

製品コード CY234

研究用

Takara

**CycleavePCR™
GBS Capsular Typing 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。

菌体表層に存在する莢膜が感染の成立に重要な役割を果たし、現在 GBS の莢膜型は 10 種類が報告されています。特に新生児の重篤な髄膜炎や敗血症は、莢膜型 Ia 型、Ib 型、III 型が関与することが報告されており、それらの型をタイピングすることが重要になります。

本製品は、CycleavePCR *Streptococcus agalactiae* (GBS) Detection Kit (製品コード CY233) を用いた検出で GBS が陽性であったサンプルについて、莢膜型をコードする *cps* 遺伝子をターゲットとして莢膜型 Ia 型、Ib 型、III 型をタイピングするキットです。

増幅反応には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*[®] 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 *cps* (Ia) 遺伝子ならびに *cps* (III) 遺伝子を検出するための FAM 標識プローブ、*cps* (Ib) 遺伝子検出用の 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、*cps* (Ia) 遺伝子と *cps* (Ib) 遺伝子ならびに *cps* (III) 遺伝子の 3 遺伝子を、2 本のチューブでタイピングすることが可能です。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。

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 を使用してタイピングするためのキットとして開発されました。

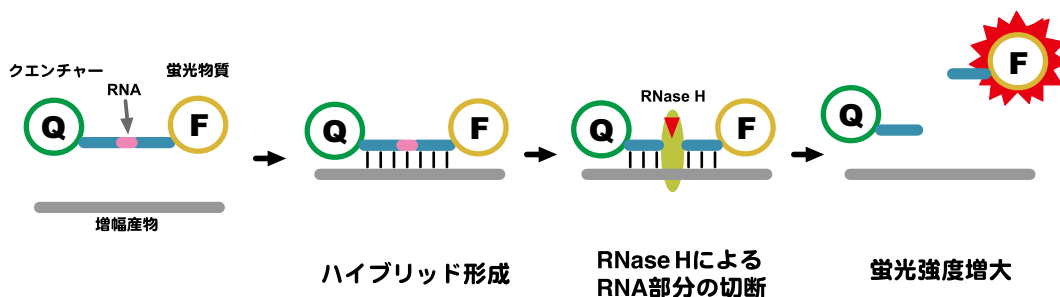


図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. 内容 (50 反応分 ; cps (Ia) & cps (Ib), cps (III) 各 25 反応分 × 25 μl 反応系)

●	1. 2 × CycleavePCR Reaction Mixture	625 μl
●	2. cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mix (FAM、ROX)	50 μl *1
●	3. cps (III) Primer/Probe Mix (FAM)	50 μl *1
○	4. dH ₂ O	500 μl
●	5. cps (Ia) Positive Control	30 μl (15 反応分) *2
●	6. cps (Ib) Positive Control	30 μl (15 反応分) *2
●	7. cps (III) Positive Control	30 μl (15 反応分) *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 ~ 4 と、コンポーネント 5 ~ 7 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。

cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mix (FAM、ROX) :

cps (III) Primer/Probe Mix (FAM) :

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を増幅し、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を検出します。ターゲット遺伝子検出用プローブは FAM または ROX という蛍光物質で標識されています。

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 の莢膜をコードする *cps* (Ia) 遺伝子、*cps* (Ib) 遺伝子、*cps* (III) 遺伝子のことです。

cps (Ia) Positive Control :

cps (Ia) 遺伝子用陽性コントロールです。

cps (Ib) Positive Control :

cps (Ib) 遺伝子用陽性コントロールです。

cps (III) Positive Control :

cps (III) 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 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）

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) 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つ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。

