

製品コード CY228

食品・環境分析用

TAKARA

CycleavePCR™
***Staphylococcus aureus* (DnaJ gene)**
Detection Kit

説明書

v201901Da

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、ヒトや動物の皮膚、消化管に存在する常在細菌の一種で、食品中で増殖するとエンテロトキシンと呼称される毒素を産生し、食中毒の原因となります。本キットは、ハウスキーピング遺伝子の1つであり、菌種間でも多様性を持つ DnaJ 遺伝子をターゲットとして、黄色ブドウ球菌をリアルタイム PCR 装置を用いて特異的に検出するキットです。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。プローブは片方の端が蛍光物質で、もう片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 によって 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、黄色ブドウ球菌の DnaJ 遺伝子に由来する増幅産物を検出するための FAM 標識プローブ、ならびにインターナルコントロール由来増幅産物を検出するための 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 DnaJ 遺伝子の検出と、インターナルコントロール DNA 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 PCR による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。

※ 本製品は、岐阜大学大学院医学系研究科病原制御学分野 教授 江崎孝行先生のご協力のもとに開発いたしました。

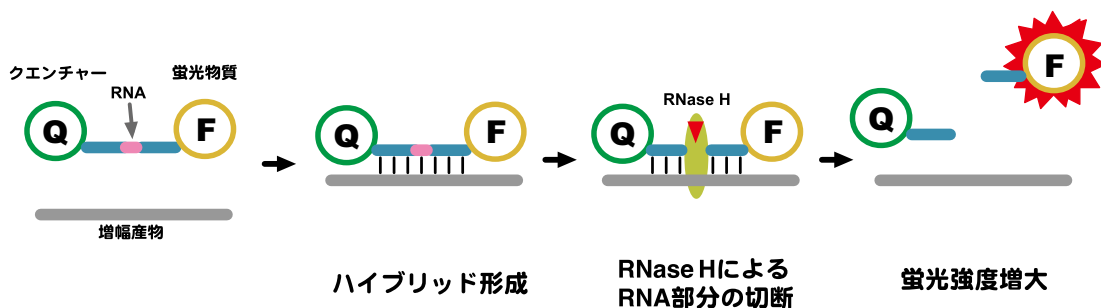


図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. 内容 (25 µl 反応× 50 回分)

● 1.	2 × CycleavePCR Reaction Mix		625 µl
● 2.	<i>S. aureus</i> Primer/Probe Mix (FAM, ROX) *	5 × conc.	250 µl
○ 3.	dH ₂ O		1 ml
● 4.	<i>S. aureus</i> Positive Control		50 µl (10 回分)

* : 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 × CycleavePCR Reaction Mix :

酵素、Buffer、dNTP mixture を含む PCR 反応試薬です。

***S. aureus* Primer/Probe Mix (FAM, ROX) :**

S. aureus の DnaJ 遺伝子検出用プライマー・プローブ、インターナルコントロール DNA の混合溶液です。

プライマーにより、*S. aureus* の DnaJ 遺伝子 (ターゲット遺伝子) またはインターナルコントロール DNA を増幅し、FAM 標識プローブにより *S. aureus* の DnaJ 遺伝子を、ROX 標識プローブによりインターナルコントロール DNA を検出します。

ターゲット遺伝子 :

標的となる遺伝子。このキットの場合、*S. aureus* の DnaJ 遺伝子のことです。

インターナルコントロール DNA :

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、ターゲットが検出されない場合にインターナルコントロール DNA の検出ができていれば、PCR 阻害が起こっていないと判断でき、サンプル中のターゲットが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 DNA がともに検出されないなら、PCR 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 DNA のシグナルの立ち上がりが遅くなったり、シグナル強度が弱い、あるいはシグナルが得られない場合があります。この場合、ターゲットは陽性であると判定できます。

dH₂O :

滅菌精製水です。

***S. aureus* Positive Control :**

S. aureus の DnaJ 遺伝子用陽性コントロールです。

II. 保存 – 20°C

III. キット以外に必要な試薬、機器（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 II（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice Real Time System Lite（製品コード TP700/TP760）
食品環境検査用ソフトウェア（日本語表示）
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）
- ※ チューブ 1 本ごとにフラットキャップが付いているキャップ付き 0.2 ml 8 連チューブを Thermal Cycler Dice Real Time System 専用として販売しています。チューブ間のコンタミの危険性が軽減できるので特にお勧めします。
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）

