

製品コード CY221

食品・環境分析用

Takara

CycleavePCR™
Bacillus cereus (CRS gene) Detection Kit

説明書

v201901Da

Bacillus cereus は環境細菌の一つであり、土壌、空気および河川水等の自然環境、そして農作物などの食料、飼料等に広く分布するが芽胞形成桿菌です。この芽胞は高熱にも耐え、富栄養環境で発芽して栄養型となって増殖し、毒素を産生します。食中毒に関わる毒素には嘔吐毒素（セレウリド）と下痢原生素（エンテロトキシン）の2種類があります。セレウリドは熱に強いいため、セレウリド産生性のセレウス菌が食品中に大量に増殖し、セレウリドを産生すると、加熱しても食中毒を引き起こします。セレウリドは従来、バイオアッセイやLC-MSによって検出されてきましたが、操作が煩雑で時間がかかるため、より簡便で迅速なセレウリド産生性セレウス菌の特異的検出法の開発が望まれていました。名古屋大学医学部と名古屋市衛生研究所による研究で、セレウリド非産生株はセレウリド合成酵素（CRS）遺伝子の一部を欠落していることが明らかになり、この欠落部分の配列に基づいて設計されたプライマー・プローブを用いてこの領域のPCRを行い、増幅産物が検出できれば、セレウリド産生株であることを確認できます。

本キットは分離培養培地から得られたセレウリド産生性セレウス菌を迅速かつ確実に検出するためのリアルタイムPCR検出キットです。本キットの増幅には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*[®] HS を使用しており、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。増幅産物の検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます。プローブは一方の端が蛍光物質で、もう一方の端がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブは、インタクトな状態では、クエンチングにより蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります（図1参照）。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることができます。

本キットには、セレウリド合成酵素（CRS）遺伝子を検出するための FAM 標識プローブと、インターナルコントロールとインターナルコントロール検出用の ROX 標識プローブが含まれています。二波長を同時にモニタリングすることで、一本のチューブで CRS 遺伝子とインターナルコントロールの検出による偽陰性のモニターが可能です。リアルタイム検出なので、電気泳動が不要であり、迅速に結果が得られます。

※このキットの開発には、名古屋市衛生研究所 安形則雄先生にご協力いただきました。

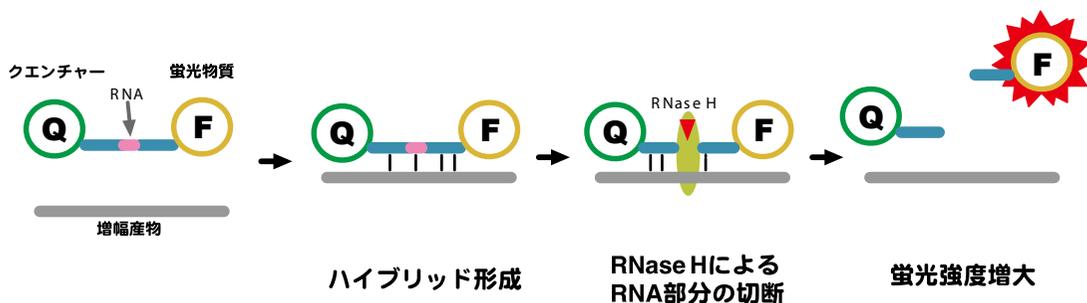


図1. サイクリングプローブ法の原理

I. 内容 (25 µl 反応、50 回分)

● 1.	2 × Cycleave Reaction Mixture	2 × conc.	625 µl
● 2.	CRS Primer/Probe Mix (FAM、ROX) *1	5 × conc.	250 µl
○ 3.	dH ₂ O		1 ml
● 4.	CRS Positive Control		150 µl (30 回分)

* 1：蛍光標識プローブを含んでいますので、遮光に留意してください。

【コンポーネントの説明】

2 × Cycleave Reaction Mixture：

PCR 反応試薬です。反応に必要な酵素、Buffer、dNTP Mixture を含みます。

CRS Primer/Probe Mix：

インターナルコントロールを含むプライマー・プローブ溶液です。プライマーにより、ターゲット遺伝子またはインターナルコントロールを増幅し、異なるレポーター色素が標識されたプローブにより、ターゲット遺伝子またはインターナルコントロールを検出します。ターゲット遺伝子検出用プローブは FAM、インターナルコントロール検出用プローブは ROX という蛍光物質が標識されています。