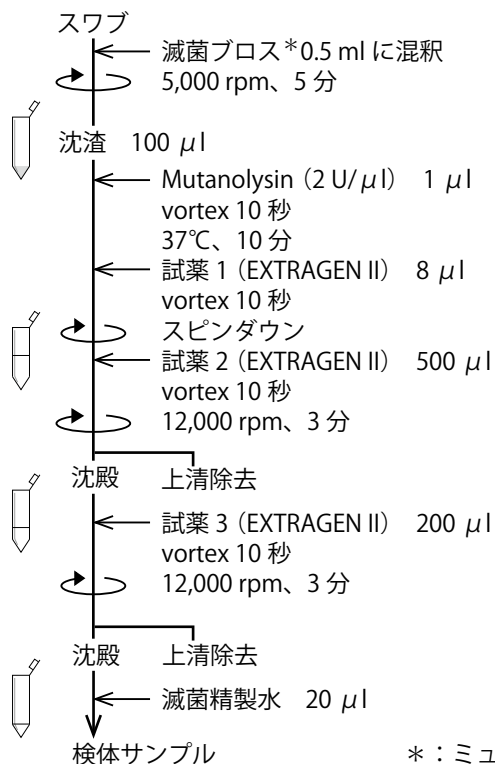
VI. 操作

<操作の概略>

(1) サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

CycleavePCR *Streptococcus agalactiae* (GBS) Detection Kit (製品コード CY233) で調製したサンプルを使用

[参考] CY233 での調製方法



*: ミューラーヒントンブロス等を使用する。

(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 μ l
Primer/Probe Mix (FAM、ROX) ● or ●	2.0 μ l
サンプル DNA or Positive Control or dH ₂ O	2.0 μ l
dH ₂ O ○	8.5 μ l
<hr/>	
Total	25 μ l

陰性コントロール (dH₂O) (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。



(4) 結果表示

(5) 判定

VI-1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

CycleavePCR *Streptococcus agalactiae* (GBS) Detection Kit (製品コード CY233) で調製したサンプルを使用します。

[参考] EXTRAGEN II(東ソー (株))を用いた調製方法例

- (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 μ l を除去する。
- (2) 沈渣 100 μ l に、Mutanolysin (2 U/ μ l) * を 1 μ 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/ μ l) の調製方法
Mutanolysin (凍結乾燥品 : Sigma-Aldrich 社 Code. M4782) を滅菌水で 2 U/ μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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、cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mixの反応液では1本の反応チューブ内でcps (Ia) 遺伝子と cps (Ib) 遺伝子の増幅産物を同時に検出し、別に用意した cps (III) Primer/Probe Mix の反応液では cps (III) 遺伝子の増幅産物を検出します。正しい検出結果を得るために、2種類のPrimer/Probe Mixのそれぞれについて、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)
2種類のPrimer/Probe Mixについて、それぞれ反応液を調製する。

検体サンプル等の鑄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 23 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2 μ l 加えしっかりとふたをする。

必要本数は、cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mix 反応液は検体サンプル数 + 3 本 (陰性コントロール反応として dH₂O、陽性コントロール 2 反応)、cps (III) Primer/Probe Mix 反応液は検体サンプル数 + 2 本 (陰性コントロール反応として dH₂O、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 μ l	1 ×
Primer/Probe Mix (FAM、ROX) ● or ●	2.0 μ l	1 ×
検体サンプル or 陽性コントロール*1 or dH ₂ O	(2.0 μ l) *2	
dH ₂ O ○	8.5 μ l	
Total	25 μ l	

- * 1 : cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mix の反応液については、cps (Ia) Positive Control および cps (Ib) Positive Control の反応を別々に実施し、cps (III) Primer/Probe Mix の反応液には、cps (III) Positive Control を使用する。

cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mix

陽性コントロール反応 1 cps (Ia) Positive Control ●

陽性コントロール反応 2 cps (Ib) Positive Control ●

cps (III) Primer/Probe Mix

陽性コントロール反応 1 cps (III) Positive Control ●

- * 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 (鑄型) 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と閉める。

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°C 2分

3 step PCR

Cycle : 40

95°C 10秒

50°C 30秒

72°C 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

none

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)

ターゲット (複数に)

