 DNA が検出限界以下
EMA 処理なしサンプルで不検出 → 死菌由来 DNA も検出限界以下
⇒ 検体サンプル中のグラム陰性菌が検出限界以下である。

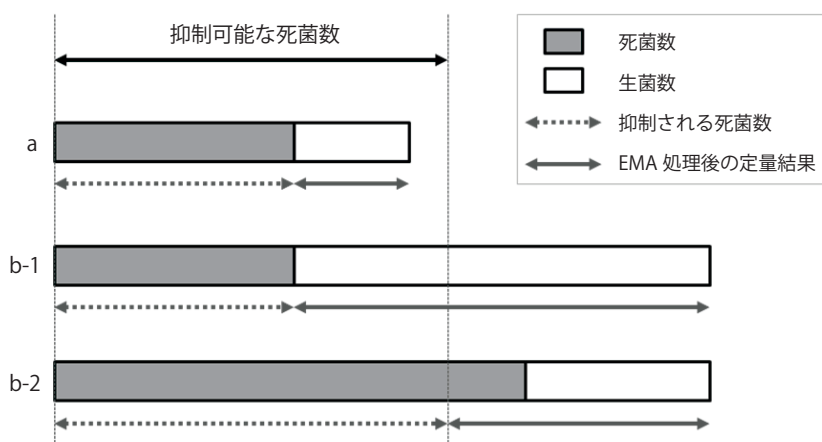
* 3 : パターン 2

EMA 処理ありサンプルで不検出 → 生菌由来 DNA が検出限界以下
EMA 処理なしサンプルで検出 → 死菌由来 DNA は EMA 処理で完全に修飾済み
⇒ 検体サンプル中のグラム陰性菌の生菌が検出限界以下である。

* 4 : パターン 3

EMA 処理ありサンプルで検出
EMA 処理なしサンプルで検出

- a. EMA 処理なしの定量結果（総菌数）が抑制可能な死菌最大数より少ない場合；EMA 処理ありの定量結果は、生菌数を表す。
- b. EMA 処理なしの定量結果（総菌数）が抑制可能な死菌最大数より多い場合；EMA 処理ありの定量結果には、生菌数の他、抑制しきれなかった死菌数が含まれる可能性がある。EMA 処理に供する菌数が抑制可能な死菌最大数を下回るように菌数を調整して再試する。



- a. 総菌数が抑制可能な死菌数より少ない場合；EMA 処理後、生菌が検出される。
- b-1. 総菌数が抑制可能な死菌数より多く、死菌数は抑制可能な死菌数より少なかった場合；EMA 処理後、生菌が検出される。
- b-2. 総菌数が抑制可能な死菌数より多く、死菌数は抑制可能な死菌数より多かった場合；EMA 処理後、生菌と EMA 処理で抑制しきれなかった死菌が検出される。

図 5. パターン 3 の結果の解釈について

VII. 操作

実験にあたっては、手袋、マスク、防御眼鏡を使用し、安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内で操作してください。

A. サンプル (菌液) の調製

PCR による検出は、非常に高感度です。実験環境や使用器具の汚染には極力注意を払い、コンタミネーション防止を心がけてください。

- 例) ・可能な限り、使い捨て器具を使用する。
・使い捨てにできないものは、洗浄後、乾熱滅菌処理を施す。
・マイクロピペットは用途別に準備する (本製品を用いた検体 EMA 処理および DNA 抽出用と PCR 試薬調製用を分ける)。

【サンプル調製】

検出目的の菌種に適した方法でサンプル調製を行い、最終的に 100 μ l 程度の菌懸濁液を用意してください。このサンプル液のうち 40 μ l を「B. サンプルの前処理 (EMA 処理)」に使用します。残りは氷上もしくは 4°C で保存し、EMA 処理なしサンプルを用意するために 40 μ l を「B. サンプルの前処理 > 7.」の加熱殺菌の操作を行った後、「C. NucleoSpin Tissue XS を用いた DNA 抽出」に使用します。

なお、菌液に不純物が多く含まれると、EMA 処理で光照射が不十分になることがありますので、サンプル調製の際にできる限り不純物を除去してください。

B. サンプルの前処理 (EMA 処理)

光照射装置 [LED Crosslinker 30 (製品コード EM300)、または LED Crosslinker 12 (製品コード EM200: 終売)] を使用する場合