【その他】

- ・1,000 μ l、200 μ l、20 μ l、10 μ l 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）
- ・卓上遠心機
- ・微量高速遠心機（4℃設定可能）

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（IX. 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
増菌培養液から菌体熱抽出サンプルを調製する
- (2) リアルタイム PCR 装置のセッティング
- (3) 反応液の調製と反応開始
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)

【菌体熱抽出サンプルの調製】

- (1) 増菌培養液 10 μ l を 1.5 ml チューブに採る。
- (2) 滅菌水 90 μ l を加えて混合する。
- (3) 95°C で 5 分間熱処理する。
- (4) 遠心分離 (12,000 rpm、4°C、10 分) し、上清を回収する。
これを DnaJ 遺伝子検出用の熱抽出サンプルとして 1 反応に 5 μ l 使用する。

※ この方法で調製した熱抽出サンプルを用いて PCR を行ったときに反応が阻害されるようであれば、滅菌精製水で 10 倍希釈液、100 倍希釈液を調製し、PCR 反応に用いてください。

※ 増菌培養液は、それぞれ適切な標準プロトコールに従って食品サンプルなどから調製したものを用いてください。熱抽出サンプルは -20°C で保存可能です。

VI-2. 反応液の調製と反応開始

本キットでは、1本の反応チューブ内で DnaJ 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、DnaJ 遺伝子の陽性コントロール反応、および陰性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)

検体サンプル等の鋳型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 加え、しっかりとふたをする。

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

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
● 2 × CyclecleavePCR Reaction Mix	12.5 μ l	1 ×
● <i>S. aureus</i> Primer/Probe Mix (5 × conc.)	5 μ l	1 ×
検体サンプル or Positive Control or dH ₂ O	(5 μ l) *	
○ dH ₂ O	2.5 μ l	
Total	25 μ l	

* : 検体サンプルまたは陽性コントロール DNA は、ステップ (2) で加えるため、ここでは加えない。

【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、検体サンプルまたは陽性コントロール (*S. aureus* Positive Control) を添加し、しっかりとふたをする。

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 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 // および Lite 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。

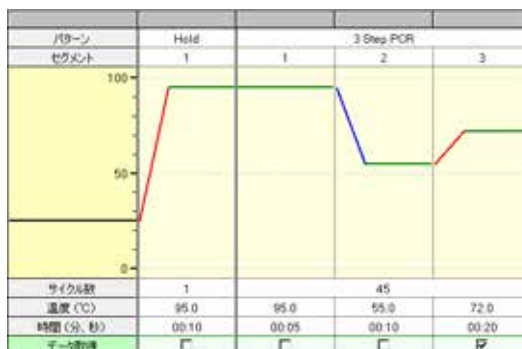


※ +/-判定 (CycleavePCR Kit) は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、< PM (M) Plus/Minus Assay >を使用します。

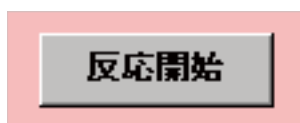
解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、弊社ウェブサイトのお問い合わせ>ダウンロードサービスの「Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードしてください。

- (2) 反応条件設定画面で、検出フィルターは FAM と ROX の両方にチェックが入っており、PCR 条件は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)

