

製品コード CY230

食品・環境分析用

---

# Takara

**Cycleave RT-PCR *Cryptosporidium*  
(18S rRNA) Detection Kit**

---

説明書

v202412Da

クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*) は孢子虫類に属する原虫で、環境中では「オーシスト」と呼ばれる嚢包体の形 (大きさは4～6 μm) で存在し、ヒトや動物 (ウシ、ブタ、ネコ、イヌなど) の消化管の細胞に寄生することにより増殖し、激しい下痢症状を引き起こします。感染性を持ったオーシストが糞便中に大量に排出され、それにより汚染された食品や飲料水を介してヒトに経口感染します。オーシストは、水中では冷蔵で数ヵ月程度の生存が可能であり、塩素に対してもきわめて強い耐性があります。わが国では、クリプトスポリジウム感染症は5類感染症に分類され、厚生労働省は「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」を策定し、原水の安全性確認としてクリプトスポリジウム等および指標菌の検査が行われています。クリプトスポリジウムは人工培地で培養できないことから、検出方法として、蛍光顕微鏡により蛍光抗体染色したオーシストを観察する方法で原虫の確認が行われていますが、高度な技術と経験が必要とされています。

本製品は、クリプトスポリジウム 18S rRNA 遺伝子をターゲットとして、ゲノム DNA 上の遺伝子に加え、クリプトスポリジウム由来 RNA を逆転写した cDNA も検出するキットです。ゲノム DNA に対し RNA はコピー数が多いことが知られており、RNA を対象としたリアルタイム PCR 法 (リアルタイム RT-PCR 法) により、微量のクリプトスポリジウムを検出できます。リアルタイム PCR 法は、簡便性、迅速性、反応特異性の高さから、環境衛生管理において急速に普及しています。クリプトスポリジウム感染症への対策においても、有効活用されることが期待されています。

リアルタイム PCR 法において、増幅産物の検出に採用している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、遺伝子の特定配列を高い特異性を持って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、他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で、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。

本製品には、核酸抽出用の試薬と逆転写反応試薬が含まれています。増幅反応には、Hot Start PCR 用酵素の *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抑制し、高感度の検出が可能です。また、クリプトスポリジウム 18S rRNA 遺伝子を検出するための FAM 標識プローブの他に、インターナルコントロール DNA とインターナルコントロール DNA 検出用の ROX 標識プローブが含まれています。1本のチューブで二波長を同時にモニタリングすることで、クリプトスポリジウムの遺伝子の検出 (FAM) とインターナルコントロール DNA の検出 (ROX) による PCR 反応の可否が確認できます。リアルタイム検出のため、電気泳動が不要であり迅速に結果が得られます。

また、*Crypto. Positive Control* を用いて検量線を作成することで、サンプル中に含まれるクリプトスポリジウムの定量も可能です。

※ 厚生労働省健康局水道課長通知「健水発 0302 第2～4号」(平成24年3月2日発付)  
「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について」にリアルタイム PCR 等による遺伝子検出法が記載されました。

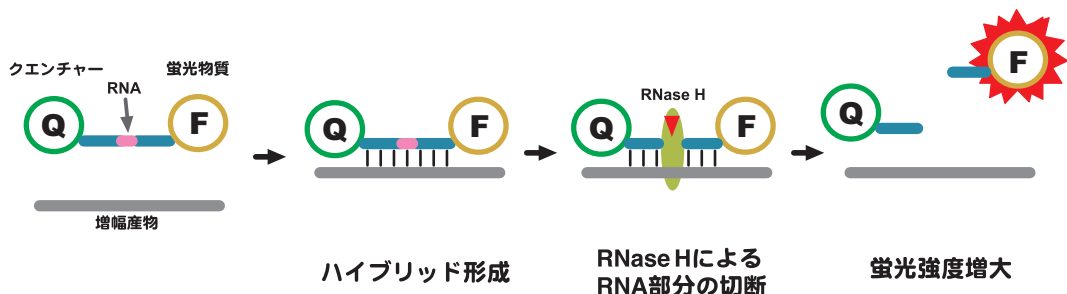


図1. サイクリングプローブ法の原理

## I. 内容 (50 回分、25 $\mu$ l 反応系)

● 1.	5 × PrimeScript™ RT Master Mix	5 × conc.	100 $\mu$ l
● 2.	2 × Cycleave Reaction Mixture	2 × conc.	625 $\mu$ l
● 3.	<i>Crypto.</i> Primer/Probe Mix (FAM, ROX)* <sup>1</sup>	5 × conc.	250 $\mu$ l
○ 4.	RNase Free dH <sub>2</sub> O		1 ml
● 5.	Lysis Buffer		625 $\mu$ l × 4
⊙ 6.	Proteinase K		50 $\mu$ l
⊙ 7.	dH <sub>2</sub> O (for Dilution)		150 $\mu$ l
● 8.	<i>Crypto.</i> Positive Control* <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>5</sup> copies/ $\mu$ l	50 $\mu$ l
● 9.	EASY Dilution (for Real Time PCR)		1 ml × 2

\* 1 : 蛍光標識プローブを含んでいますので、遮光してください。

\* 2 : リアルタイム PCR コンポーネント (1 ~ 4) に誤って混入すると、正しい検出反応を行うことができなくなります。開封後は、リアルタイム PCR コンポーネント (1 ~ 4) を付属のキットケースに移し、別に保存してください。

### 【コンポーネントの説明】

#### **5 × PrimeScript RT Master Mix :**

逆転写反応試薬です。反応に必要な酵素、Buffer、dNTP Mixture 等を含みます。粘性が高いため、泡立てないようにゆっくりリピペティングにより、反応液をよく混合してください。

#### **2 × Cycleave Reaction Mixture :**

リアルタイム PCR 反応試薬です。反応に必要な酵素、Buffer、dNTP Mixture を含みます。解凍後、よく混和してご使用ください。泡立てると、酵素が失活する恐れがありますのでご注意ください。

#### ***Crypto.* Primer/Probe Mix (FAM, ROX) :**

クリプトスポリジウム検出用プライマー／プローブの混合液です。インターナルコントロール DNA\*<sup>3</sup> およびインターナルコントロール DNA 検出用プライマー／プローブを含みます。それぞれのプライマーにより、クリプトスポリジウムの 18S rRNA 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クリプトスポリジウムの 18S rRNA 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。

#### **\* 3 : インターナルコントロール DNA**

PCR 反応の可否判定を目的とした、クリプトスポリジウム遺伝子 (ターゲット) とは無関係な配列を有する DNA 分子です。ターゲット遺伝子が検出されない場合でも、インターナルコントロール DNA の検出ができていれば、PCR 反応に阻害等の問題がないことが判断でき、ターゲット遺伝子は検出限界以下と判定できます。ターゲット遺伝子、インターナルコントロール DNA のどちらも検出されない場合、PCR 反応に何らかの問題があり、反応が正常に進まなかったと判定できます。

