

食品・環境分析用

Takara

CycleavePCR™ EHEC (O103/O145) Typing Kit

説明書

測定結果の判定方法に「+/-判定の基準値」を追加しました。詳細は P11、P15 にてご確認ください。

O157:H7 や O26 をはじめとする腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、血便と激しい腹痛を伴う出血性大腸炎、さらには溶血性尿毒症症候群を引き起こす病原性大腸菌の一群です。これらの重篤な症状の原因は、EHEC が産生する細胞毒素であるベロ毒素です。EHEC の検出においては、まずベロ毒素遺伝子の保有状況によるスクリーニングを行い、ベロ毒素遺伝子陽性であれば、O 抗原型の遺伝子タイピングをした上で、分離培養を行う方法が効率的であるとされています。

本製品は、O 抗原型の内、O103 と O145 のタイピングに使用します。本製品には、O103 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子を検出するための FAM 標識プローブと、O145 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子を検出するための 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 O103 および O145 の検出が可能です。リアルタイム PCR によるタイピングであり、電気泳動が不要で、迅速に結果が得られます。

なお、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 のキメラプローブと RNase H の組み合わせによる非常に特異性の高い検出法です。サイクリングプローブは、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。

※ 本製品を使用する検出方法は、厚生労働省 医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 (平成 26 年 11 月 20 日)「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」(食安監発 1120 第 1 号) に記載されました。

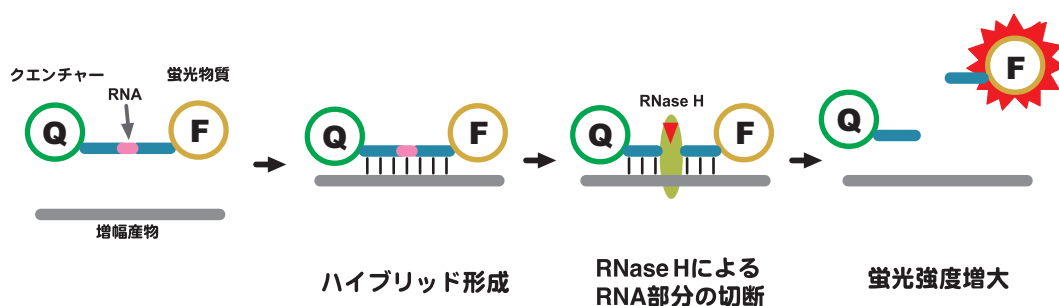


図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. 内容 (20 回分、25 μ l 反応系)

●	1. 2 × Cycleave Reaction Mixture	2 × conc.	250 μ l
●	2. O103/O145 Primer/Probe Mix*	5 × conc.	100 μ l
○	3. dH ₂ O		1 ml
●	4. O103 Positive Control		40 μ l (8 回分)
●	5. O145 Positive Control		40 μ l (8 回分)
○	6. EASY Dilution (for Real Time PCR)		1 ml

*：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 1～3 は、製品に添付している小箱を利用し、4～6 のコンポーネントとは別に保管してください。

【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。

O103/O145 Primer/Probe Mix :

O103 および O145 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子をそれぞれ検出するためのプライマー・プローブ溶液です。O103 検出用のプローブは FAM、O145 検出用のプローブは ROX で標識されています。

dH₂O : 滅菌水です。

O103 Positive Control : O103 検出用陽性コントロールです。

O145 Positive Control : O145 検出用陽性コントロールです。

EASY Dilution (for Real Time PCR) :

Positive Control を希釈する際に、希釈溶液として使用します。

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

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)

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) など

ヒートブロック

卓上遠心機

微量高速遠心機

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)

NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)

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。

- ・本製品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. 操作

操作の概要




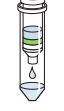








1. サンプルの調製
NucleoSpin Tissue などを用いて DNA 抽出を行う。
2. リアルタイム PCR 装置のセッティング
3. 反応液の調製と反応開始
反応液を調製する。
↓
反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、または検体サンプル、または陽性コントロールを添加する。
↓
反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。
4. 解析