cps (Ia)/cps (Ib) 【cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mix 反応】

ターゲット設定 マーク：A

cps (III) 【cps (III) Primer/Probe Mix 反応】

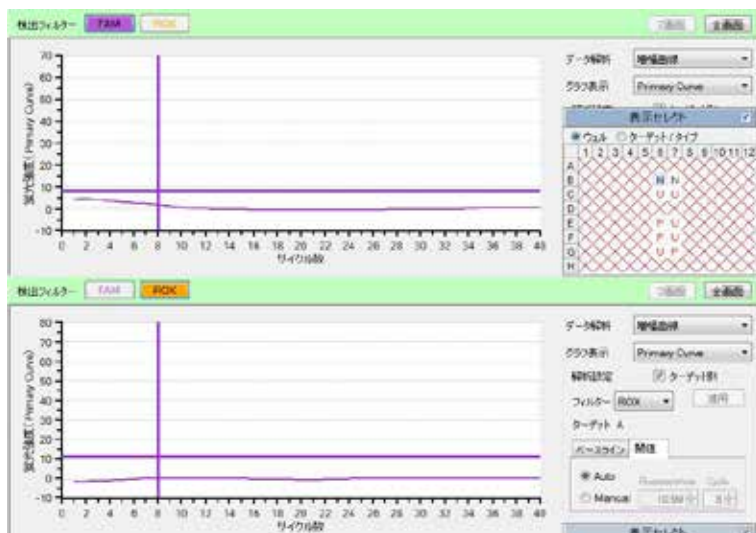
ターゲット設定 マーク：B

< 結果解析 >

陰性コントロールの反応結果

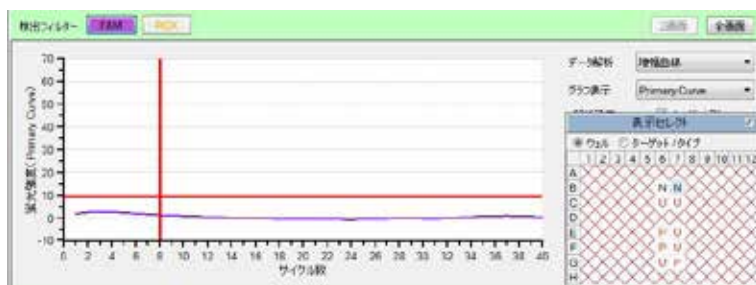
【 cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mix 反応 】

FAM フィルター (cps (Ia) 検出) / ROX フィルター (cps (Ib) 検出)



【 cps (III) Primer/Probe Mix 反応 】

FAM フィルター (cps (III) 検出)



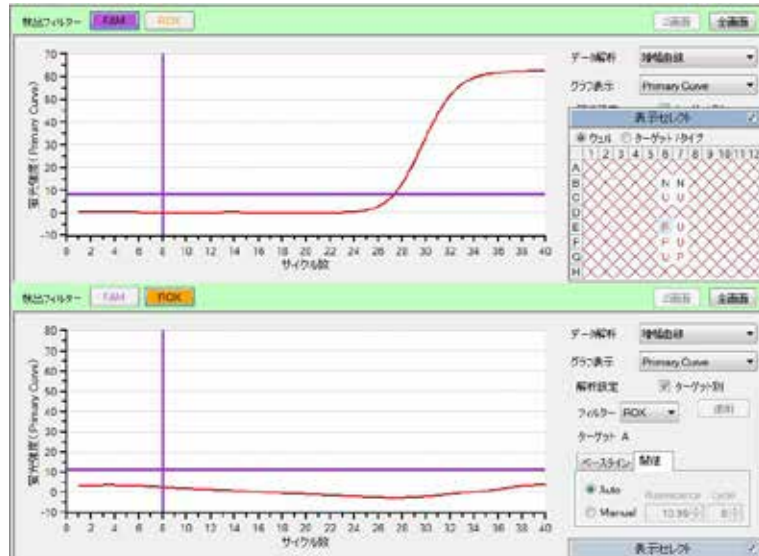
陰性コントロール反応では、FAM フィルターならびに ROX フィルターのいずれにおいても増幅曲線の立ち上がりが見られないことを確認する。

陽性コントロールの反応結果

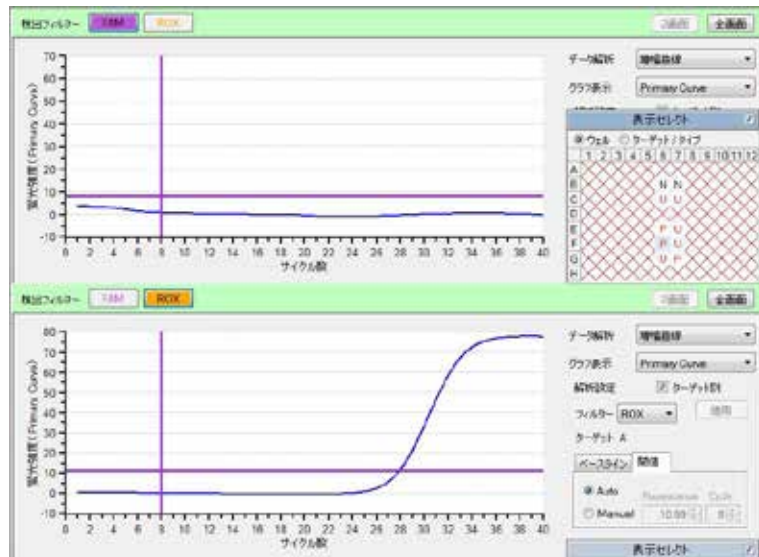
【cps (la) & cps (lb) Primer/Probe Mix 反応】