なお、ターゲット遺伝子の DNA 量が多い場合は、ターゲット遺伝子の増幅が優先され、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れる、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ことがあります。この場合にも、ターゲット遺伝子の検出は正しくなされており、陽性であると判定できます。

**RNase Free dH<sub>2</sub>O :** 逆転写反応液の調製と PCR 反応液の調製に使用します。

---

**Lysis Buffer :**

核酸抽出用試薬です。「VI. サンプルの調製例 [ 核酸の抽出 ]」で使用します。  
組成：40 mM NaCl、0.2% Triton X-100、4 mM DTT を含む TE Buffer

**Proteinase K :**

核酸抽出用試薬です。「VI. サンプルの調製例 [ 核酸の抽出 ]」で使用します。  
使用直前に、dH<sub>2</sub>O (for Dilution) で 4 倍希釈して使用します。

**dH<sub>2</sub>O (for Dilution) :**

核酸抽出用試薬です。「VI. サンプルの調製例 [ 核酸の抽出 ]」で Proteinase K の希釈に使用します。

**Crypto. Positive Control :**

クリプトスポリジウム遺伝子検出用陽性コントロール、および検量線作成用のスタンダードとして使用します。プラスミド DNA のため、逆転写反応は不要です。

**EASY Dilution (for Real Time PCR) :**

検量線作成用のスタンダードサンプルを調製する際の鋳型 DNA 希釈用溶液です。鋳型 DNA を滅菌精製水や TE で希釈すると、チューブへの吸着などにより正確な希釈ができない場合がありますが、本製品を使用すると低濃度までの正確な希釈が可能となります。また、本製品は、キャリアーとして tRNA や rRNA などの核酸を使用していませんので、それらの配列に起因する非特異的増幅の問題が生じることもありません。

**II. 保存**      - 20°C**III. 本製品以外に必要な機器、器具、試薬 (主なもの)**

- ・リアルタイム PCR 装置および専用チューブ  
Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (製品コード TP1010)  
Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (製品コード TP970)  
Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960 : 終売)  
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760 : 終売)  
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
- ・卓上遠心器
- ・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)
- ・サンプル調製に必要な試薬、器具 (VI. サンプルの調製例を参照)

---

## IV. 使用に際して

**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。**

1. 使用目的：本製品は環境分析に使用する製品です。
2. 測定結果：本製品は遺伝子検出を行うため、死んでいる原虫も検出されます。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。陽性と判定されたサンプルについては、専門家に相談し、適切に対応されることを推奨します。必要に応じて、陽性サンプルは顕微鏡検査も行ってください。  
(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。)
3. 廃棄：河川等の環境試料中には原虫以外に、細菌、ウイルス等による汚染も考えられますので、反応前の試料は感染性を疑い、各施設の安全規定に従って取り扱ってください。作業区域は常に清潔に保ち、白衣、マスク、手袋、ゴーグル等を使用し、必要に応じて検体や器材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。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチックなどの試薬容器ならびに器材は、廃棄物の処理および清掃に関する各自治体の条例等に従って処理してください。

## 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、正確な検出ができません。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 (X. 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。検量線作成用スタンダードサンプルの希釈・調製もここで行ってください。本製品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. 本製品はリアルタイム 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. サンプルの調製例 (エリア 2 で実施)

操作にあたっては、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。サンプルがチューブキャップなどに付着している場合は、適宜スピンドウンを行ってから操作してください。

なお、下記に示す試料水の濃縮～オーシストの分離・精製の方法は、厚生労働省健康局水道課長通知「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」(平成 19 年 3 月 30 日健水発第 033006 号)、「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について」(平成 24 年 3 月 2 日健水発第 0302 第 2～4 号)に記載されたサンプル調製方法に準じています。

### [ 試料水の濃縮 ]

上記通知添付 3 の「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験方法」に記載されている方法に従い、採取水量は、原水の場合で概ね 10 L、水道水で 20 L を標準として、アセトン溶解性メンブレンフィルター吸引濾過法あるいは加圧濾過法、親水性 PTFE メンブレンフィルター法などにより、最終的に約 10 ml の溶液を調製する。

### [ クリプトスポリジウムのオーシストの分離・精製 ]

試料水の濃縮溶液中に多量の夾雑物が含まれている場合に、クリプトスポリジウムのオーシストを選択的に分離して精製する方法として免疫磁気ビーズ法がある。クリプトスポリジウムおよびジアルジアを分離精製できる Dynabeads GC-combo (ベリタス社) などを利用してビーズ/オーシスト複合体を調製する。

注：夾雑物を含むサンプルは、逆転写反応およびリアルタイム PCR を阻害する可能性があります。免疫磁気ビーズにオーシストが結合した状態で繰り返し洗浄を行い、夾雑物を完全に除去してください。

### [ ビーズ/オーシスト複合体からの核酸の解離 ]

- (1) 免疫磁気ビーズ濃縮法によるビーズ/オーシスト複合体に、0.01% Tween 80 を含む 0.1 M 塩酸を 50  $\mu$ l 加え、Vortex を 10 秒間行い、10 分間静置する。
- (2) 10 秒間 Vortex で激しく混合後、軽く遠心して液をチューブの底に落とす。
- (3) 磁石付きスタンドに取り付け 10 秒間静置し、ビーズを集める。
- (4) オーシストを含む上清を新しい 1.5 ml チューブに回収する。
- (5) 上清を除いたビーズ入りチューブに、再度 0.01% Tween 80 を含む 0.1 M 塩酸を 50  $\mu$ l 加え、Vortex を 10 秒間行い激しく混和する。
- (6) 磁石付きスタンドに取り付け 10 秒間静置し、上清を 1 回目の回収液 (4) に加える。
- (7) 回収した試料 100  $\mu$ l に 1 M 水酸化ナトリウム溶液を 10  $\mu$ l 添加し試料を中和する。
- (8) さらに TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、1 mM EDTA) を 200  $\mu$ l 添加し、12,000 rpm 3 分間遠心する。上清 260  $\mu$ l\*1 を除いた後、残りの 50  $\mu$ l を核酸抽出用サンプルとして使用する。本製品での反応を直ちに実施しない場合は、核酸抽出用サンプルは冷凍保存 (-20℃以下) する。

\* 1：顕微鏡観察を並行して実施する場合は上清 210  $\mu$ l を除いた後、残りの 100  $\mu$ l を懸濁し、半量の 50  $\mu$ l ずつをそれぞれ核酸抽出用サンプルと顕微鏡観察用サンプルに使用してください。