VI-1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

食品培養液からの腸管出血性大腸菌の DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社) を使用します*1。DNeasy Blood & Tissue Kit の取扱説明書に従って操作してください。

* 1 : 通知に基づいた試験を行う場合には、DNeasy Blood & Tissue Kit を使用してください。それ以外の場合には、NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/50/250) 等の同等品を使用することが可能です。

【NucleoSpin Tissue による食品からの腸管出血性大腸菌検査のための DNA 抽出プロトコール】

1. サンプルの準備		マイクロチューブに増菌培養液*2 を 0.1 ml 入れ、10,000 × g で 10 分間遠心して上清を除去し、細菌のペレットを用意する。	
2. Proteinase K 処理		180 μl の Buffer T1、25 μl の Proteinase K 溶液*3 を細菌のペレットに添加し、激しく攪拌する。56℃で 1 時間インキュベートする。 注 : 1 時間で溶解しなかった場合は、56℃でのインキュベートを 3 時間 (~一晩) まで延長し、完全に溶解する。	
3. サンプルの溶解		サンプルを攪拌する。Buffer B3 を 200 μl 加えて、激しく攪拌した後、70℃で 10 分間インキュベートする。 不溶物が残る場合は 11,000 × g で 5 分間遠心し、上清を新しいチューブに移す。	
4. エタノールの添加		96 ~ 100%エタノールを 210 μl 添加し、よく混合する。	
5. カラムへの吸着		NucleoSpin Tissue Column を Collection Tube にセットする。 4. の溶液をカラムに添加し、11,000 × g で 1 分間遠心する。 ろ液を捨て、新しい Collection Tube にカラムをセットする。	
6. メンブレンの洗浄		1 回目の洗浄 500 μl の Buffer BW をカラムに添加し、11,000 × g で 1 分間遠心する。ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。	
		2 回目の洗浄 600 μl の Buffer B5*3 をカラムに添加し、11,000 × g で 1 分間遠心する。ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。	
7. メンブレンの乾燥		カラムを 11,000 × g で 1 分間遠心する。	
8. DNA の溶出		カラムをマイクロチューブ (1.5 ml: 各自で用意) にセットする。 70℃に温めた Buffer BE*4 を 100 μl 加え、室温で 1 分間インキュベートした後、11,000 × g で 1 分間遠心する。 溶出した DNA 溶液は 4℃、長期保存の場合は -20℃で保存する。 (凍結融解はできるだけ繰り返さない)	

* 2 : 「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」(食安監発 1120 第 1 号、平成 26 年 11 月 20 日) に記載された方法で、増菌培養を行ってください。

* 3 : Proteinase K 溶液、Buffer B5 の調製法は、NucleoSpin Tissue の取扱説明書に従ってください。

* 4 : Buffer BE の組成 : 5 mM Tris-HCl, pH8.5

VI-2. 反応液の調製と反応開始

反応の種類について

本製品では、以下の2種類の反応を実施します。

<反応 A：ターゲット遺伝子の検出反応>

- ・ ターゲット遺伝子 (O 抗原領域遺伝子) の検出が目的。
- ・ 検体由来の DNA のみを鋳型として添加する。

<反応 B：PCR 阻害の有無の確認>

- ・ PCR 阻害の有無の確認が目的。
- ・ 1/100 希釈した Positive Control の反応に検体由来の DNA を添加する。
- ・ <反応 B>は、<反応 A>で O103、O145 のどちらの検出においても検体サンプルの増幅曲線が得られなかった場合の判定に用いる。
- ・ VT 遺伝子検出の際に、「VI-1. サンプルの調製」の記載と同じ方法で調製したサンプルを使用し、インターナルコントロール等により PCR 阻害がないことをすでに確認しているサンプルを用いる場合には、<反応 B>は省略することができる。

(1) Positive Control を段階希釈する。(<反応 B> で使用) (エリア 3 で実施)

O103 Positive Control と O145 Positive Control を EASY Dilution (for Real Time PCR) で 1/100 に段階希釈する。