インターナルコントロール：

ターゲット遺伝子とは無関係な配列を有する DNA 分子で、偽陰性の判定を目的としています。全ての反応系に存在させることで、ターゲットが不検出の場合、インターナルコントロールの検出ができていれば、PCR 反応阻害が起こらず検出限界以下と判定できます。ターゲット、インターナルコントロールとも不検出である場合、PCR 反応が正常に進まなかったことがわかります。なお、ターゲットの DNA 量が多い場合、そのターゲットの増幅反応が優先され、インターナルコントロールのシグナルの立ち上がりが遅くなったり、シグナル強度が弱くなる、あるいは、シグナルが得られないということがあります。この場合、ターゲット遺伝子の検出が正しくなされており、陽性であると判定できます。

ターゲット遺伝子：

標的となる遺伝子。このキットの場合、セレウリド合成酵素遺伝子 (CRS 遺伝子) のことです。

dH₂O：滅菌水です。

CRS Positive Control：CRS 遺伝子用陽性コントロール DNA です。

II. 保存 - 20℃

III. キット以外に必要なもの (主なもの)

【機器】

- リアルタイム PCR 装置および専用チューブ
Thermal Cycler Dice® Real Time System // (製品コード TP900/TP960)
食品環境検査用ソフトウェア
または、Thermal Cycler Dice Real Time System Software
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) など
- ヒートブロック (95℃まで温度を上げられるもの)
- 卓上遠心器
- 微量高速遠心機 (4℃設定可能)

【その他】

- 200 µl、20 µl、10 µl 各マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付)

IV. 使用に際して

- ・本キットは遺伝子検出であるため、不活化された細菌も検出し、生菌のみを検出対象とするものではありません。また、設計した Primer/Probe の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が生じた際には、検出できない場合があります。
(検査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。)
- ・判定の確定には遺伝子検査だけではなく、培養検査などの結果も併用の上、ご判断ください。

V. 操作上の注意

1. リアルタイム PCR 装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
2. 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。
3. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の3つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します(VIII. 補足：エリア分けについてを参照)。どのエリアにおいても、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ検体の添加を行います。

本キットでは増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

4. 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。リアルタイム PCR 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

VI. 操作

1. サンプルの調製
2. リアルタイム PCR 装置の準備
3. 反応液の調製
 - 反応液を調製する。
 - ↓
 - 反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、または検体サンプル、または陽性コントロールを添加する。
 - ↓
 - 反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。
 - ↓
4. 結果表示
 - 画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される。
 - ↓
 - 反応終了
 - ↓
 - 判定**

VI-1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

(1) 菌体を直接 PCR にかける場合

1. プレート (NGKG 培地*¹ など) 上のコロニーから、滅菌済みマイクロピペット用チップなどで微量の菌体を取り、滅菌水 500 μ l に懸濁する。
2. 95°C で 5 分間、熱処理する。
3. 遠心分離により残渣を除いた上清 5 μ l を PCR 反応に使用する。

(2) 培養法を組み合わせて、食品等から菌を回収して PCR を行う場合

1. 被験試料にポリミキシン添加 SCD 培地*² を 10 倍量加え、細菌検査用ホモジナイザー (ストッカー等) で破碎混合後、35°C で数時間 ~ 一晚培養する。
2. 培養液 1.3 ml を 1,000 rpm (約 100 \times g) で 1 分間遠心後、その上清の 1.0 ~ 1.2 ml を新しいチューブにとり、12,000 rpm (13,000 \times g) で 3 分間遠心する。
3. 上清を除去し、沈殿を 500 μ l TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0) にて懸濁後、95°C、5 分間加熱処理する。
4. 遠心分離により残渣を除いた上清 5 μ l を PCR 反応に使用する。

PCR 反応阻害がかかる場合、さらに希釈して PCR 反応サンプルとしてご使用ください。

* 1 : NGKG 培地 : セレウス菌分離用培地 日水製薬 (株)

* 2 : SCD 培地 : トリプトソーヤブイオン 日水製薬 (株)

VI-2. 反応液の調製と反応開始

本製品は 1 本の反応チューブ内で CRS 遺伝子とインターナルコントロールの増幅産物を同時に検出します。正しい検出結果を得るために、CRS 遺伝子陽性コントロール反応、ネガティブコントロール反応を一緒に行ってください。