---

### [ 核酸の抽出 ]

- (1) 核酸抽出用サンプル 50  $\mu$ l について、 $-80^{\circ}\text{C}$ と  $37^{\circ}\text{C}$ の凍結融解操作を 5 回繰り返す。
- (2) 49  $\mu$ l の Lysis Buffer\*<sup>2</sup>と、dH<sub>2</sub>O (for Dilution)\*<sup>2,3</sup>で 4 倍希釈した Proteinase K\*<sup>2,3</sup>を 1  $\mu$ l 添加し、10 分ごとにタッピング混和を行いながら  $60^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートする。
  - \* 2 : 本製品に含まれます。
  - \* 3 : Proteinase K 溶液の希釈は、用時調製してください。
- (3) 超音波処理を 2 分間行う。
- (4)  $75^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートしてオーシストの溶解を促進し、軽く遠心する。
- (5)  $95^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベート後、氷上で冷却する。この溶液をサンプル核酸溶液として使用する。  
直ちに反応しない場合は、冷凍 ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) で保存が可能である。

### < 調製上の注意 >

リアルタイム 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の防止にはご注意ください。

- 例) 可能な限り、使い捨て器具を使用する (採水容器など)。  
使い捨てにできないものは、洗浄後、乾熱滅菌処理を施す (ピンセットなど)。  
マイクロピペットは用途別に準備する (リアルタイム PCR 試薬調製用、サンプル調製用を分ける)。

核酸 (特に RNA) の調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は清潔なマスクおよびディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。  
実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用するようにし、実験台、実験器具などの RNase 除去には RNase-OFF<sup>®</sup> (製品コード 9037) の使用をお勧めします。また、RNA 実験に使用する器具 (プラスチックおよびガラス) は、他の器具と区別して RNA 専用としてください。

## VII. + / - 判定の解析

※定量解析 (オプション) は、18 ページをご参照ください。

### 操作

1. サンプルの調製 (VI. サンプルの調製例を参照)
2. 逆転写反応
3. リアルタイム PCR 装置のセッティング
4. 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 (RNase Free dH<sub>2</sub>O)、検体サンプル、または陽性コントロール (*Crypto. Positive Control*) を添加  
↓  
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。  
↓
5. 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**

### VII-1. 逆転写反応

判定の信頼性を高めるため、n=2 以上の反応を推奨します。

- (1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

検体サンプル核酸溶液以外の下記反応液を測定サンプル数 +  $\alpha$  分調製し、0.2 ml のマイクロチューブに分注する。

試薬	液量 (1 反応)	終濃度
5 × PrimeScript RT Master Mix	2 $\mu$ l	1 ×
サンプル核酸溶液*1	1 ~ 5 $\mu$ l	
RNase Free dH <sub>2</sub> O *1	up to 10 $\mu$ l	

\*1: サンプル核酸溶液は 1 ~ 5  $\mu$ l の範囲で変更可能です。添加するサンプル核酸溶液の量にあわせて、最終反応液量が 10  $\mu$ l となるように RNase Free dH<sub>2</sub>O の量を調節してください。

検体の水質またはサンプル核酸溶液の純度が低い場合は反応阻害を起こす可能性があります。そのような場合は添加する核酸溶液を減らしてください。または、さらにサンプル核酸溶液の精製を行ってください。

- (2) 検体サンプル核酸溶液を添加する。(エリア 3 で実施)

- (3) 以下の条件で逆転写反応を行う。サーマルサイクラーを使用すると便利である。

37°C 15 分 (逆転写反応)  
85°C 5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)  
4°C

反応終了後の逆転写反応液は、- 20°C で凍結保存が可能である。



## VII-2. リアルタイム PCR 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クリプトスポリジウムの18S rRNA 遺伝子とインターナショナルコントロール DNA 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、検体サンプル以外に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\*<sup>2</sup> +  $\alpha$ 分調製し、0.2 ml のマイクロチューブに 23  $\mu$ 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 RNase Free dH<sub>2</sub>O を 2  $\mu$ l 加え、しっかりとふたをする。

試薬	液量 (1 反応)	終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 $\mu$ l	1 ×
<i>Crypto.</i> Primer/Probe Mix (FAM, ROX)	5.0 $\mu$ l	1 ×
RNase Free dH <sub>2</sub> O	5.5 $\mu$ l	
(検体サンプル (逆転写反応液) または <i>Crypto.</i> Positive Control) または RNase Free dH <sub>2</sub> O)* <sup>3</sup>	(2 $\mu$ l)* <sup>3</sup>	
Total	25 $\mu$ l	

\* 2 : 検体サンプル数 + 2 本 (陰性コントロール反応、陽性コントロール反応)

\* 3 : 検体サンプルまたは *Crypto.* Positive Control はステップ (2) で加えるため、ここでは加えないでください。

逆転写反応液をリアルタイム PCR の系に持ち込む量は、PCR 反応液容量の 10% までとしてください。

注：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。

(2) 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 (逆転写反応液) または *Crypto.* Positive Control をそれぞれ 2  $\mu$ l 添加し、しっかりとふたをする。0.2 ml のマイクロチューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

注：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。

### VII-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出

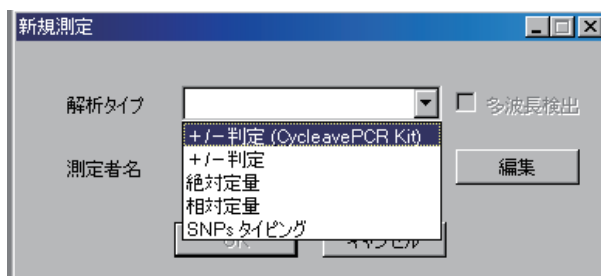
操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、各装置の取扱説明書をご確認ください。

ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ)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)>を選択し OK ボタンをクリックする。



- \* 4： +/-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。

- (2) “反応条件設定”画面で PCR 条件を設定する。

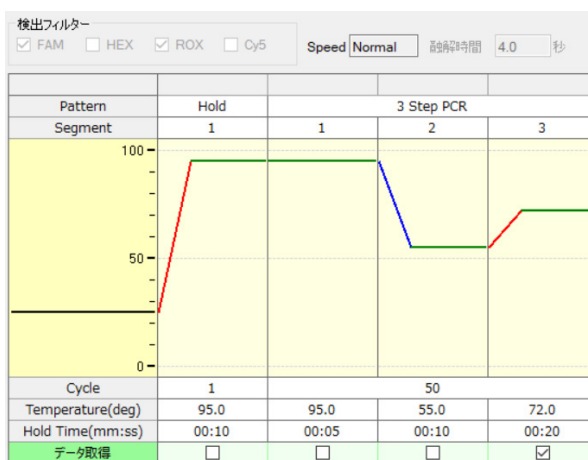
初期変性 (Hold)

Cycle : 1  
95°C 10 秒

3 step PCR

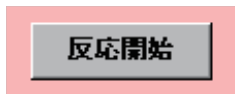
Cycle : 50\*5  
95°C 5 秒  
55°C 10 秒  
72°C 20 秒 (データ取得)