O103 Positive Control の段階希釈例

- 1) O103 Positive Control 原液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l \rightarrow 1/10 希釈液
- 2) 1) の 1/10 希釈液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l \rightarrow 1/100 希釈液

O145 Positive Control も同様に 1/100 に段階希釈する。

(2) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

<反応 A：ターゲット遺伝子の検出反応>

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 ずつ分注して軽くキャップをしめる。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、反応チューブのキャップをしっかりと閉める。必要本数は、サンプル数 + 3 本 (陰性コントロール、O103 と O145 の陽性コントロール) とする。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
● 2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 μ l	1 ×
● O103/O145 Primer/Probe Mix	5 μ l	1 ×
検体サンプル or 陽性コントロール (O103 Positive Control or O145 Positive Control) or dH ₂ O	(5 μ l) *5	
○ dH ₂ O	2.5 μ l	
Total	25 μ l	

<反応 B：PCR 阻害の有無の確認>

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 ずつ分注して軽くキャップをしめる。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、反応チューブのキャップをしっかりと閉める。必要本数は、サンプル数 + 1 本 (陰性コントロール) とする。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
● 2 × Cycleave Reaction Mixture	12.5 μ l	1 ×
● O103/O145 Primer/Probe Mix	5 μ l	1 ×
O103 Positive Control 1/100 希釈液	0.5 μ l	
O145 Positive Control 1/100 希釈液	0.5 μ l	
検体サンプル or dH ₂ O	(5 μ l) *5	
○ dH ₂ O	1.5 μ l	
Total	25 μ l	

* 5：検体サンプルおよび<反応 A>の陽性コントロール DNA (原液) 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にご注意ください。

(3) 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。

VI-3. リアルタイム PCR 装置による増幅・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。

通知には、適合機種として Thermal Cycler Dice Real Time System // (製品コード TP900：終売)、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) が記載されています。

【 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~」(タカラバイオのウェブカタログで公開) をご参照ください。

<反応条件設定画面>

PCR 条件

初期変性 (Hold)

Cycle : 1
95°C 10 秒

3 step PCR

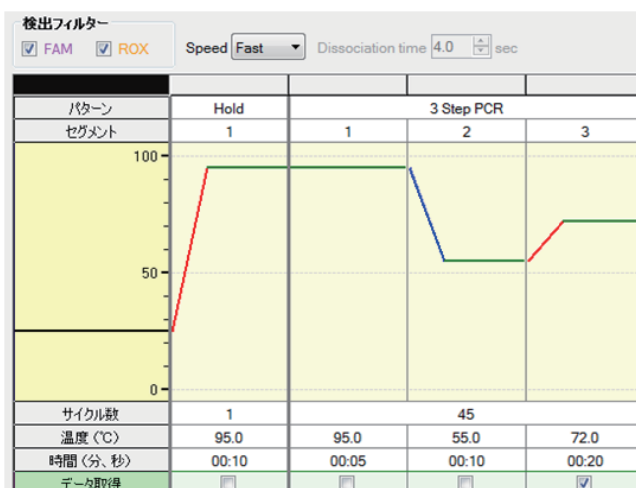
Cycle : 45
95°C 5 秒
55°C 10 秒
72°C 20 秒 (検出)

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 // (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。

検出フィルター

FAM
ROX



注：検出フィルターの設定は<FAM、ROX>にチェックを入れたままで変更は不要です。温度条件とデータ取得も変更不要です。

<サンプル設定画面>

検出フィルター

インターナルコントロール：<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)

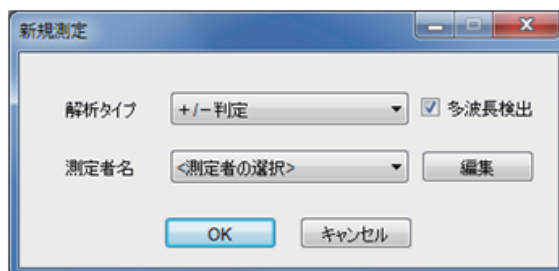
陽性コントロール

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)