(1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

検体サンプル以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、各反応チューブに 20 μ l ずつ分注して軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして、dH₂O を 5 μ l を加え、しっかりとふたをする。

必要本数は、サンプル数 + 2 本 (CRS 陽性コントロール、陰性コントロールとして dH₂O を加えたもの) と設定する。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
● 2 \times Cycleave Reaction Mixture	12.5 μ l	1 \times
● CRS Primer/Probe Mix (5 \times conc.)	5 μ l	1 \times
検体サンプル or CRS Positive Control or dH ₂ O	(5 μ l) * ¹	
○ dH ₂ O	2.5 μ l	
Total	25 μ l	

* 1 : 検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。

【注意】蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようご注意ください。

(エリア 3 へ移動)

(2) サンプル (鋳型) を添加する。(エリア 3 で実施)

陰性コントロール以外の各チューブについて、エリア 2 で調製した検体サンプルや CRS Positive Control を、(1) で分注した調製液に添加し、ふたをしっかりとる。反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心し、リアルタイム PCR 装置にセットする。

【注意】反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

VI-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出、判定

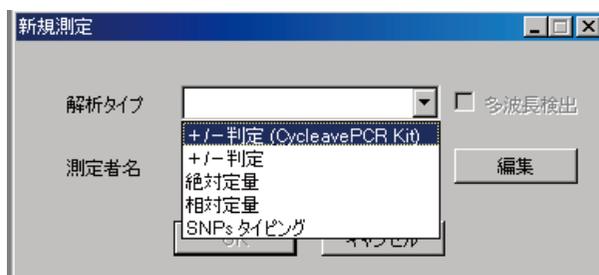
操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている取扱説明書をご確認ください。

ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System および Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) を使用した場合の簡単な操作方法と、結果の判定について示します。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System の場合 】

(食品環境検査用ソフトウェア)

- (1) ランファイルを新規作成し、“新規測定”画面において解析タイプ<+/-判定 (CycleavePCR Kit)>を選択する。

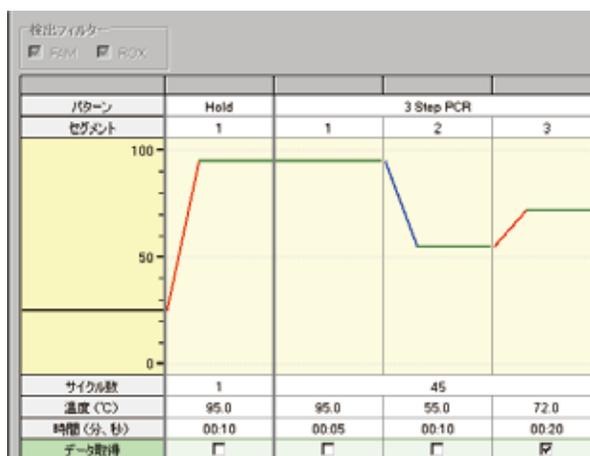


※ +/-判定 (CycleavePCR Kit) は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、<PM (M) Plus/Minus Assay 解析>を使用します。

解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、弊社ウェブサイトのお問い合わせ>ダウンロードサービスの「Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードしてください。

- (2) “反応条件設定”画面で PCR 条件が以下の条件になっていることを確認する。

初期変性 (Hold)
Cycle : 1
95°C 10 秒
3 step PCR
Cycle : 45
95°C 5 秒
55°C 10 秒
72°C 20 秒 (検出)