- \* 5：デフォルトでは 45 となっているので、50 に変更してください。



- 注：“Speed” は、Thermal Cycler Dice Real Time System IV (製品コード TP1010) や III (製品コード TP970) の場合は Normal に、Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900:終売)や Lite (製品コード TP700:終売)では Fast に設定します。食品環境検査用ソフトウェアをご使用の場合、Speed の設定は初期設定のまま、ご使用いただけます。

- (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。



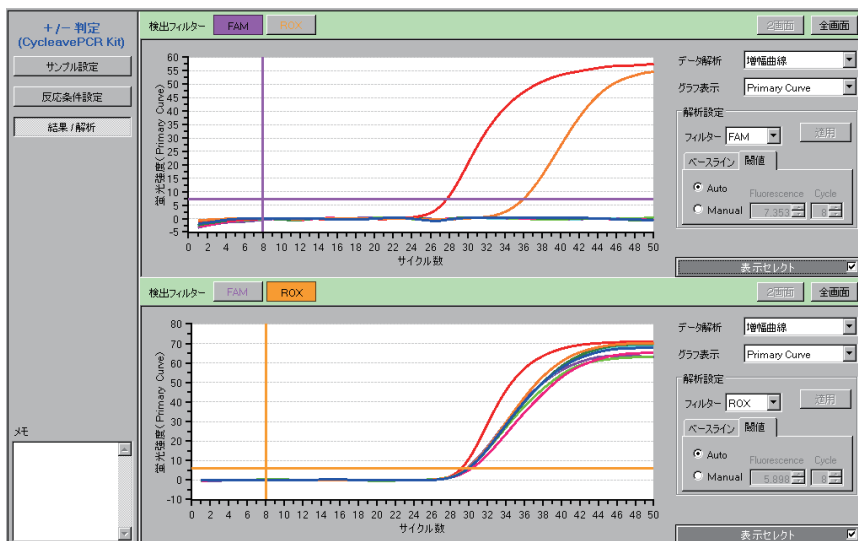
- (4) “サンプル設定”画面で“入力”ボタンをクリックしウェル情報設定を行う。反応に使用しないウェルはOmit設定する。



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(変更不可)。

- (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。



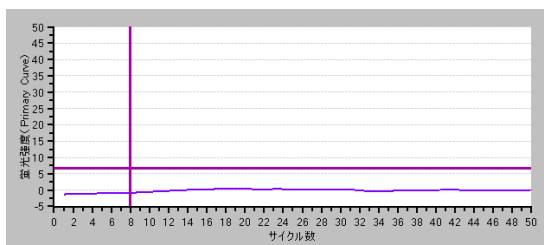
2画面の上部にクリプトスポリジウム検出のFAMフィルターの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール(IC)検出のROXフィルターの増幅曲線が、表示される(閾値はAutoで表示)。

- NC (陰性コントロール)、PC (陽性コントロール: *Crypto.* Positive Control) の増幅曲線を確認する。

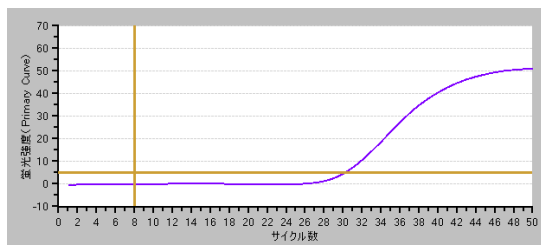
- NC の増幅曲線の表示: 表示セレクトで <N> を選択

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  
(クリプトスポリジウム検出)



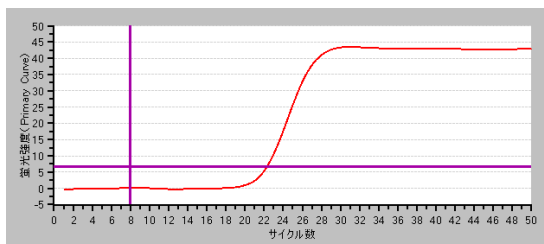
ROX フィルター  
(IC 検出)



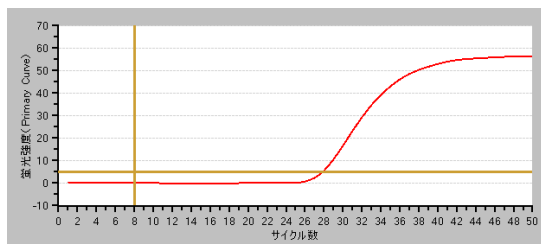
- PC の増幅曲線の表示: 表示セレクトで <P> を選択

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  
(クリプトスポリジウム検出)



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、検体サンプルの増幅曲線を確認する。

注: 結果を解析する際は、正規化補正を OFF にしてください。正規化補正の設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください。  
(<https://catalog.takara-bio.co.jp>)

- (6) 結果の表示  
データ解析<判定結果>を選択する。

The screenshot shows a software interface with a table and a dropdown menu. The table has columns numbered 1 to 12 and rows labeled A to H. The dropdown menu is set to '判定結果' (Judgment Result). The table content is as follows:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					OK	Posi.	Posi.					
B					Nega.	Posi.	Posi.					
C					Nega.	Posi.	Posi.					
D					Nega.	Posi.	Posi.					
E					Nega.	Posi.	OK					
F					Posi.	Posi.						
G					Nega.	Posi.						
H					Nega.	Nega.						

#### 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 : 反応が正常に進んだ。
- OUT : 反応に問題があった。

#### 検体サンプル<U>の表示

- Posi. : クリプトスポリジウム遺伝子の検出が陽性
- Nega. : クリプトスポリジウム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、クリプトスポリジウム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。
  - クリプトスポリジウム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) 陽性コントロール反応において、総合判定解析が「OUT」となった。
  - クリプトスポリジウム遺伝子 (FAM)、インターナルコントロール (ROX) と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、クリプトスポリジウム遺伝子 (FAM) では増幅曲線が得られなかった。  
→ *Crypto. Primer/Probe Mix* に問題がある、または、*Crypto. Positive Control* 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。
  - クリプトスポリジウム遺伝子 (FAM)、インターナルコントロール (ROX) と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 】

- (1) Experiment Properties 画面設定を行う。
  - ・ Quantitation-Standard Curve を選択する。
  - ・ TaqMan Reagents または Other を選択する。
- (2) Plate Setup の Define Target で Target name を 2 種設定する。
  - ・ *Cryptosporidium* : Reporter を FAM、Quencher を None と設定する。
  - ・ IC : Reporter を ROX、Quencher を None と設定する。
- (3) Define Sample にて NC、Positive Control と検体サンプルを設定する。
- (4) 作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。  
Passive Reference は (none) にする。

The screenshot displays the software interface for setting up a PCR plate. On the left, there are three panels for assigning targets, samples, and biological groups. The main area shows a 'View Plate Layout' window with a 12x8 grid (rows A-H, columns 1-12). The grid is populated with various well assignments: Row D, Column 3 is 'NC' (Negative Control); Row D, Columns 4-8 are 'Sample...' (Sample 1); Row D, Column 9 is 'PC' (Positive Control); Row D, Columns 10-12 are 'IC' (Internal Control). The status bar at the bottom indicates 'Wells: 7 Unknown, 0 Standard, 1 Negative Control' and '88 Empty'.

