

製品コード CY233

研究用

---

**Takara**

**CycleavePCR™**  
***Streptococcus agalactiae* (GBS)**  
**Detection Kit**

---

説明書

v201901Da

B 群溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus agalactiae* ; GBS) は、グラム陽性細菌で、ヒトの生殖器官および腸管の常在菌ですが、出生直後の新生児における敗血症や生後 3 ヶ月までに見られる髄膜炎、あるいは高齢者の侵襲性感染症等の主な原因菌となっています。培養による GBS 検査では、結果を得るまでに時間がかかること、検出感度が低いことが問題となっています。

本製品は、GBS 由来のヒスチジンキナーゼをコードする *dltS* 遺伝子をターゲットとして、GBS を網羅的かつ特異的に、リアルタイム PCR 装置を使用して迅速に検出するためのキットです。

増幅反応には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS を使用していますので、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。また、キットには GBS 由来 *dltS* 遺伝子を検出するための FAM 標識プローブに加え、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、1 本のチューブで GBS 特異的 *dltS* 遺伝子の検出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、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。

本製品は、慶應義塾大学医学部感染症学教室 生方公子先生監修の元、リアルタイム PCR を使用して検出するためのキットとして開発されました。

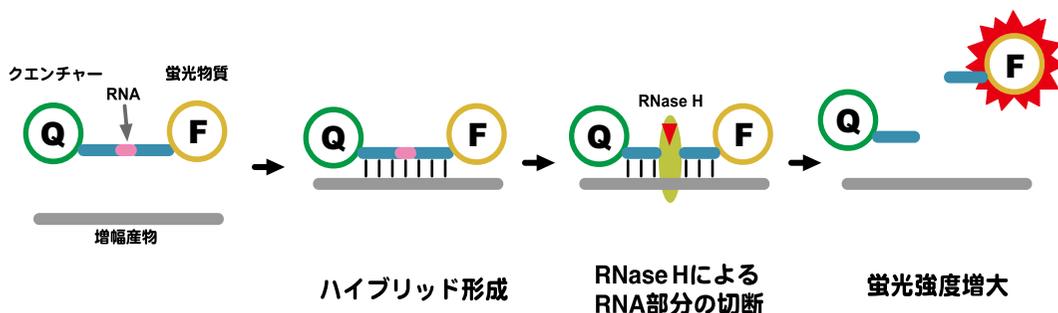


図 1. サイクリングプローブ法の原理

## I. 内容 (50 反応分 ; 25 $\mu$ l 反応系)

●	1. 2 × CycleavePCR Reaction Mixture	625 $\mu$ l
●	2. dltS Primer/Probe Mix (FAM、ROX)	100 $\mu$ l *1
○	3. dH <sub>2</sub> O	500 $\mu$ l
●	4. dltS Positive Control	60 $\mu$ l (30 回分) *2

\* 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。

\* 2 : 開封後は、Positive Control の汚染を避けるため、コンポーネント 1 ~ 3 と、コンポーネント 4 を別々の箱に入れ、それぞれ - 20°C で保存してください。

### 【コンポーネントの説明】

#### **2 × CycleavePCR 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。

#### **dltS Primer/Probe Mix (FAM、ROX) :**

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、ターゲット遺伝子およびインターナルコントロールを増幅し、異なる蛍光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 という蛍光物質で標識されています。

#### 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内部配列を有する DNA 分子で、偽陰性の判定を目的としています。ターゲット増幅用の試薬にインターナルコントロールを検出する試薬が含まれています。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 反応阻害が起こっておらず、ターゲットは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がともに検出されない場合、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 量が多いと、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ケースがあります。この場合は、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、GBS 由来 *dltS* 遺伝子のことです。

#### **dltS Positive Control :**

*dltS* 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機器、試薬（主なもの）

#### <検出反応に必要なもの>

- ・リアルタイム PCR 装置および専用チューブ  
Thermal Cycler Dice® Real Time System II（製品コード TP900/TP960）  
Thermal Cycler Dice Real Time System Lite（製品コード TP700/TP760）  
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）  
など
- ・卓上遠心器
- ・200  $\mu$ l、20  $\mu$ l、10  $\mu$ 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）