- (3) 画面右下の“反応開始”ボタンをクリックして反応を開始する。

反応開始

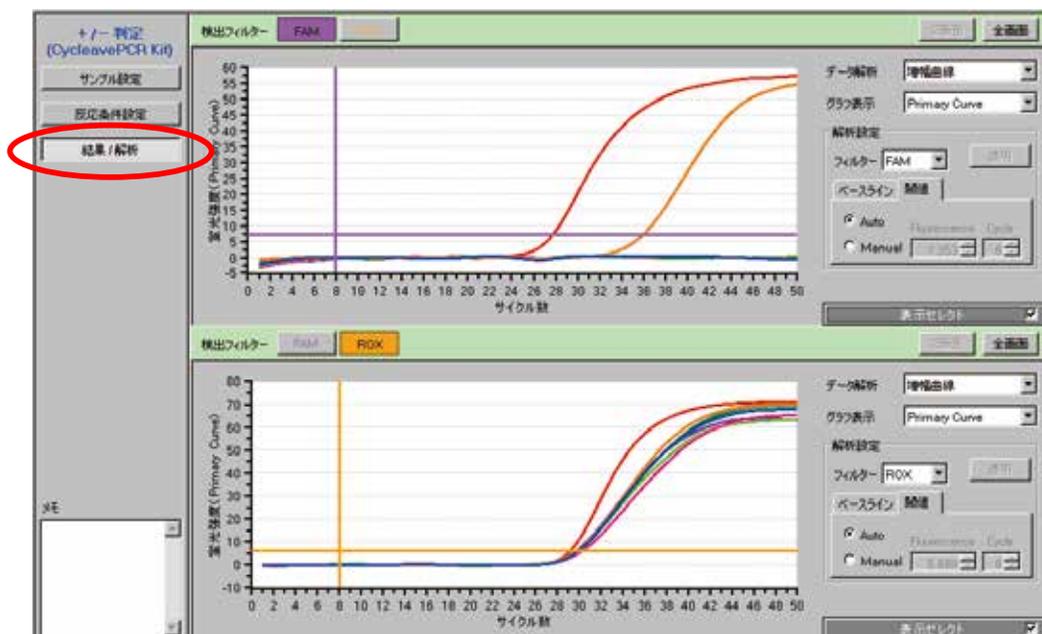
- (4) “サンプル設定”画面で“入力”ボタンをクリックしウェル情報設定を行う。反応に使用しないウェルはOmit設定する。



インターナルコントロールは、デフォルトでROXに設定されている(変更できません)。判定の信頼性を高めるため、2連以上での反応を推奨する。

(5) 結果解析

1. 反応終了後、“結果/解析”ボタンをクリックする。



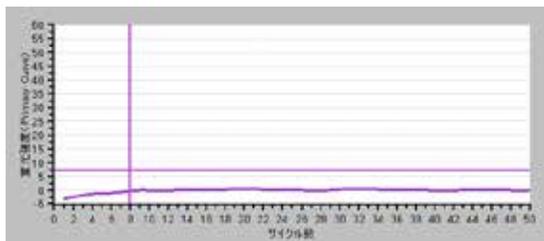
2画面の上部にターゲット遺伝子検出のFAMフィルターでの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール(IC)検出のROXフィルターでの増幅曲線が表示される。(閾値はAutoで表示)

2. NC (陰性コントロール)、PC (陽性コントロール) での増幅曲線を確認する。

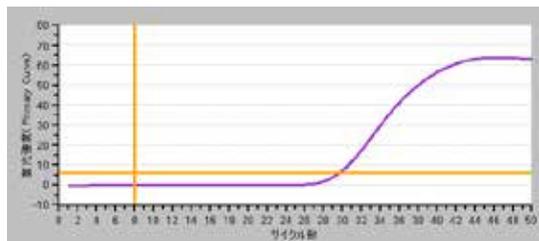
NC の増幅曲線の表示：表示セレクトで < N > を選択

FAM フィルターにおいて蛍光のシグナル変化が無いベースラインが得られ閾値を超えていないこと、ROX フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター
(ターゲット遺伝子検出)



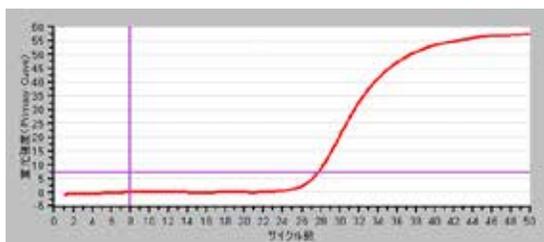
ROX フィルター
(IC 検出)



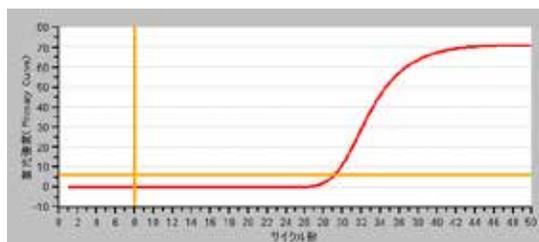
PC の増幅曲線の表示：表示セレクトで < P > を選択

FAM フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、ROX フィルターにおいても増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター
(ターゲット遺伝子検出)