【EMA 処理操作】

1. 1.5 ml チューブに A. で調製したサンプル液 40 μ l を準備する。
2. Solution A-gn を 10 μ l 添加し、混合*1 後、軽くスピンドウンする。
3. Solution B-gn を 5 μ l 添加し、混合*1 後、軽くスピンドウンする。
4. 遮光して氷上で 5 (~15) 分間静置する。
5. 光照射装置にセットし、光照射する。

(照射時間の例)

EMA 処理を 1 回のみ行う場合: 15 分間光照射する。

EMA 処理を複数回行う場合: 各回の処理で 5 分間光照射を行い、最後の回のみ 15 分間光照射する。

6. 必要に応じて、3.~5. の工程を繰り返す。
7. サンプルをスピンドウンし、95°C 5 分間ヒートブロックで加熱する。[加熱殺菌]
A. で氷上 (もしくは 4°C) 保存していた懸濁液 40 μ l (+ 15~25 μ l 滅菌精製水: EMA 処理を行ったサンプルと液量を揃える) も 7. の加熱殺菌と同様の処理を行う。

* 1: 短時間の緩やかなボルテックスもしくは数回のタッピングで混合してください。

C. NucleoSpin Tissue XS を用いた DNA 抽出

1. B.-7. で加熱殺菌を終えたサンプル全量 (55~65 μ l) に、それぞれ Lysis Buffer T1 を 160 μ l 加える。軽く混合して、スピンドウンする。
2. さらに Proteinase K*² を 16 μ l 加える。ボルテックスにて混合 (5 秒×2) して、スピンドウンする。
3. 56°C で 10 分間インキュベートする。
4. スピンドウンしたサンプルに Lysis Buffer B3 を 160 μ l 加える。ボルテックスにて混合 (5 秒×2) して、スピンドウンする。
5. 70°C で 5 分間インキュベートし、ボルテックスする。
6. 各サンプルが室温に戻ったことを確認して、スピンドウンしたサンプルにエタノール (96~100%) を 160 μ l 加え、ボルテックスにて混合 (5 秒×2) して、軽くスピンドウンする。
7. NucleoSpin Tissue XS Column を Collection Tubes (2 ml) にセットする。
8. 6. の溶液をカラムに添加し、11,000×g、1 分間遠心する。
9. カラムを新しい Collection Tubes (2 ml) にセットする。
10. カラムに Wash Buffer B5*³ を 50 μ l 添加し、11,000×g、1 分間遠心する。ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
11. カラムに Wash Buffer B5*³ を 50 μ l 添加し、11,000×g、2 分間遠心する。カラム上に液が残っていないことを確認する。
12. カラムを 1.5 ml マイクロチューブにセットする。
13. カラムに Elution Buffer BE を 20 μ l 添加し、11,000×g、1 分間遠心し、DNA 溶液を回収する。
14. 得られた DNA 溶液の液量がおおよそ 20 μ l であることを確認する。

* 2 : Proteinase K : 製品コード 740901.50 (50 回用) を用いる場合 ;
20 mg (1 vial) の Proteinase K (凍結乾燥品) に、Proteinase Buffer を 1 ml 加え溶解してください。溶解後の Proteinase K 溶液は、-20°C で保存してください。

* 3 : Wash Buffer B5 : Wash Buffer B5 (Concentrate) 2 ml あたり、8 ml のエタノールを加えてください。

D. リアルタイム PCR またはエンドポイント PCR による検出

C.-13. で調製した EMA 処理ありおよび EMA 処理なしの DNA 溶液を用いて、リアルタイム PCR またはエンドポイント PCR により、対象細菌のターゲット遺伝子の検出を行う。

E. EMA 処理効率の確認

EMA 処理ありサンプルについては、Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) を用いて、本製品の試薬中に含まれる反応確認用プラスミド DNA が、EMA 処理操作後、qPCR/PCR で検出されないことを確認することにより、本製品による EMA 処理操作が正しく行われたことを確認することができる。

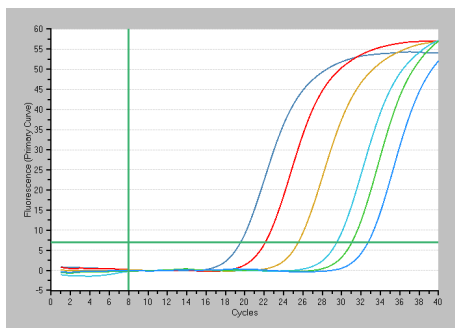
VIII. 実験例

● 生菌検出感度の確認

方法：一晩培養した大腸菌の懸濁液を生菌サンプルとして使用。段階希釈を行い、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ 個の大腸菌からプロトコールに従って EMA 処理なし/ありサンプルをそれぞれ調製した。各サンプルに対して、TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B) と Thermal Cycler Dice® Real Time System II (終売) を用いたリアルタイム PCR を行った (qPCR 20 μ l 系に各サンプルを 2 μ l 使用、ターゲットは大腸菌 *LacZ*、増幅サイズ 70 bp)。