1. ファイルの新規作成



- (1) ファイルを新規作成する。
- (2) 解析タイプとして+/-判定を選択する。
- (3) 多波長検出にチェックを入れる。

2. ウェル情報設定

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					UNKN	UNKN	UNKN	UNKN				
B					UNKN	UNKN	UNKN	UNKN				
C					UNKN	UNKN	UNKN	UNKN				
D					UNKN	UNKN	UNKN	NC				
E					UNKN	UNKN	UNKN	PC				
F					UNKN	UNKN	UNKN	PC				
G					UNKN	UNKN	UNKN					
H					UNKN	UNKN	UNKN					

- (1) インターナルコントロールの設定は <none> のままで変更不要。
- (2) サンプルタイプ (NC、PC、UNKN) を選択する。
- (3) ターゲット設定のマーク (A、B、C・・・) を選択する。
使用する製品が1種類の場合は、すべてAとする。

(4) 必要に応じてサンプル名を設定する。

画面右上の表示切替の「名称」を選択すると、下記のような画面になる。

The screenshot shows a software interface with a data table and a dialog box. The table has columns numbered 1 to 12 and rows labeled A to H. The data in the table is as follows:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					UNKN	UNKN	UNKN	UNKN				
B					検体1 UNKN	検体1 UNKN	検体9 UNKN	検体13 UNKN				
C					検体2 UNKN	検体2 UNKN	検体9 UNKN	検体13 UNKN				
D					検体3 UNKN	検体3 UNKN	検体10 UNKN	検体14 UNKN				
E					検体4 UNKN	検体4 UNKN	検体10 UNKN	検体14 NC				
F					検体5 UNKN	検体5 UNKN	検体11 UNKN	PC				
G					検体6 UNKN	検体6 UNKN	検体11 UNKN	PC				
H					検体7 UNKN	検体7 UNKN	検体12 UNKN	O145				
					検体8 UNKN	検体8 UNKN	検体12 UNKN					

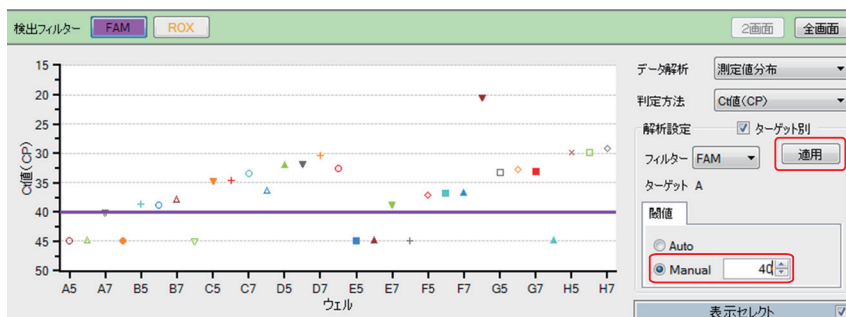
The dialog box 'Well Information Settings' is open, showing the following settings:

- サンプル名: []
- サンプルタイプ: <blank>
- インターナルコントロール: []
- ターゲット設定: 複数
- マーク: <none> [連続設定]
- レプlicate設定: [] [連続設定]
- Omit

<結果／解析画面>

1. +／-判定の閾値の設定

- (1) 検出フィルターのFAM ボタンをクリックする。
- (2) データ解析のメニューから「測定値分布」を選択する。
- (3) 閾値のタブで Manual を選択し、「40」と入力する。
- (4) 適用ボタンをクリックする。
- (5) ROX についても FAM と同様に設定する。



2. +／-判定結果の確認

- (1) 検出フィルターのFAM または ROX ボタンをクリックする。
- (2) データ解析のメニューから「判定結果」を選択する。
- (3) +／-の結果を確認し、15 ページの判定表に従って判定する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					-	-	+	-				
B					+	+	+	-				
C					+	+	+	+				
D					+	+	+	+				
E					-	-	+	-				
F					+	+	+	+				
G					+	+	+	-				
H					+	+	+					