Assign	Target	Task	Quar
<input checked="" type="checkbox"/>	Crypto	U S N	
<input checked="" type="checkbox"/>	IC	U S N	

Assign	Sample
<input checked="" type="checkbox"/>	NC
<input type="checkbox"/>	Sample 1(DNA-5)
<input type="checkbox"/>	Sample2(DNA-4)

Assign	Biological Group

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B											
C											
D		NC N Cry... N ic	NC U Cry... U ic	Sample... U Cry... U ic	Sample... U Cry... U ic	Sample... U Cry... U ic	Sample... U Cry... U ic	Sample... U Cry... U ic	Sample... U Cry... U ic	PC U Cry... U ic	
E											
F											
G											
H											

Wells: 7 Unknown 0 Standard 1 Negative Control 88 Empty

(5) Instrument タブを選択し、反応条件を設定する。

初期変性 (Hold)

Cycle : 1

95°C 10 秒

3 step PCR

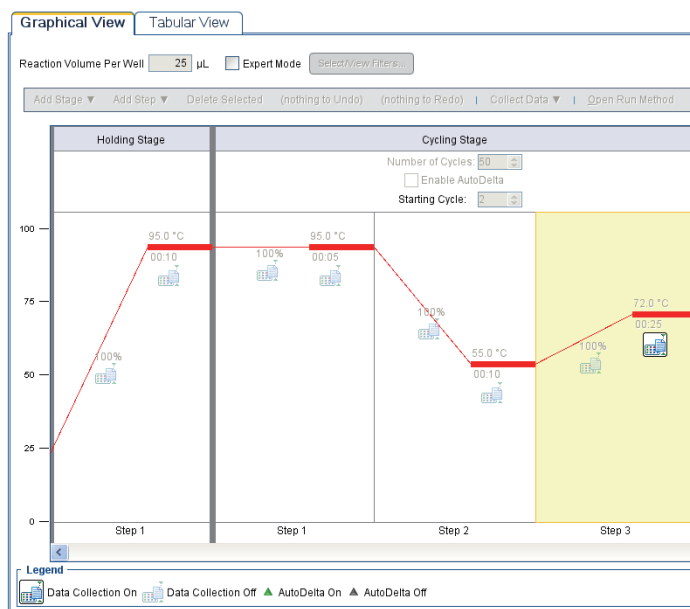
Cycle : 50

95°C 5 秒

55°C 10 秒

72°C 25 秒\*6 (データ取得)

\* 6 : データ取得には 25 秒必要です。

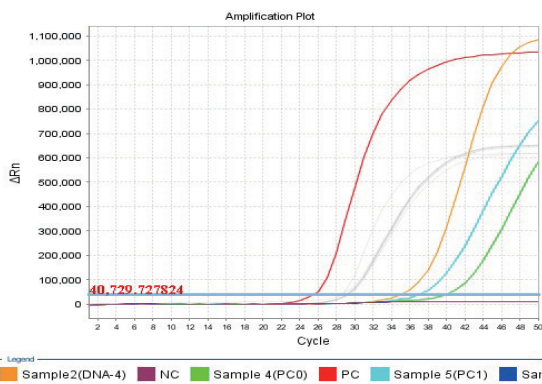


(6) 反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。

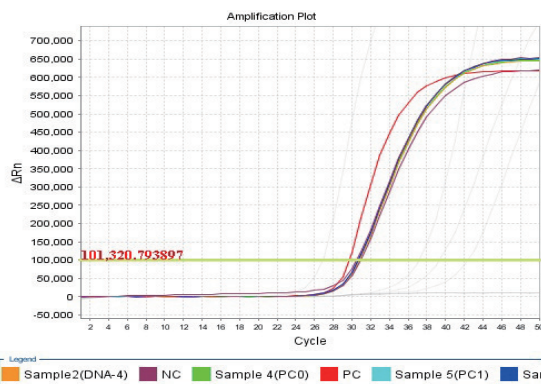
(7) 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線を確認する。

※ Threshold、Baseline は必要に応じて Manual に設定してください。

クリプトスポリジウム検出 (FAM)



IC 検出 (ROX)





(8) View Well Table タブをクリックし、クリプトスポリジウム検出の有無を確認する。

#	Well	Sample Name	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean
[-] NC							
1	D3	NC	Cryp	NTC	FAM-None	Undetermi...	
2	D3	NC	IC	NTC	ROX-None	30.978	30.978
3	D4	NC	Cryp	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...	
4	D4	NC	IC	UNKNOWN	ROX-None	30.546	30.546
[-] PC							
5	D10	PC	Cryp	STANDARD	FAM-None	25.696	25.696
6	D10	PC	IC	STANDARD	ROX-None	29.698	29.698
[-] Sample 1(DNA-5)							
7	D5	Sample 1(DNA-5)	Cryp	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...	
8	D5	Sample 1(DNA-5)	IC	UNKNOWN	ROX-None	30.722	30.722
[-] Sample 4(PC0)							
9	D7	Sample 4(PC0)	Cryp	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...	40.055
10	D7	Sample 4(PC0)	IC	UNKNOWN	ROX-None	30.823	30.803
11	D8	Sample 4(PC0)	Cryp	UNKNOWN	FAM-None	40.055	40.055
12	D8	Sample 4(PC0)	IC	UNKNOWN	ROX-None	30.784	30.803
[-] Sample 5(PC1)							
13	D9	Sample 5(PC1)	Cryp	UNKNOWN	FAM-None	37.178	37.178
14	D9	Sample 5(PC1)	IC	UNKNOWN	ROX-None	30.773	30.773
[-] Sample 2(DNA-4)							

※ StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) 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-4. 判定結果表

<検体サンプルを測定した結果>

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 (クリプトス ポリジウム) 検出	増幅シグナル (+)	陽性*7	陽性*7
	増幅シグナル (-)	検出限界以下*8	判定不能*9

判定結果表 2：陽性コントロール (*Crypto. 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 (クリプトス ポリジウム) 検出	増幅シグナル (+)	クリプトスポリジウム 検出系に問題なし	クリプトスポリジウム 検出系に問題なし
	増幅シグナル (-)	クリプトスポリジウム 検出系に問題あり*10	判定不能*9

判定結果表 3：陰性コントロール (RNase Free dH<sub>2</sub>O 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 (クリプトス ポリジウム) 検出	増幅シグナル (+)	コンタミネーションの疑い*11	コンタミネーションの疑い*11
	増幅シグナル (-)	コンタミネーションなし	判定不能*9