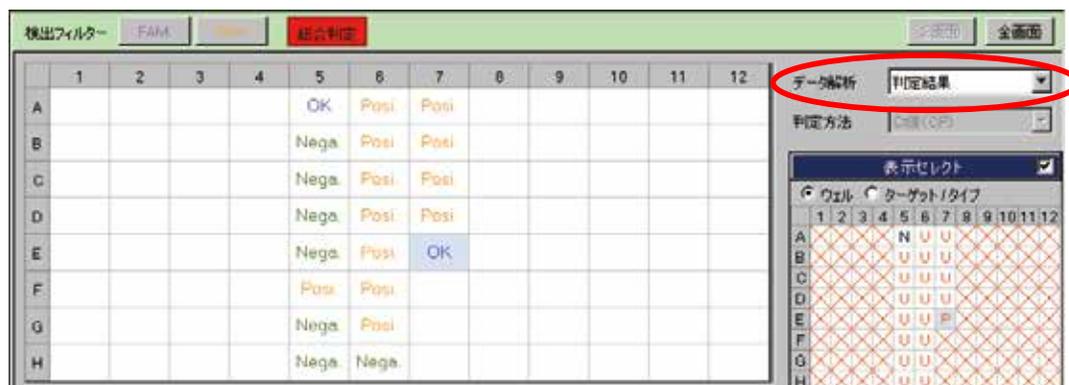


ROX フィルター
(IC 検出)



3. サンプルの結果を、表示セレクトで < U > を選択し増幅曲線を確認する。

- (6) 結果の表示
データ解析<判定結果>を選択する。



総合判定結果の表示について

陰性コントロール<N>、陽性コントロール<P>の表示

- OK : コントロール反応が正常 (反応系が正しく進んでいる。)
- OUT : コントロール反応が異常 (反応系が正しく進んでいない。)

検体サンプル<U>の表示

- Posi. : ターゲット遺伝子の検出が陽性
- Nega. : ターゲット遺伝子が検出限界以下
- ND : 判定不能 (PCR 反応が正しく進まなかった。)
- インターナルコントロール、ターゲット遺伝子とも検出せず、判定不能。
- Error : 同一レプリケート番号の判定が異なる。

※判定は、閾値を超えているか否かにより行います。

■ 判定結果についての注意事項

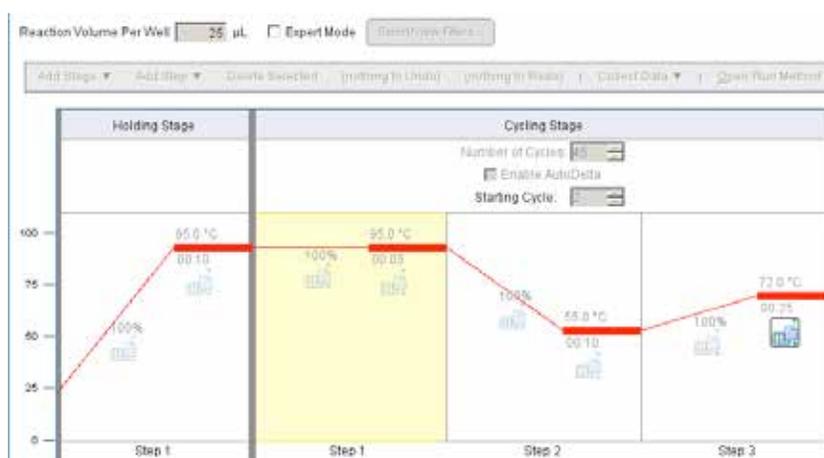
- (1) 陰性コントロール反応において、総合判定解析が「OUT」となった。
 - ターゲット遺伝子検出において、増幅曲線が得られた。
 - 試薬中に目的産物が混入した可能性がある。再度、コンタミネーションに注意し反応を行う。
- (2) 陽性コントロール DNA 反応において、総合判定解析が「OUT」となった。
 - ターゲット遺伝子、インターナルコントロールともに増幅曲線が得られなかった。
 - 何らかの原因で PCR 反応、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。反応液の調製にミスがないことを確認し、再度反応を行う。
 - インターナルコントロール (ROX) では増幅曲線が得られるが、ターゲット遺伝子 (FAM) では増幅曲線が得られなかった。
 - Primer/Probe Mix に問題がある、または、陽性コントロール DNA が分解している可能性がある。
- (3) 検体サンプル反応において、総合判定解析が「ND」となった。
 - ターゲット遺伝子、インターナルコントロールともに増幅曲線が得られなかった。
 - サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈する、または検体サンプルの再調製を行った後、再反応を行う。