#### <サンプルの調製に必要なもの>

- ・核酸抽出試薬（EXTRAGEN II（東ソー（株））など）
- ・Mutanolysin（Sigma-Aldrich 社 Code. M4782）

### 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、操作には細心の注意を払ってください。
- (3) 陽性と判定された検体は、さらに微生物学的な手法を使用して確認してください。
- (4) 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。

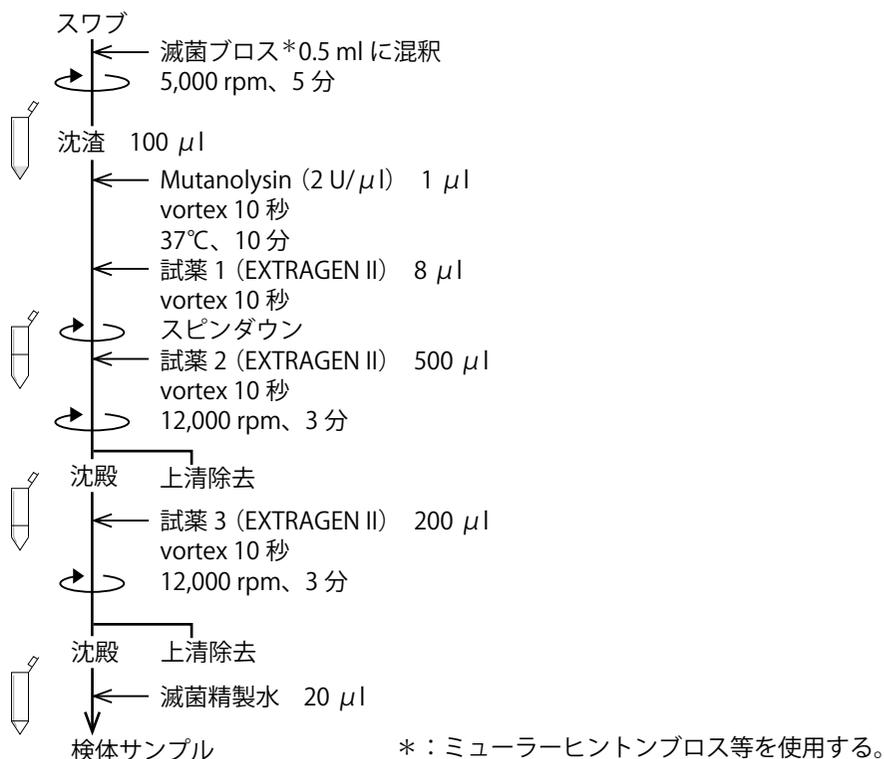
本キットでは増幅反応と検出をリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

- (5) 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

### <操作の概略>

#### (1) サンプルの調製 (エリア 2 で実施)



#### (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

反応液を調製し反応チューブに分注する。(エリア 1 で実施)

##### 【反応液組成】

2 × CycleavePCR Reaction Mixture ●	12.5 μl
dltS Primer/Probe Mix (FAM、ROX) ●	2.0 μl
サンプル DNA または Positive Control または dH <sub>2</sub> O	2.0 μl
dH <sub>2</sub> O ○	8.5 μl
<b>Total</b>	<b>25 μl</b>

陰性コントロール (dH<sub>2</sub>O) (エリア 1 で実施)、陽性コントロールおよびサンプルを添加する。(エリア 3 で実施)  
リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始する。