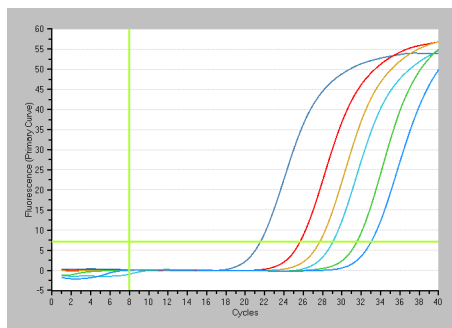
< EMA 処理なし >

増幅曲線

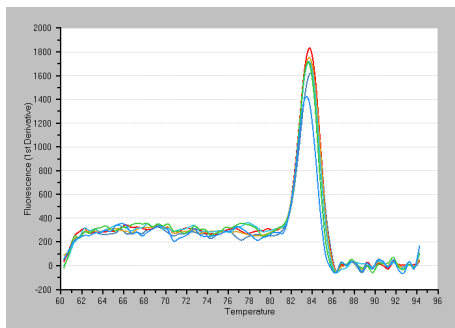


< EMA 処理あり >

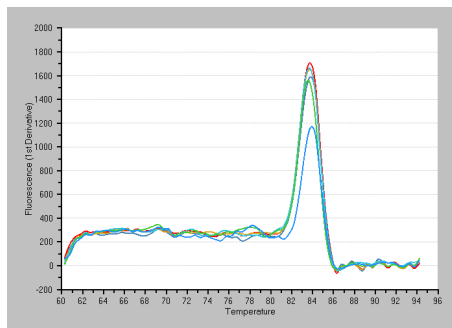
増幅曲線



融解曲線



融解曲線



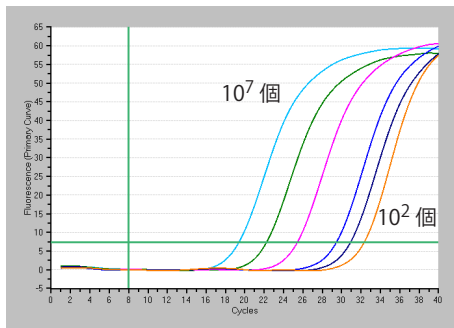
結果：EMA 処理なし（左図）と EMA 処理あり（右図）の結果の比較から、 $10^7 \sim 10^5$ 個では 1.5～2 サイクル程度の Ct 値の遅れ ($\Delta Ct = 1.5 \sim 2$) が認められましたが、それ以下の菌数では同等の結果が得られており、検出感度には影響がないことが分かります。

● 死菌抑制効果の確認

方法：大腸菌生菌サンプルの一部を 95℃で 5 分間熱処理したものを死菌サンプルとして使用。段階希釈を行い、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ 個の大腸菌死菌から、プロトコールに従って EMA 処理なし/ありサンプルをそれぞれ調製した。各サンプルに対して、TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) と Thermal Cycler Dice Real Time System II を用いたリアルタイム PCR を行った (qPCR 20 μ l 系に各サンプルを 2 μ l 使用、ターゲットは大腸菌 *LacZ*、増幅サイズ 70 bp)。