- \* 7：インターナルコントロールの (+) / (-) に関らず、クリプトスポリジウム由来 18S rRNA 遺伝子が陽性です。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してください。
- \* 8：陽性コントロール反応の結果で (+) となり反応系に問題がないことを確認してください。
- \* 9：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ません。再反応を行ってください。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です。
- \* 10：クリプトスポリジウム由来 18S rRNA 遺伝子検出増幅用プライマーあるいはプローブに問題があるか、*Crypto. Positive Control* が分解しています。
- \* 11：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ってください。

### VIII. *Crypto*. Positive Control を使用した定量解析〈オプション〉

※ + / - 判定の解析は、8 ページをご参照ください。

本製品添付の *Crypto*. Positive Control はクリプトスポリジウムの 18S rRNA 遺伝子領域を搭載したプラスミド DNA で、OD<sub>260</sub> 値からの換算値で  $1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ l に調整されています。EASY Dilution (for Real Time PCR) を用いて *Crypto*. Positive Control の 10 倍段階希釈系列を作製し、スタンダードサンプルとして用いて検量線を作成することで、定量解析が可能です。

1. サンプルの調製 (VI. サンプルの調製例を参照)
2. 逆転写反応
3. リアルタイム PCR 装置のセッティング
4. 反応液の調製と反応開始  
    反応液を調製  
    ↓  
    *Crypto*. Positive Control を段階希釈して検量線作成用スタンダードサンプルを調製  
    ↓  
    反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール (RNase Free dH<sub>2</sub>O)、検体サンプル、または検量線作成用スタンダードサンプルを添加  
    ↓  
    反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットして反応を開始  
    ↓
5. 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  
    ↓  
    検量線から検体サンプルのコピー数 (プラスミド換算値) を求める。

#### VIII-1. 逆転写反応 (判定の信頼性を高めるため、n=2 以上の反応を推奨)

- (1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

検体サンプル核酸溶液以外の下記反応液を測定サンプル数 +  $\alpha$  分調製し、0.2 ml のマイクロチューブに分注する。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
5 × PrimeScript RT Master Mix	2 $\mu$ l	1 ×
サンプル核酸溶液* <sup>1</sup>	1 ~ 5 $\mu$ l	
RNase Free dH <sub>2</sub> O* <sup>1</sup>	up to 10 $\mu$ l	

\* 1: サンプル核酸溶液は 1 ~ 5  $\mu$ l の範囲で変更可能です。その場合、添加するサンプル核酸溶液の量にあわせて、最終反応液量が 10  $\mu$ l となるように RNase Free dH<sub>2</sub>O の量を調節してください。  
検体の水質またはサンプル核酸溶液の純度が低い場合は反応阻害を起こす可能性があります。そのような場合は添加する核酸溶液を減らしてください。または、さらにサンプル核酸溶液の精製を行ってください。

- (2) サンプル核酸溶液を添加する。(エリア 3 で実施)

- (3) 以下の条件で逆転写反応を行う。サーマルサイクラーを使用すると便利である。

37°C 15 分 (逆転写反応)  
85°C 5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)  
4°C

反応終了後の逆転写反応液は、- 20°C で凍結保存が可能である。

## VIII-2. リアルタイム PCR 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クリプトスポリジウムの18S rRNA 遺伝子とインターナルコントロール DNA 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、検体サンプル以外に検量線作成用のスタンダードサンプ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下記反応液を必要本数\*2 + a分調製し、0.2 mlのマイクロチューブに23  $\mu$ 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、RNase Free dH<sub>2</sub>Oを2  $\mu$ l加えしっかりとふたをする。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 $\mu$ l	1 ×
<i>Crypto</i> . Primer/Probe Mix (FAM, ROX)	5.0 $\mu$ l	1 ×
RNase Free dH <sub>2</sub> O	5.5 $\mu$ l	
(検体サンプル (逆転写反応液) または検量線作成用スタンダードサンプル または RNase Free dH <sub>2</sub> O) ) *3	(2 $\mu$ l)	
Total	25 $\mu$ l	

\* 2: 検体サンプル数+検量線作成用スタンダードサンプル数+陰性コントロール数

\* 3: 検体サンプル等の鋳型はステップ (3) で加えるため、ここでは加えません。

注: 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。

(2) *Crypto*. Positive Control を用いて、検量線作成用スタンダードサンプルの段階希釈液を調製する。(エリア3で実施)

EASY Dilution (for Real Time PCR) で以下の2.~6.の濃度の段階希釈液を調製する。(1反応にはそれぞれ2  $\mu$ lを使用。n=2以上の反応を推奨)

- |    |   |
|----|---|
| 1. | 1 × 10 <sup>5</sup> copies/ $\mu$ l ( <i>Crypto</i> . Positive Control 原液)  |
| 2. | 1 × 10 <sup>4</sup> copies/ $\mu$ l ( <i>Crypto</i> . Positive Control 原液 5 $\mu$ l + EASY Dilution 45 $\mu$ l)       |
| 3. | 1 × 10 <sup>3</sup> copies/ $\mu$ l (2.の 1 × 10 <sup>4</sup> copies/ $\mu$ l 溶液 5 $\mu$ l + EASY Dilution 45 $\mu$ l) |
| 4. | 1 × 10 <sup>2</sup> copies/ $\mu$ l (3.の 1 × 10 <sup>3</sup> copies/ $\mu$ l 溶液 5 $\mu$ l + EASY Dilution 45 $\mu$ l) |
| 5. | 10 copies/ $\mu$ l (4.の 1 × 10 <sup>2</sup> copies/ $\mu$ l 溶液 5 $\mu$ l + EASY Dilution 45 $\mu$ l)                  |
| 6. | 1 copy/ $\mu$ l (5.の 10 copies/ $\mu$ l 溶液 5 $\mu$ l + EASY Dilution 45 $\mu$ l)                                      |

(3) 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 (逆転写反応液) または検量線作成用スタンダードサンプルをそれぞれ2  $\mu$ l添加し、しっかりとふたをする。0.2 mlのマイクロチューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

注: 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。

### VIII-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出

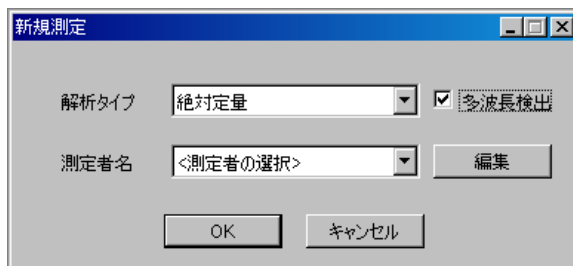
操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、各装置の取扱説明書をご確認ください。

ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ) を使用した場合の、簡単な操作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「絶対定量」を選択し、多波長検出に☑を入れ、OK ボタンをクリックする。