約 1 時間半

#### (4) 結果表示

#### (5) 判定

## VI-1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

検体から、EXTRAGEN II(東ソー (株))などを使用して鋳型 DNA を調製してください。

### EXTRAGEN II(東ソー (株))を使用した調製方法例

- (1) 検体スワブを 0.5 ml の滅菌ブロスに混釈し、5,000 rpm で 5 分間、遠心して上清 400  $\mu$ l を除去する。
- (2) 沈渣 100  $\mu$ l に、Mutanolysin (2 U/ $\mu$ l) \* を 1  $\mu$ l 加えてボルテックスで混和後、37°C で 10 分間反応する。  
\* : Mutanolysin (2 U/ $\mu$ l) の調製方法  
Mutanolysin (凍結乾燥品 : Sigma-Aldrich 社 Code. M4782) を滅菌水で 2 U/ $\mu$ l になるように溶解する。溶解した Mutanolysin 溶液は、分注して -20°C で保存する。
- (3) 8  $\mu$ l の試薬 1 (共沈剤) を (2) に加え、ボルテックスにより 10 秒間攪拌後、スピンドウンする。
- (4) 試薬 2 (タンパク質変性剤、2-プロパノール) を 500  $\mu$ l 加え、ボルテックスにより 10 秒間攪拌する。
- (5) 12,000 rpm で 3 分間遠心後、上清を廃棄する。  
(上清を完全に除去するため、再度スピンドウンしてチップで上清を廃棄する。)
- (6) 試薬 3 (塩化カリウム、2-プロパノール) を 200  $\mu$ l 加え、ボルテックスにより 10 秒間攪拌する。
- (7) 12,000 rpm で 3 分間遠心後、上清を廃棄する。  
(上清を完全に除去するため、再度スピンドウンしてチップで上清を廃棄する。)
- (8) 20  $\mu$ l の滅菌精製水を氷上で加え、沈殿を溶解し、検体サンプルとする。検体サンプルは、-20°C で保存する。

注 : 全工程でフィルター付チップを使用する。

## 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 *dltS* 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、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 +  $\alpha$  分調製し、各反応チューブに 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、dH<sub>2</sub>O を 2  $\mu$ l 加えしっかりとふたをする。

必要本数は、検体サンプル数 + 2 本 (陰性コントロール反応として dH<sub>2</sub>O を加えたもの、および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 × CycleavePCR Reaction Mixture ●	12.5 $\mu$ l	1 ×
dltS Primer/Probe Mix (FAM, ROX) ●	2.0 $\mu$ l	1 ×
検体サンプル or 陽性コントロール* <sup>1</sup> or dH <sub>2</sub> O	(2.0 $\mu$ l) * <sup>2</sup>	
dH <sub>2</sub> O ○	8.5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l	

\* 1 : 陽性コントロール反応には、dltS Positive Control ● を使用する。

\* 2 : 検体サンプルおよび陽性コントロールは、ステップ (2) で加えるため、ここでは加えない。

(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反応チューブに、検体サンプルや陽性コントロールを添加し、反応チューブのキャップをしっかり閉める。

蛍光測定を行うため、チューブに汚れがつかないように注意し、キャップを閉めるときは手袋を着用する。0.2 ml 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。

#### 【Thermal Cycler Dice Real Time System の場合】

食品環境検査用ソフトウェアの《+/-判定》モードでの解析が便利です。操作方法の詳細は、「食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual；定性解析 (+/-判定) 用」(タカラバイオのオンラインカタログで公開) をご参照ください。

#### PCR 条件

PCR 条件の変更方法は、「食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual；定性解析 (+/-判定) 用」4 ページをご参照ください。

初期変性 (Hold)

Cycle : 1

95℃ 2分

3 step PCR

Cycle : 40

95℃ 10秒

50℃ 30秒

72℃ 20秒(検出)

#### 検出フィルター (変更の必要なし)

FAM

ROX

#### サンプル設定

サンプルタイプの設定は、「食品環境検査用ソフトウェア Quick Manual；定性解析 (+/-判定) 用」7～8 ページをご参照ください。

#### インターナルコントロール検出用フィルター

ROX

#### サンプルタイプ

陰性コントロール

サンプルタイプ：NC (Negative Control)