【 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合 】

増幅反応は以下の手順で行う。

- (1) Advanced Setup で New Experiment を作成する。
- (2) Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan Reagents または Other を選択する。(Other を選択した場合は Include Melt Curve の は外しておく。)
- (3) Plate Setup の Define Target にて Target Name を CRS、Reporter を FAM、Quencher を (none) にしたものを作成する。
- (4) Plate Setup の Define Target にて Target Name を IC、Reporter を ROX、Quencher を (none) にしたものを作成する。
- (5) Define Samples にて NC、PC とサンプルを設定する。
- (6) (3)、(4)、(5) で作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。
Passive Reference は (none) にする。
- (7) Instrument タブをクリックし、以下の反応条件を入力する。

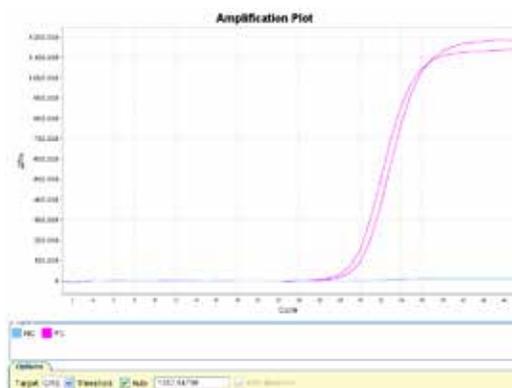
初期変性 (Hold)
Cycle : 1
95°C 10 秒
3 step PCR
Cycle : 45
95°C 5 秒
55°C 10 秒
72°C 25 秒 (検出)



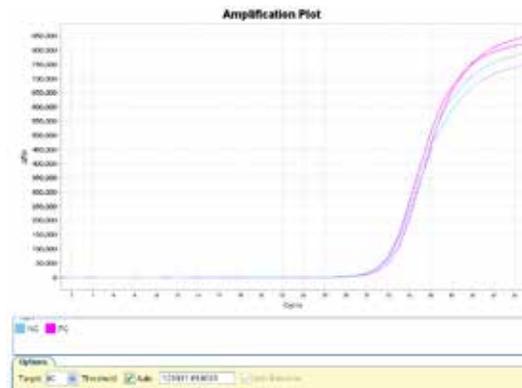
- (8) 反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。

- (9) 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線が確認できる。
(Target のプルダウンメニューから各々のターゲットを選択)

※ Threshold、Baseline は必要に応じて Manual にて設定する必要があります。



CRS Target の検出 (FAM)



IC (インターナルコントロール) の検出 (ROX)

- (10) View Well Table タブをクリックして結果のデータを参照できる。

#	Well	Dye	Sample No.	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity
CRS										
1	C6	<input type="checkbox"/>	NC	CRS	NTC	FAM-NFQ-MGB	30.853	30.586	0.377	
2	D6	<input type="checkbox"/>	NC	CRS	NTC	FAM-NFQ-MGB	30.319	30.586	0.377	
3	E6	<input type="checkbox"/>	PC	CRS	UNKNOWN	FAM-NFQ-MGB	24.987	25.436	0.663	
4	F6	<input type="checkbox"/>	PC	CRS	UNKNOWN	FAM-NFQ-MGB	25.904	25.436	0.663	
IC										
5	C6	<input type="checkbox"/>	NC	IC	UNKNOWN	ROX-NFQ-MGB	32.535	32.881	0.076	
6	D6	<input type="checkbox"/>	NC	IC	UNKNOWN	ROX-NFQ-MGB	32.827	32.881	0.076	
7	E6	<input type="checkbox"/>	PC	IC	UNKNOWN	ROX-NFQ-MGB	32.772	32.991	0.309	
8	F6	<input type="checkbox"/>	PC	IC	UNKNOWN	ROX-NFQ-MGB	33.209	32.991	0.309	
No Target Name										
9	A1	<input type="checkbox"/>								
10	A2	<input type="checkbox"/>								
11	A3	<input type="checkbox"/>								