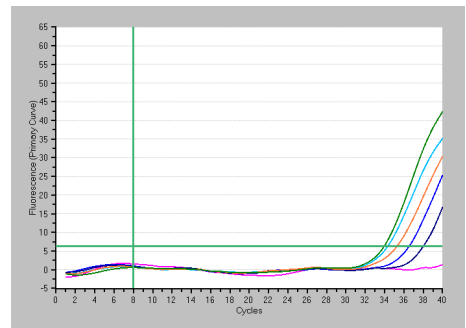
< EMA 処理なし >

増幅曲線

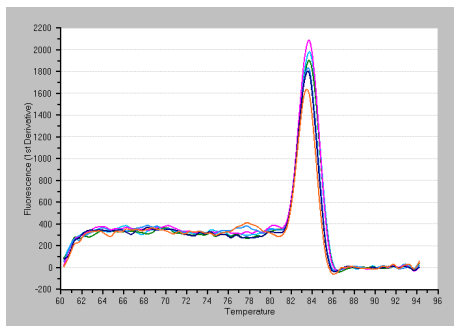


< EMA 処理あり >

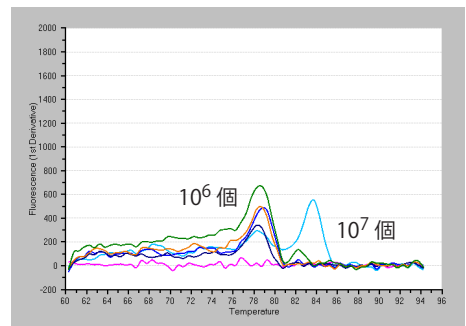
増幅曲線



融解曲線



融解曲線



結果：本製品を用いた EMA 処理により、少なくとも 10^5 個までの大腸菌の死菌を完全に抑制できることが分かります。

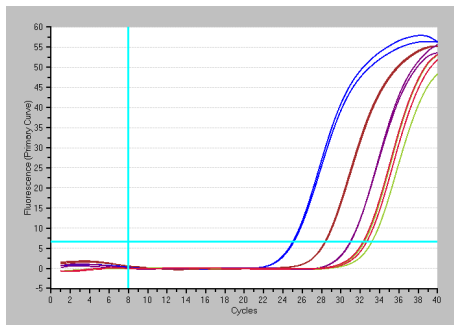
この時、EMA 処理なしの 10^5 個サンプルの Ct 値は 25.4 でした。大きく成分が異なる検体を用いて同様に EMA 処理～検出を行う場合、EMA 処理なしの各サンプルがこの Ct 値 (25.4) より大きな数値の Ct 値を示す場合、死菌由来 DNA が完全に修飾されており、死菌由来 DNA に起因する増幅は起こらないと考えることができ、増幅はすべて生菌由来 DNA に起因するものと推測することができます。

● モデル実験

方法：実際に近い状況で確認するため、 $10^3 \sim 10^7$ 個の生菌に一定数 (10^5 個) の死菌を混合したものを用意し、EMA 処理あり／なしの結果を比較した。

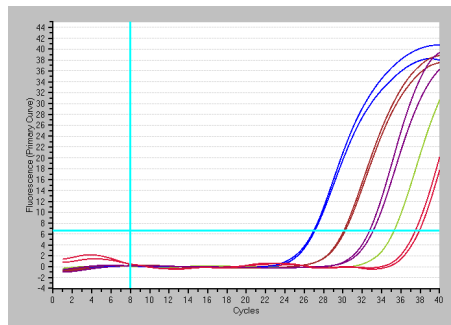
< EMA 処理なし >

増幅曲線

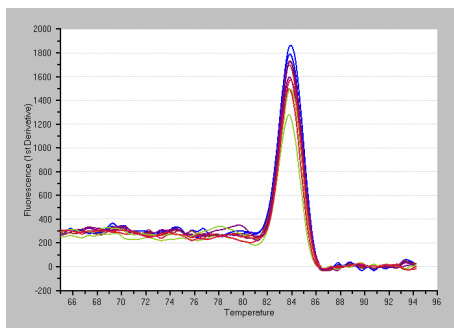


< EMA 処理あり >

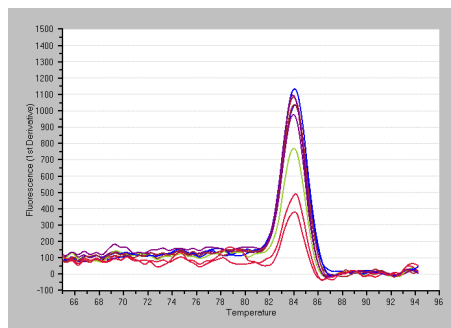
増幅曲線



融解曲線



融解曲線



結果：EMA 処理後には、死菌由来の増幅が抑制され、生菌が初発数依存的に検出できました。

IX. 参考文献

Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, and Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*. 2003 Apr; **34**(4): 804-808, 810, 812-813.

X. 関連製品

LED Crosslinker 30 (製品コード EM300)
Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (製品コード CY290)
NucleoSpin Tissue XS (製品コード 740901.10/.50/.250)
NucleoSpin Soil (製品コード 740780.10/.50/.250)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive) (製品コード 7705)
Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0 (製品コード 7714)
Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (製品コード 7730/7730S)

XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオの登録商標です。*Premix Ex Taq* はタカラバイオの商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社