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>)。

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

各種設定は、Advanced Setup で行ってください。
Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan Reagents を選択します。

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 25 秒 (検出)

Passive Reference

(none)

Define Targets

Target Name : O103、 Reporter : FAM、 Quencher : (none)

Target Name : O145、 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)

陽性コントロールおよび検体サンプル

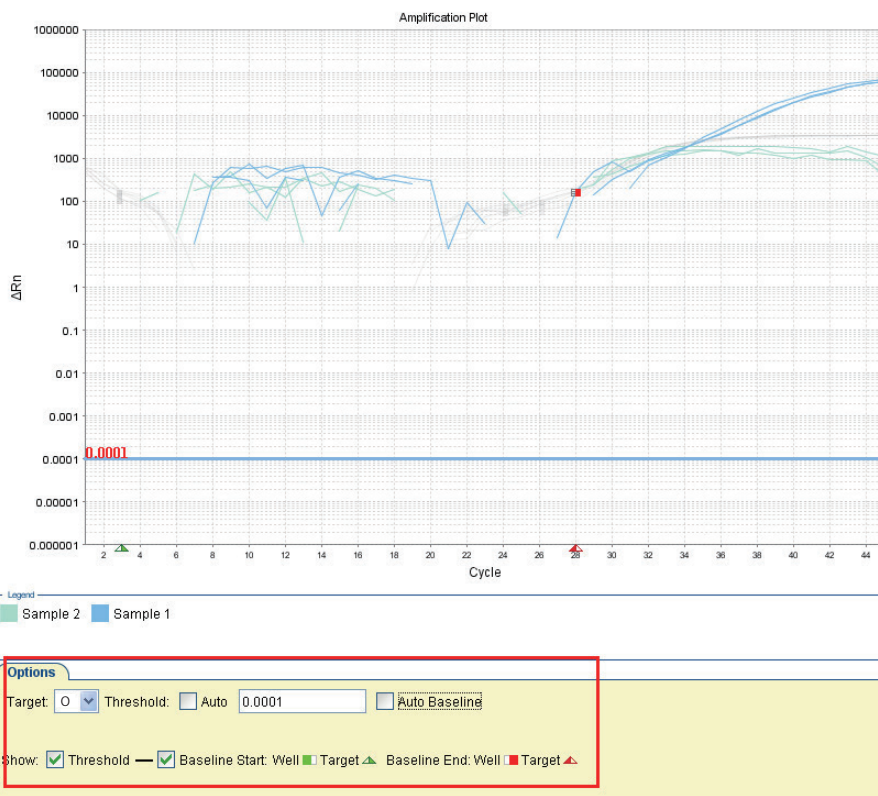
サンプルタイプ : Unknown

解析終了後、必要に応じて、解析パラメータを Manual 設定で修正してください。

解析終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線を確認し、Threshold と Baseline を Manual 設定で適切な位置に修正する。

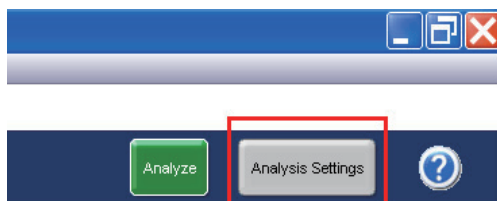
1. Amplification Plot の Options の設定

Target: のドロップダウンリストから O103、O145 を測定した Target を選択する。
Threshold: の Auto と Auto Baseline のチェックボックスの をはずす。
Show: の Threshold と Baseline のチェックボックスに を入れる。



2. Analysis Setting 画面の表示

画面右上の Analysis Settings ボタンをクリックする。



3. Analysis Setting 画面での設定

Select a Target で O103、O145 を測定した Target を選択する。
Ct Settings for Target Name で Threshold と Baseline の適切な値を設定する。*6
画面下の Apply Analysis Settings のボタンをクリックする。