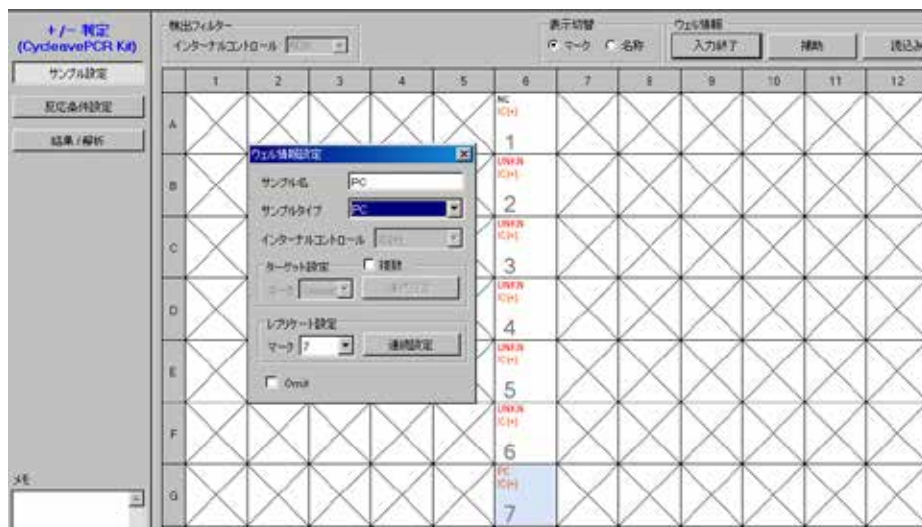


- (3) 画面右下の“反応開始”ボタンをクリックし、任意の Run File 名を付けて反応を開始する。



(4) サンプル設定画面でサンプル情報の設定を行う。

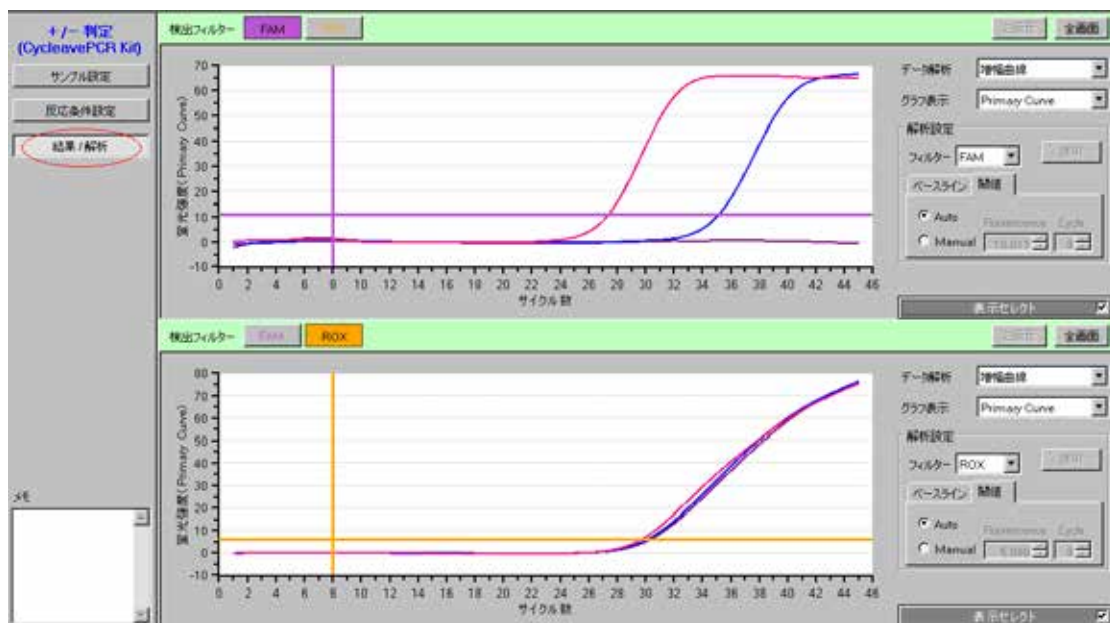
インターナルコントロールは、デフォルトで ROX に設定されている（変更できません）。反応に使用しないウェルは Omit 設定する。



※判定の信頼性を高めるため、2 連以上での反応を推奨します。

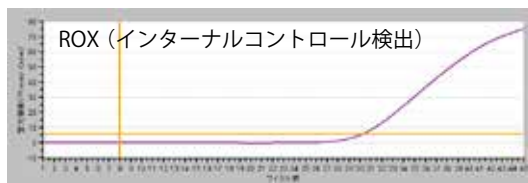
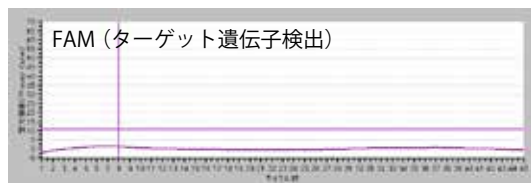
(5) 結果解析

1. 反応終了後、“結果／解析” ボタンをクリックする。

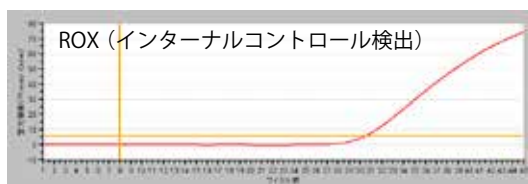
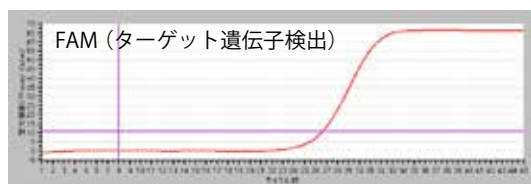