- (2) “反応条件設定”画面で PCR 条件を設定する。

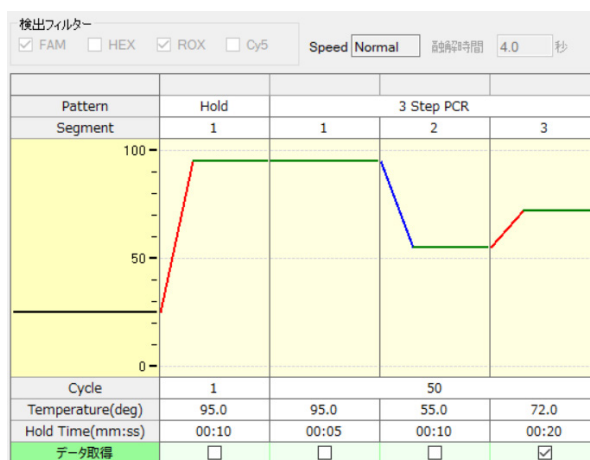
初期変性 (Hold)

Cycle : 1  
95°C 10 秒

3 step PCR

Cycle : 50 \*4  
95°C 5 秒  
55°C 10 秒  
72°C 20 秒 (データ取得)

\* 4 : デフォルトでは 45 となっているので、50 に変更してください。



注：“Speed”は、Thermal Cycler Dice Real Time System IV (製品コード TP1010) や III (製品コード TP970) の場合は Normal に、Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900:終売) や Lite (製品コード TP700:終売) では Fast に設定します。食品環境検査用ソフトウェアをご使用の場合、Speed の設定は初期設定のまま、ご使用いただけます。

- (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。

The screenshot displays the 'Absolute Quantification Multiplex' software interface. On the left, there are tabs for 'Sample Setting', 'Reaction Condition Setting', and 'Result/Analysis'. The main area is a 9x8 grid of wells (A-I, 1-8). Each well contains a sample type and a concentration value. For example, well A4 contains 'NTC FAM' and '1'. Well A6 contains 'UNKN FAM' and '8'. A 'Well Information Setting' dialog box is open over well A6, showing fields for 'Sample Name', 'Sample Type' (set to UNKN), 'Target Setting' (set to 8), 'Replicate Setting' (set to 4), and 'Quantification Line Setting' (set to 0.00E+000). The 'Omit' checkbox is unchecked.

#### サンプルタイプ設定

設定するウェルを選択し、サンプルタイプをドロップダウンメニューから選択する。

- UNKN [Unknown] : 測定対象である検体サンプル
- STD [Standard] : 検量線作成用のスタンダードサンプル
- NTC [No Template Control] : 鋳型なしの陰性コントロール反応

#### レプリケート設定

同一の反応を行うウェルを選択して、レプリケートマーク 1、2、3、4・・・を指定する。  
連続設定機能により、連続入力が可能です。

#### 検量線設定

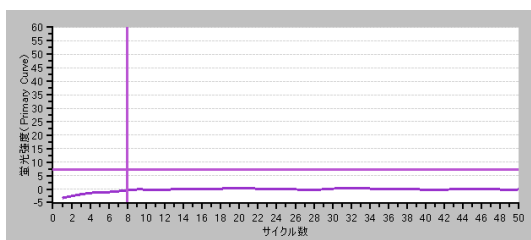
1. 最小または最大の初期鋳型量\*5のウェルを選択し、ボックス内に初期鋳型量を入力する。
2. “連続設定”ボタンをクリックする。
3. ドロップダウンメニューから、希釈倍率を選択する。
4. 次の濃度のウェルをクリックすると、最初の数値に倍率を掛けた数値が入力される。
5. 設定を解除するには、再度“連続設定”ボタンをクリックする。

\* 5：初期鋳型量は、反応液中に含まれるコピー数を入力してください。

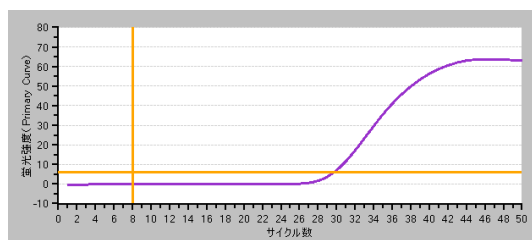
## (5) 結果解析

1. 反応終了後、“結果／解析” ボタンをクリックする。  
検出フィルターのFAM ボタンをクリックすると、クリプトスポリジウム検出の増幅曲線が、検出フィルターのROX ボタンをクリックすると、インターナルコントロール DNA (IC) 検出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)、STD (検量線スタンダードサンプル) 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 (クリプトスポリジウム検出)

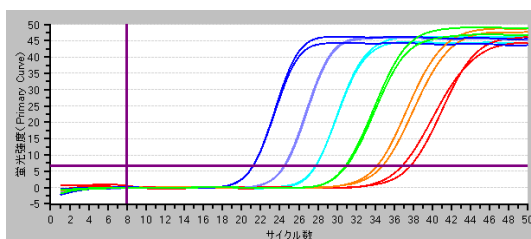


ROX フィルター (IC 検出)

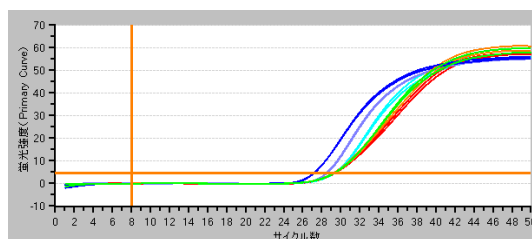


- STD (検量線スタンダードサンプル) の増幅曲線の表示：表示セレクトで < S > を選択  
FAM フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、ROX フィルターにおいても増幅曲線が描かれ、閾値を超えていることを確認する。

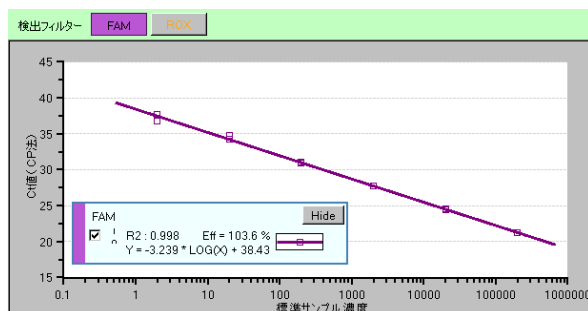
FAM フィルター (クリプトスポリジウム検出)



ROX フィルター (IC 検出)



3. 検体サンプルの結果を、表示セレクトで < U > を選択し増幅曲線を確認する。
4. 検量線確認  
データ解析のドロップダウンメニューから検量線を選択する。





必要に応じて、検量線より外れている測定値は Omit 設定を行う。

1. 表示セレクトで Omit するウェルを選択する。
2. 右クリックし、Omit → Set を選択すると、選択したウェルが解析より除外できる。Omit → Reset を選択すると、再度解析に使用することが可能となる。

注：結果を解析する際は、正規化補正を OFF にしてください。正規化補正の設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください。  
(<https://catalog.takara-bio.co.jp>)