* 6 : Threshold は Amplification Plot (Log 表示) が直線になっている範囲内に、Baseline は Amplification Plot の立ち上がりが認められる前までの範囲に設定します (下図参照)。

Analysis Settings for ABI7500_C05_120711

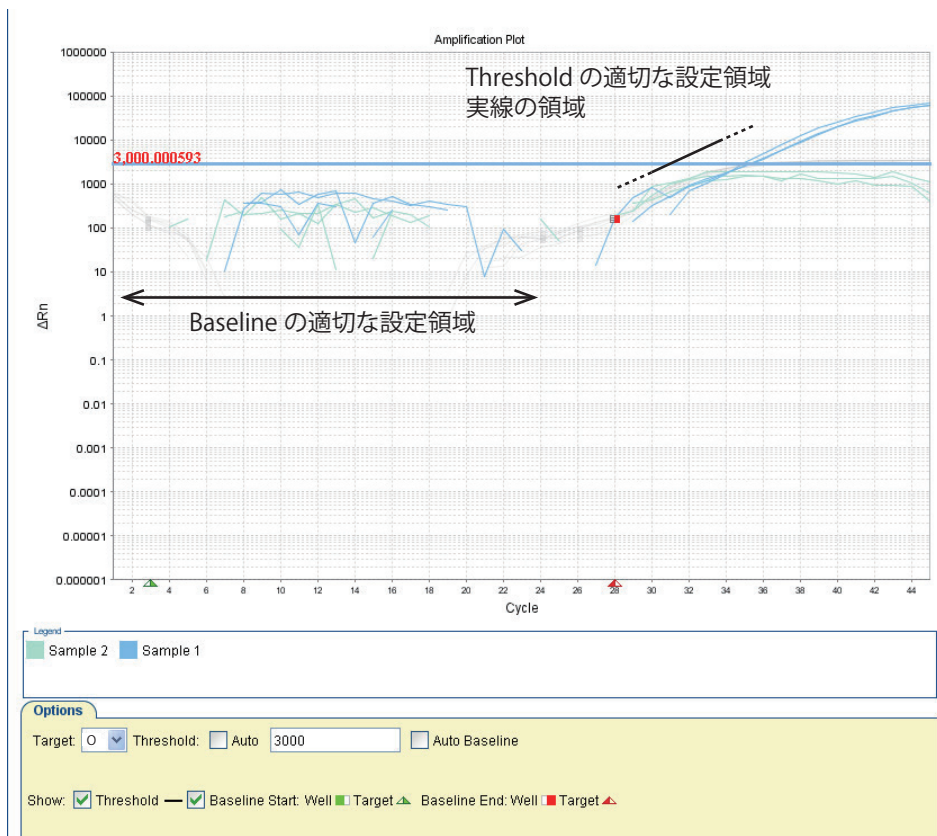
Ct Settings | Flag Settings | Advanced Settings

Review the default settings for analysis of targets in this experiment. To edit the default settings, click "Edit Default Settings." To use different settings for a target, select the target from the table, deselect "Use Default Settings," then change the settings that are displayed.

Default Ct Settings
Default Ct settings are used to calculate the Ct for targets without custom settings. To edit the default settings, click "Edit Default Settings."
Threshold: AUTO Baseline Start Cycle: AUTO Baseline End Cycle: AUTO

Target	Threshold	Baseline Start	Baseline End
O	AUTO	AUTO	AUTO
O	3,000	3	27

Ct Settings for O
Ct Settings to Use: Use Default Settings
 Automatic Threshold
Threshold: 3,000.0
 Automatic Baseline
Baseline Start Cycle: 3 End Cycle: 27



(参考) Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System も同様な操作です。ただし、StepOnePlus Real-Time PCR System では、ROX の検出感度が低いため、全 target を同時に表示すると、ROX 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. 測定結果の判定について