二画面の上部にターゲット検出の FAM フィルターの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール検出の ROX フィルターの増幅曲線が表示される。（閾値は Auto で表示）

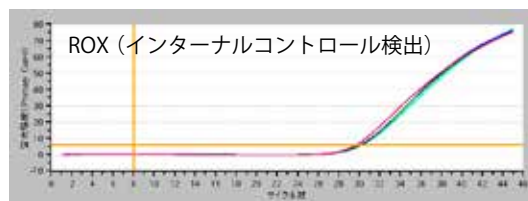
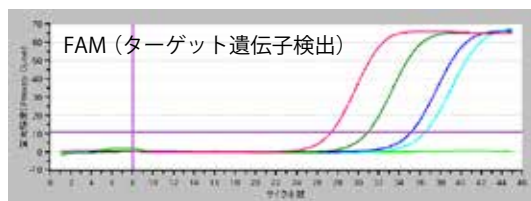
- NC (陰性コントロール) および PC (陽性コントロール) での増幅曲線を確認する。
NC の FAM フィルターにおいて蛍光シグナル変化の無いベースラインが得られ、閾値を超えていないことを確認する。
超えている場合は、Manual にして数値を入力し、ベースラインが閾値を超えないように設定する。
また、ROX フィルターにおいて増幅曲線が描かれ、閾値を超えていることを確認する。



PC の 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増幅曲線が描かれ、閾値を超えていることを確認する。



- 表示セレクトで <U> を選択してサンプルの結果を表示し、FAM フィルターにおいてベースラインや増幅曲線が正常に描かれていることを確認する。



データ解析のカラムで、<判定結果> を表示させる。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
					OK						
					Nega.						
					Posi.						
					Posi.						
					Posi.						
					Posi.						
					OK						

- OK : コントロール反応が正常 (反応系が正しく進んだことを示す。)
- 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ことを示す。)
- 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 : Internal Control、ターゲット遺伝子のどちらも検出せず、判定不能 (PCR 反応がうまく進まなかったことを示す。)
- Error : 同一 Replicate 内で判定が異なることを示す。

■ 判定結果についての注意事項

- ・ 陰性コントロール反応 (NC) で、FAM フィルター (ターゲット遺伝子検出) において増幅曲線が得られた場合 (判定結果は OUT 表示になる)
 - コンタミネーションの疑いがあるため、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。
- ・ 陽性コントロール反応 (PC) で、FAM フィルター、ROX フィルター (インターナルコントロール検出) の両者で増幅曲線が得られなかった場合 (判定結果は OUT 表示になる)
 - 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。
- ・ 陽性コントロール反応 (PC) で、ROX フィルターでは増幅曲線が得られるが、FAM フィルターで増幅曲線が得られなかった場合 (判定結果は OUT 表示になる)
 - Primer/Probe Mix に問題がある、または、陽性コントロールが分解している可能性がある。
- ・ 検体サンプルの反応 (UNKN) で、FAM フィルター、ROX フィルターの両者で増幅曲線が得られなかった場合 (判定結果は ND 表示になる)
 - 何らかの原因で PCR、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。または検体サンプルの再調製を行い、再反応を行う。
- ・ 検体サンプルの反応 (UNKN) で、FAM フィルターで増幅曲線が確認されるが、ROX フィルターで確認されない場合
 - ターゲット DNA が多い場合、そのターゲットの増幅曲線が優先され、インターナルコントロール DNA の増幅反応が競合抑制される場合がある。(判定結果は Posi 表示になる。) 検出系には問題なし。

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

Quantification-Standard Curve のモードで解析します。各種設定は、Advanced Setupで行ってください。

PCR 条件

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)

Passive Reference

(none)

Define Targets

Target Name : DnaJ、 Reporter : FAM、 Quencher : (none)

Target Name : IC、 Reporter : ROX、 Quencher : (none)

Define Samples

陰性コントロール

サンプルタイプ : NTC (No Template Control)