## (6) 結果の表示

### テキストレポート表示

1. データ解析からテキストレポートを選択すると、グラフ表示領域にテキストレポートが表示できる。
2. 表示セレクトで表示させるウェルを選択する。
3. 表示形式で、表示させるデータセットを選択する。  
 ウェル : 個々のウェルに関する解析結果  
 レプリケート : レプリケート (ターゲットとサンプルの組み合わせが同一のグループ) ごとの解析結果 (平均値や標準偏差など)  
 全選択 : すべての解析結果を表示
4. 表示項目のチェックボックスでその下の詳細項目リストに表示させる項目を選択する。  
 CP 法データ : Crossing Point 法による解析結果の項目
5. 詳細項目リストの各項目のチェックボックスよりテキストレポートへの表示/非表示の変更ができる。
6. テキストレポートの項目名をクリックすると、クリックした項目でソートできる。

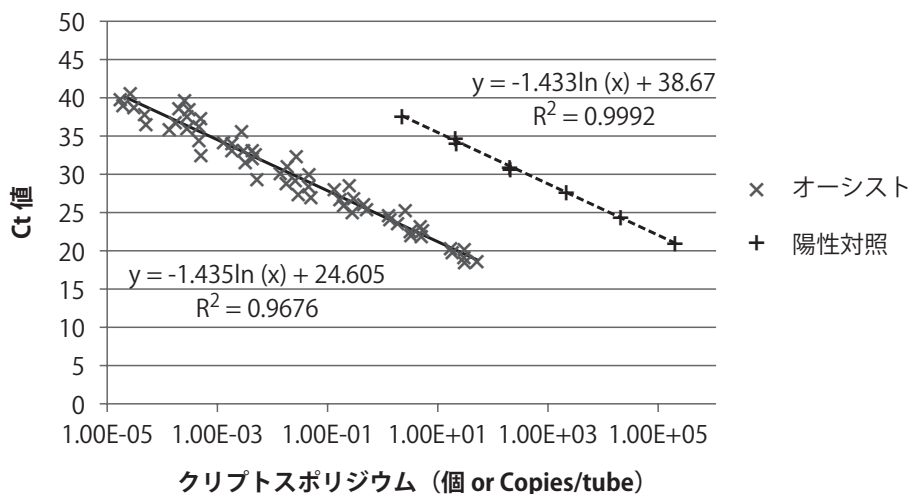
### 表示例)

検出フィルター		FAM	ROX				
サンプルタイプ	レプリケート名	Ct値 (CP)	平均Ct値 (CP)	標準サンプル濃度	定量値 (CP)	定量平均値 (CP)	
NTC	NC	-	-	-	-	-	
NTC	NC	-	-	-	-	-	
UNKN	Sample1	38.51	38.61	-	1.692E+000	1.586E+000	
UNKN	Sample1	38.71	38.61	-	1.481E+000	1.586E+000	
UNKN	Sample2	27.13	27.19	-	3.291E+003	3.165E+003	
UNKN	Sample2	27.25	27.19	-	3.038E+003	3.165E+003	
STD		41.35	38.62	2.000E+000	2.556E-001	2.806E+000	
STD		37.69	38.62	2.000E+000	2.920E+000	2.806E+000	
STD		34.76	34.48	2.000E+001	2.052E+001	2.525E+001	
STD		34.19	34.48	2.000E+001	2.998E+001	2.525E+001	
STD		30.87	30.94	2.000E+002	2.732E+002	2.618E+002	
STD		31.00	30.94	2.000E+002	2.505E+002	2.618E+002	
STD		27.75	27.77	2.000E+003	2.178E+003	2.157E+003	
STD		27.78	27.77	2.000E+003	2.135E+003	2.157E+003	
STD		24.45	24.50	2.000E+004	1.958E+004	1.901E+004	
STD		24.54	24.50	2.000E+004	1.845E+004	1.901E+004	
STD		21.21	21.21	2.000E+005	1.692E+005	1.697E+005	
STD		21.20	21.21	2.000E+005	1.703E+005	1.697E+005	

注：本製品は遺伝子検出用キットであるため、死んだ原虫も検出されます。  
 また、サンプルの保存等の過程での劣化、サンプル中に含まれる阻害物質の量、逆転写反応効率などの影響より、原虫に含まれる実際のコピー数と算出されたプラスミド概算コピー数が異なる場合があります。

## <解析例>

出典：平成 23 年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究（研究代表者：松井佳彦）」より、平成 23 年度微生物分科会分担研究報告書



※ 上記出典において、「クリプトスポリジウム 1 オーシストあたりの 18S rRNA 量は、サイクリングプローブ法で 18,000 コピーに相当すると計算された。」と記載されています。

なお、上記出典における図中の陽性対照および文中の PC は、本製品に含まれる *Crypto. Positive Control* です。

注：サンプルの保存過程等での劣化、サンプル中に含まれる阻害物質の量、逆転写効率などの影響により、原虫の個数と算出されたプラスミド概算コピー数の関係が上記解析例と異なる場合があります。

## IX. 参考データ

### IX-1. 検出可能な種

検出が可能であった種：

*Cryptosporidium parvum*

*Crypto.* Primer/Probe Mix の配列情報から検出が可能と推測される種：

*Cryptosporidium felis*

*Cryptosporidium meleagridis*

*Cryptosporidium muris*

*Cryptosporidium andersoni*

*Cryptosporidium baileyi*

*Cryptosporidium bovis*

*Cryptosporidium wrairi*

*Cryptosporidium hominis*

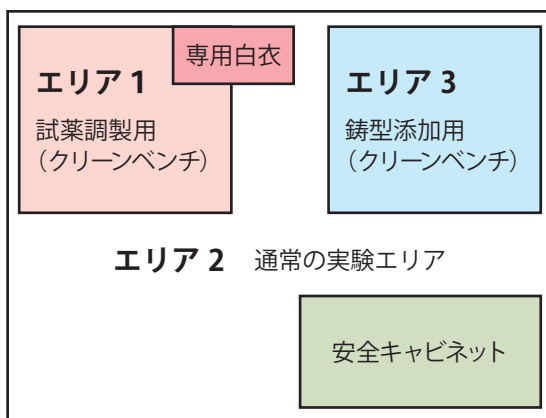
*Cryptosporidium canis*

### IX-2. クロス反応

以下の種について、クロス反応がないことを確認しています。

*Giardia lamblia*

## X. 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。

## XI. 参考文献

Johnson, DW., et al. *Appl Envir Microbiol.* (1995) **61**: 3849-3855.

## XII. 関連製品

Cycleave RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit (製品コード CY231)  
CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (製品コード CY240/CY240S)  
RNase-OFF® (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)  
Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (製品コード TP1010)  
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)  
0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set (製品コード NJ907)  
Sealing Film for Real Time (Adhesive) Ver.2 (製品コード NJ502)  
Sealing Film for Real Time (製品コード NJ500)  
Plate Sealing Pads (製品コード 9090)  
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)

## XIII. 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下さい。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、RNase-OFF は PureBiotech, LLC 社の登録商標です。PrimeScript、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 <https://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**