【+/-判定の基準】

本製品では、Ct 値が 40 未満の場合に検出 (+) と判定します。*

検出 (+) : Ct 値 40 未満の場合

不検出 (-) : Ct 値 40 以上または Ct 値が算出されない場合

* : 40 サイクル以降では、非特異的な蛍光値の上昇が起こることがあります。

【正常な測定結果の例】

<反応 A : ターゲット遺伝子の検出反応>

- ・ターゲット遺伝子 (O 抗原領域遺伝子) の検出が目的。
- ・検体由来の DNA のみを鋳型として添加した。

鋳型	O103 (FAM)	O145 (ROX)	判定結果
dH ₂ O (陰性コントロール)	-	-	正常
O103 Positive Control (陽性コントロール)	+	-	正常
O145 Positive Control (陽性コントロール)	-	+	正常
検体サンプル	+	-	O103 陽性
	-	+	O145 陽性
	+	+	O103 陽性および O145 陽性
	-	-	反応Bより、PCR阻害なしの場合： O103 および O145 陰性 反応Bより、PCR阻害ありの場合： 判定不能

<反応 B : PCR 阻害の有無の確認>

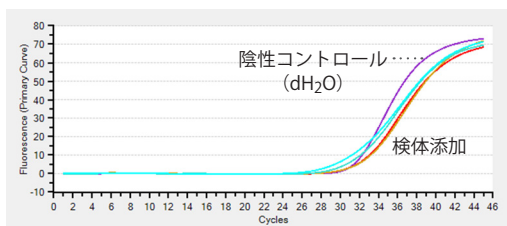
- ・PCR 阻害の有無の確認が目的。
- ・1/100 希釈した Positive Control の反応に検体由来の DNA を添加した。

<反応 A>で、O103、O145 のどちらの検出においても検体サンプルの増幅曲線が得られなかった場合の判定に使用する。

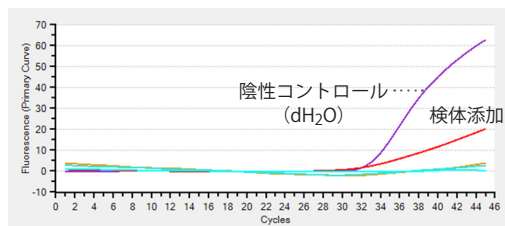
添加	O103	O145	判定結果
dH ₂ O (陰性コントロール)	反応性良好	反応性良好	正常
検体サンプル	反応性良好	反応性良好	PCR 阻害なし
	反応性良好	反応性低下	PCR 阻害あり (→次頁参照)
	反応性低下	反応性良好	PCR 阻害あり
	反応性低下	反応性低下	PCR 阻害あり

検体中に含まれる夾雑物による反応阻害の例

O103 検出系 (FAM 検出)



O145 検出系 (ROX 検出)



O103 検出系では、検体を添加した場合、陰性コントロール (dH₂O を添加) と同等の反応性を示しましたが、O145 検出系では、検体を添加した場合、陰性コントロールより反応性が低下しました (前頁、反応 B の表の 2 番目の事例に該当)。このような結果になった場合は、PCR 阻害が疑われます。

【異常な測定結果の例とトラブルシューティング】

反応 A の陰性コントロール反応

- O103 または / および O145 の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。

陽性コントロール反応

- 対象となるターゲット遺伝子の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。

検体の反応

- 検体由来の増幅が認められず、反応 B より PCR 阻害が疑われた。
 - 鋳型に PCR 阻害物質が混入している可能性がある。再度、DNA 抽出をやり直す。

反応 B の陰性コントロール反応

- O103 または / および O145 の検出において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。Positive Control の希釈や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。

※ 検体サンプルの判定は、各コントロール反応の結果とあわせて最終判定を行ってください。

VIII. 反応例

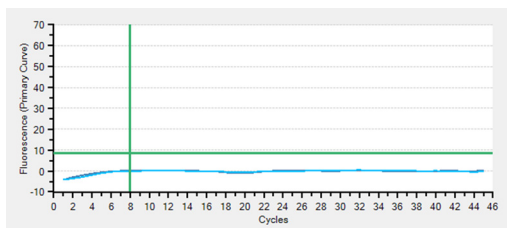
【方法】

陰性コントロールとして dH₂O、陽性コントロールとして O103 Positive Control および O145 Positive Control を鋳型として使用し、「VI. 操作」の記載に従って反応を行った。