陽性コントロール

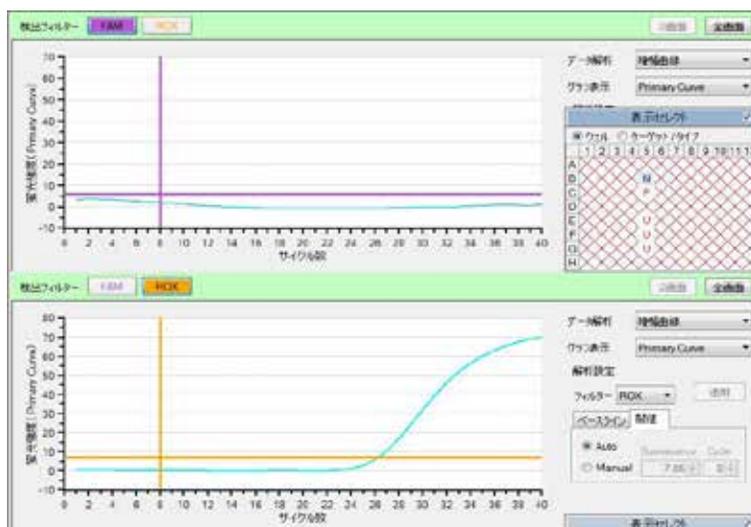
サンプルタイプ：PC (Positive Control)

検体サンプル

サンプルタイプ：UNKN (Unknown)

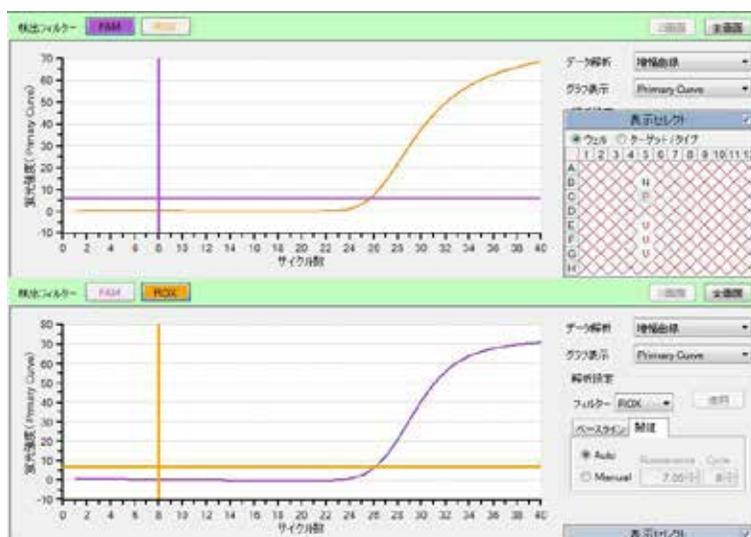
## < 結果解析 >

陰性コントロールの反応結果  
FAM フィルター (dIIS 検出) / ROX フィルター (IC 検出)



陰性コントロール反応では、FAM フィルターにおいて増幅曲線の立ち上がりが見られない、ROX フィルターにおいて増幅曲線の立ち上がりが見られることを確認する。

陽性コントロールの反応結果  
FAM フィルター (dIIS 検出) / ROX フィルター (IC 検出)



陽性コントロール反応では、FAM フィルターならびに ROX フィルターのいずれにおいても増幅曲線の立ち上がりが見られることを確認する。

## 例：判定結果の表示



総合判定のチェックボックスをオンにした画面

### コントロール反応の判定結果

- OK : コントロール反応が正常
- OUT : コントロール反応が異常

### 検体サンプルの判定結果

- Posi. : 陽性
- Nega. : 陰性 (検出限界以下)
- ND : 偽陰性、判定不能 (インターナルコントロール、ターゲット遺伝子ともに検出されていない場合)
- ERROR : エラー (同一レプリケート内で判定結果が異なる場合)

判定は、閾値を超えているか否かにより行います。

---

## 【 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 2分

3 step PCR

Cycle : 40

95°C 10秒

50°C 30秒

72°C 25秒\* (検出)