※ StepOnePlus Real-Time PCR System も同様な操作で使用できます。ただし、ROX の検出感度が低いため、全 target を同時に表示すると、ROX (IC) の増幅曲線が小さく表示されます。FAM と ROX の target を別々に表示させて解析してください。

VII. 判定結果表

判定結果表 1：サンプルを添加した場合（各コントロール反応の結果とあわせて最終判定を行うこと）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（+）	増幅シグナル（-）
FAM (CRS)	増幅シグナル（+）	CRS 遺伝子陽性*1	CRS 遺伝子陽性*1
	増幅シグナル（-）	CRS 遺伝子検出限界以下*2	判定不能*3

判定結果表 2：ポジティブコントロール（CRS Positive Control を添加したもの）

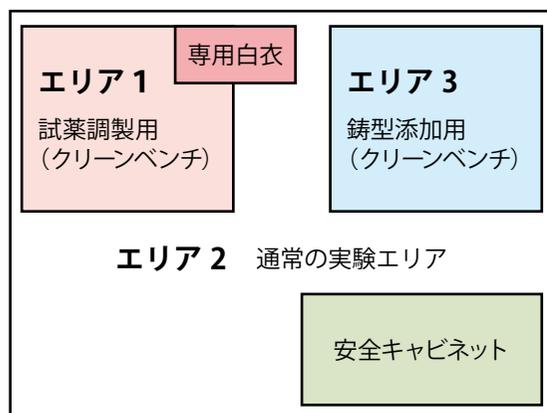
		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（+）	増幅シグナル（-）
FAM (CRS)	増幅シグナル（+）	CRS 検出系に問題なし	CRS 検出系に問題なし
	増幅シグナル（-）	CRS 検出系に問題あり*4	判定不能*3

判定結果表 3：ネガティブコントロール（dH₂O を添加したもの）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（+）	増幅シグナル（-）
FAM (CRS)	増幅シグナル（+）	CRS コンタミネーションの疑い*5	CRS コンタミネーションの疑い*5
	増幅シグナル（-）	CRS コンタミネーションはない*2	判定不能*3

- * 1：インターナルコントロールの（+）/（-）に関わらず、CRS 遺伝子が陽性である。ネガティブコントロール反応の結果から反応系にコンタミネーションがなかったことを確認すること。
- * 2：ポジティブコントロールの反応で（+）となる（反応系に問題がない）ことを確認すること。
- * 3：何らかの原因でPCR反応またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈して再反応を行う。場合によっては検体の再調製が必要。
- * 4：CRS 増幅用プライマーあるいは CRS 検出用プローブに問題があるか、CRS Positive Control が分解している。
- * 5：コンタミネーションの疑いがある場合は、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

VIII. 補足：エリア分けについて



- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
標準サンプルの希釈もここで行う。

IX. 参考文献

- 1) Yabutani, M., *et al. Letters in Applied Microbiology*. (2009) **48**: 698-704.
- 2) Agata, N. *International Journal Of Food Microbiology*. (2002) **73**: 23-27.
- 3) Agata, N., *et al. FEMS Microbiol Lett*. (1994) **121**: 31-34.
- 4) Schraft, H., *et al. Applied and Environmental Microbiology*. (1995) **61**: 98-102.

X. 関連製品

Bacillus cereus (CRS gene) PCR Detection Kit (製品コード RR132A)
CycleavePCR™ O-157 (VT1/VT2) Typing Kit (製品コード CY222)
CycleavePCR™ O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0 (製品コード CY217A/B)
CycleavePCR™ *Vibrio* (*tdh* gene) Detection Kit (製品コード CY220)
CycleavePCR™ *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0 (製品コード CY205)

Thermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード TP900/TP960)
Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (製品コード TP700/TP760)
96 well Hi-Plate for Real Time (製品コード NJ400)
Sealing Film for Real Time (製品コード NJ500)
Plate Sealing Pads (製品コード 9090)
48 well snap plate (製品コード NJ700)
Flat cap for snap plate (製品コード NJ720)
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)
0.2 ml Hi-8-Flat Cap (製品コード NJ302)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)

XI. 注意

- ・本製品は食品分析および環境分析用試薬です。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。検査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。
- ・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。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、*Thermal Cycler Dice* はタカラバイオの登録商標です。*CycleavePCR* はタカラバイオ株式会社の商標です。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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社