検体サンプル、陽性コントロール

サンプルタイプ : Unknown

※ StepOnePlus Real-Time PCR System は 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：検体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 DNA）	
		増幅シグナル（+）	増幅シグナル（-）
FAM （DnaJ 遺伝子）	増幅シグナル（+）	DnaJ 遺伝子陽性*1	DnaJ 遺伝子陽性*1
	増幅シグナル（-）	DnaJ 遺伝子検出限界以下*2	判定不能*3

判定結果表 2：陽性コントロール反応（*S. aureus* Positive Control を添加したもの）

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

判定結果表 3：陰性コントロール反応（dH₂O を添加したもの）

		ROX（インターナルコントロール DNA）	
		増幅シグナル（+）	増幅シグナル（-）
FAM （DnaJ 遺伝子）	増幅シグナル（+）	DnaJ 遺伝子検出系にコンタミネーションの疑い*5	DnaJ 遺伝子検出系にコンタミネーションの疑い*5
	増幅シグナル（-）	DnaJ 遺伝子検出系にコンタミネーションは無い	判定不能*3

- * 1：インターナルコントロール DNA 検出結果の（+）/（-）に関わらず、DnaJ 遺伝子陽性である。陰性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：陽性コントロールの検出結果が（+）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、場合によっては検体の再調製が必要。
- * 4：ターゲット遺伝子増幅用プライマーあるいはターゲット遺伝子検出用プローブに問題があるか、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. 検出確認

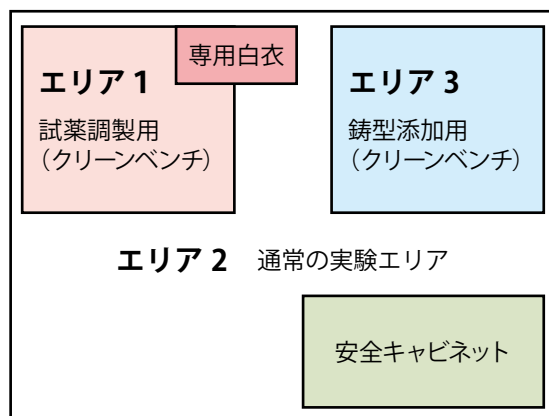
以下の菌株について検出の有無を確認している。

○：検出可能 ×：不検出

No.	GTC No.	Genus	Species epithet	Type strain	検出
1	1770	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> enterotoxin A producer		○
2	1779	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> enterotoxin B producer		○
3	1772	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> enterotoxin B&C producer		○
4	1773	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> enterotoxin D producer		○
5	286	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	Type strain	○
6	12388	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> MRSA		○
7	371	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> subsp. anaerobius	Type strain	○
8	9120	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Type strain	○
9	727	<i>Staphylococcus</i>	<i>capitis</i> subsp. <i>vreolyticus</i>	Type strain	×
10	287	<i>Staphylococcus</i>	<i>capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	Type strain	×
11	378	<i>Staphylococcus</i>	<i>caprae</i>	Type strain	×
12	384	<i>Staphylococcus</i>	<i>carnosus</i>	Type strain	×
13	380	<i>Staphylococcus</i>	<i>caseolyticus</i>	Type strain	×
14	482	<i>Staphylococcus</i>	<i>chromogenes</i>	Type strain	×
15	248	<i>Staphylococcus</i>	<i>cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Type strain	×
16	289	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	Type strain	×
17	509	<i>Staphylococcus</i>	<i>felis</i>	Type strain	×
18	290	<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	Type strain	×
19	485	<i>Staphylococcus</i>	<i>hominis</i>	Type strain	×
20	305	<i>Staphylococcus</i>	<i>hyicus</i>	Type strain	×
21	266	<i>Staphylococcus</i>	<i>intermedius</i>	Type strain	×
22	382	<i>Staphylococcus</i>	<i>kloosii</i>	Type strain	×
23	458	<i>Staphylococcus</i>	<i>lugdnensis</i>	Type strain	×
24	705	<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>	Type strain	×
25	181	<i>Staphylococcus</i>	<i>saccharolyticus</i>	Type strain	×
26	265	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	Type strain	×
27	11875	<i>Staphylococcus</i>	<i>shleiferi</i>	Type strain	×
28	292	<i>Staphylococcus</i>	<i>simulans</i>	Type strain	×
29	293	<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>	Type strain	×
30	294	<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Type strain	×

GTC : Gifu University Type Culture Collection

IX. 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。

X. 関連製品

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)
96well 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 はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Cycleave PCR 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