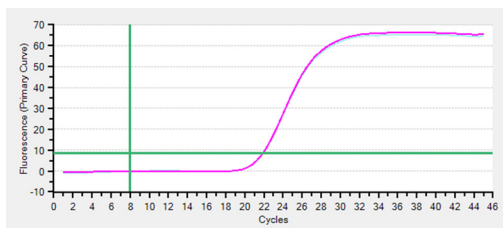
【結果】

O103 検出系 (FAM フィルター)

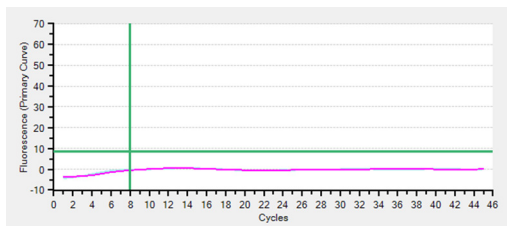
陰性コントロール (dH₂O)



O103 Positive Control

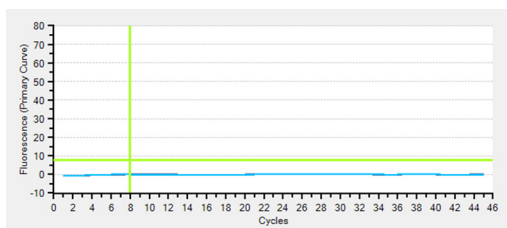


O145 Positive Control

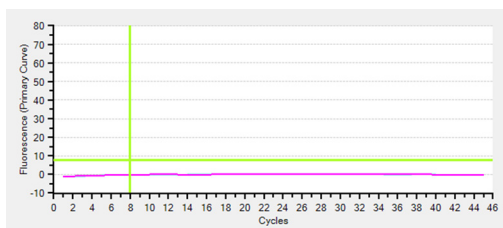


O145 検出系 (ROX フィルター)

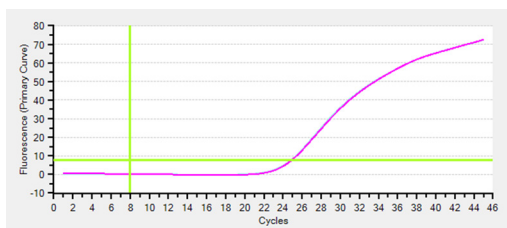
陰性コントロール (dH₂O)



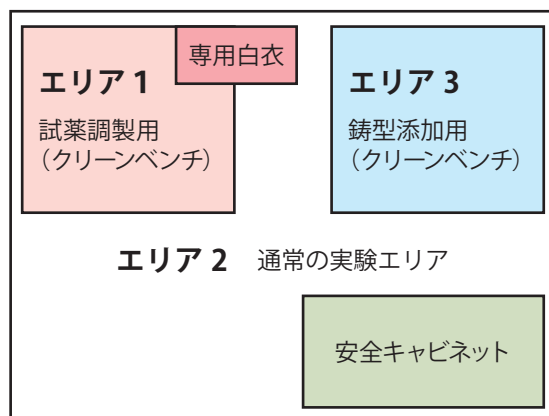
O103 Positive Control



O145 Positive Control



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

CycleavePCR™ EHEC (O157/O26) Typing Kit (製品コード CY237)
CycleavePCR™ EHEC (O111/O121) Typing Kit (製品コード CY238)
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)
96well Hi-Plate for Real Time (製品コード NJ400)
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)
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)
NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)
EASY Dilution (for Real Time PCR) (製品コード 9160)

<ペロ毒素遺伝子の検出>

CycleavePCR™ O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0 (製品コード CY217A/B)
EHEC (VT gene) PCR Screening Set (製品コード RR120A)

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。
- ・Thermal Cyclers 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社