FAM フィルター (cps (la) 検出) / ROX フィルター (cps (lb) 検出)

cps (la) Positive Control を反応した結果



cps (lb) Positive Control を反応した結果

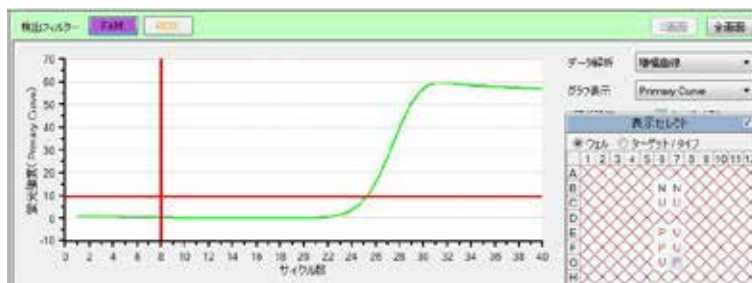


cps (la) Positive Control の陽性コントロール反応では、FAM フィルターにおいて増幅曲線の立ち上がりが見られ、ROX フィルターにおいて増幅曲線の立ち上がりがないことを確認する。

cps (lb) Positive Control の陽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なく、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。

【cps (III) Primer/Probe Mix 反応】
FAM フィルター (cps (III) 検出)

cps (III) Positive Control を反応した結果



cps (III) Positive Control の陽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ることを確認する。

例：判定結果の表示

検出フィルター FAM は、cps (Ia) と cps (III) を判定



検出フィルター ROX は、cps (Ib) を判定



反応液

cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mix : 6 列
cps (III) Primer/Probe Mix : 7 列

陽性コントロール

cps (Ia) Positive Control : 6-E
cps (Ib) Positive Control : 6-F
cps (III) Positive Control : 7-G

【 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 : cps (Ia)、Reporter : FAM、Quencher : (none)

Target Name : cps (Ib)、Reporter : ROX、Quencher : (none)

Target Name : cps (III)、Reporter : FAM、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

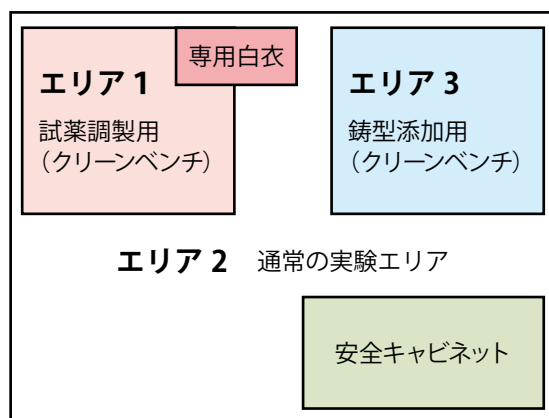
サンプルタイプ : Unknown

※ 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. 判定結果についての注意事項

- 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>
 cps (Ia) : サンプル由来 210 bp [cps (Ia) Positive Control 由来 168 bp]
 cps (Ib) : サンプル由来 194 bp [cps (Ib) Positive Control 由来 153 bp]
 cps (III) : サンプル由来 281 bp [cps (III) Positive Control 由来 216 bp]
- 陰性コントロール反応において、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目的とする検出フィルター (cps (Ia) 検出ならびに cps (III) 検出は FAM フィルター、cps (Ib) 検出は ROX 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プローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。
 Primer/Probe Mix に問題がある、または、Positive Control が分解している可能性がある。
- 検体サンプルの反応で、cps (Ia) & cps (Ib) Primer/Probe Mix ならびに cps (III) Primer/Probe Mix のいずれにおいても、FAM フィルター、ROX フィルターの両者で、増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られなかった場合
 → CycleavePCR *Streptococcus agalactiae* (GBS) Detection Kit の反応で GBS が陽性であった場合は、Ia 型、Ib 型、III 型以外の莢膜型と考えられる。

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

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

X. 関連製品

CycleavePCR™ *Streptococcus agalactiae* (GBS) Detection Kit (製品コード CY233)
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)
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)

XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断用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