\* : 検出に必要な時間はご使用の機器により異なります。機器の取扱説明書をご確認ください。

### Passive Reference

none

### Define Targets

Target Name : dltS、 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)

陽性コントロール

サンプルタイプ : Standard または Unknown

検体サンプル

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)

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 (dltS)	増幅シグナル(+)	<i>dltS</i> 遺伝子陽性*1	<i>dltS</i> 遺伝子陽性*1
	増幅シグナル(-)	<i>dltS</i> 遺伝子 検出限界以下*2	判定不能*3

※ 33 サイクル以降で増幅曲線が立ち上がる場合には、電気泳動による目的遺伝子増幅の確認と、再現性を確認するための再反応を行うことをお勧めします。

電気泳動を行う際には、PCR 産物のコンタミネーションにご注意ください。

### 【増幅鎖長】

*dltS* サンプル由来 : 199 bp

*dltS* Positive Control 由来 : 147 bp

インターナルコントロール : 134 bp

判定結果表 2：

陽性コントロール (*dltS* 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 (dltS)	増幅シグナル(+)	<i>dltS</i> 検出系に問題なし	<i>dltS</i> 検出系に問題なし
	増幅シグナル(-)	<i>dltS</i> 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 (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 (dltS)	増幅シグナル(+)	<i>dltS</i> 検出系にコンタミネーションの疑い*5	<i>dltS</i> 検出系にコンタミネーションの疑い*5
	増幅シグナル(-)	<i>dltS</i> 検出系にコンタミネーションはない	判定不能*3

\* 1：インターナルコントロールの(+)/(-)に関わらず、*dltS* 遺伝子が陽性である。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、場合によっては検体の再調製が必要。

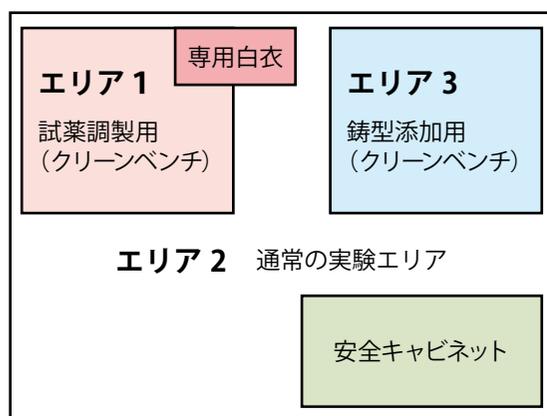
\* 4：*dltS* 増幅用プライマーあるいは *dltS* 検出用プローブに問題があるか、*dltS* Positive Control が分解している。

\* 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. 判定結果についての注意事項

- ・ 陰性コントロール反応の FAM フィルターにおいて、増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られた場合  
→ 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の FAM フィルター、ROX フィルターの両方で、増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られなかった場合  
→ 何らかの原因で PCR 反応、またはサイクリングブローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。
- ・ 陽性コントロールの反応で、増幅曲線、Primary Curve の設定で、ROX フィルターでは増幅曲線が得られるが、FAM フィルターでは増幅曲線が得られなかった場合  
→ dIIS Primer/Probe Mix に問題がある、または、dIIS Positive Control が分解している可能性がある。
- ・ 検体サンプル反応の FAM フィルター、ROX フィルターの両方で、増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られなかった場合  
→ 何らかの原因で PCR、またはサイクリングブ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  
→ ターゲットの DNA 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 の増幅反応が競合抑制される場合がある。この場合、ターゲットは陽性であると判定できる。

## 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. 参考文献

妊娠後期例を対象とした real-time PCR 法による B 群溶血性レンサ球菌の検出と莢膜型別判定：周産期感染症予防を目的として 五十嵐優子、三橋直樹 「順天堂医学」2012 58(3): 218-223.

## XI. 関連製品

CycleavePCR™ GBS Capsular Typing Kit (製品コード CY234)  
Thermal Cycler Dice® Real Time System // (製品コード TP900/TP960)  
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)  
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)  
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)

## XII. 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。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。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**