

製品コード **CY240**  
**CY240S**

食品・環境分析用

---

# Takara

## CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit

---

説明書

Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970) を用いる際の PCR 条件が変更になりました。  
詳細は p13、16 にてご確認ください。(2019 年 6 月)

v201906Da

レジオネラ属菌は、*Legionella pneumophila* に代表される好気性のグラム陰性桿菌で、土壌や淡水に生息し、冷却塔水、循環式浴槽水、温泉などの環境水を広く汚染します。汚染水のエアロゾルの吸入や誤嚥など環境水を介したレジオネラ属菌の感染により、レジオネラ症と呼ばれる疾患が引き起こされます。現在、レジオネラ属は 55 菌種以上が知られており、その全ての菌種がレジオネラ症（レジオネラ肺炎）を引き起こす可能性があります。レジオネラ症の患者および環境水からの検出率が最も高いのは *Legionella pneumophila* です。平成 29 年 8 月に「第 4 版レジオネラ症防止指針」（発行：公益財団法人日本建築衛生管理教育センター）が改訂・発刊され、迅速検査法のひとつとして「リアルタイム PCR 法」が記載されています。蛍光物質を使用して PCR 増幅産物をリアルタイムでモニターし解析するリアルタイム PCR 法は、簡便性、迅速性、反応特異性の高さから、近年、環境衛生管理において急速に普及しています。レジオネラ症への対策においても、感染源の特定や、営業停止施設の再開時期決定などの緊急対応に有効活用できることが期待されています。

本製品はレジオネラ属菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしてレジオネラ属の広範な菌種をリアルタイム PCR で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、キットにはレジオネラ属菌由来 16S rRNA 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、一本のチューブでレジオネラ由来 16S rRNA 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。

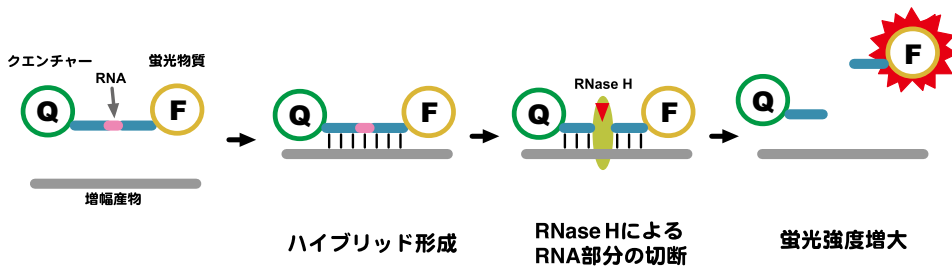


図 1. サイクリングプローブ法の原理

## I. 内容 (製品コード CY240; 25 $\mu$ l 反応・50 回分、製品コード CY240S; 25 $\mu$ l 反応・25 回分)

		製品コード CY240	CY240S
● 1.	2 × Cyclecleave Reaction Mixture	2 × conc.	625 $\mu$ l
● 2.	16S Primer/Probe Mix (FAM, ROX) *1	5 × conc.	250 $\mu$ l
● 3.	Solution E	10 × conc.	125 $\mu$ l
● 4.	16S Positive Control *2	1 × 10 <sup>6</sup> copies/ $\mu$ l	100 $\mu$ l
● 5.	EASY Dilution (for Real Time PCR) *2		1 ml × 2
			1 ml

\* 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：リアルタイム PCR コンポーネント (1～3) 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。リアルタイム PCR コンポーネント (1～3) は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】

### **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。

### **16S 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。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、レジオネラ由来 16S rRNA 遺伝子のことです。

### **Solution E :**

検体由来の夾雑物等による PCR 阻害を緩和する効果のある試薬です。

### **16S Positive Control :**

レジオネラ由来 16S rRNA 遺伝子用陽性コントロールです。  
検量線作成用のスタンダードとして使用します。

### **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 の希釈溶液です。鋳型 DNA を滅菌水や 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、本品を用いると低濃度までの正確な希釈が可能となります。また、本品は、キャリアーとして tRNA や rRNA などの核酸を使用していないので、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℃

### 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 III with PC（製品コード TP970）
  - 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）

#### 【DNA サンプルの調製に必要なもの】

- ・フィルターホルダー（47 mm メンブレンフィルター用）
- ・メンブレンフィルター（直径 47 mm、孔径 0.22  $\mu$ m；Millipore 社 Code. GTTP04700、Isopore メンブレフィルターなど）
- ・濾過びん           ・滅菌 50 ml コニカルチューブ
- ・吸引ポンプ       ・ボルテックスミキサー
- ・ピンセット       ・2.0 ml マイクロチューブ
- ・微量高速冷却遠心機
- ・NucleoSpin Tissue XS（製品コード 740901.10/.50/.250）
- ・特級エタノール（> 99%）
- ・ヒートブロック（56℃および 70℃で使用可能なもの）
- ・マイクロピペットおよびマイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
- ・Lysis Buffer for *Legionella*（製品コード 9181）（簡易抽出法で調製する場合）

### IV. 使用に際して

本キット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

本キットは環境分析に使用する製品です。

#### 2. 測定結果

- ・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。）

\*：レジオネラ生菌由来 DNA の選択的検出法として、LC EMA-qPCR 法、EMA-qPCR 法も利用可能です。詳しくは、下記ウェブサイトをご参照ください。

[http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic\\_info.php?unitid=U100007673](http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100007673)

[http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic\\_info.php?unitid=U100009352](http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009352)

- ・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。

#### 3. 廃棄

試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検体または検査に用いた器具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、ろ紙の試薬容器ならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

## V. 検出可能な菌種

1. 以下のレジオネラ属菌について本製品での検出が可能であるか否かを確認しています。

出典：厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」：平成 24 年度分担研究報告書

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	本製品での検出
1	NIIB0145	<i>L. adelaidensis</i>		E	1762-AUS-E	49625	++
2	NIIB0040	<i>L. anisa</i>		E	WA-316-C3	35292	++
3	NIIB0405	<i>L. beliardensis</i>		E	Montbe'liard A1	700512	++
4	NIIB0057	<i>L. birminghamensis</i>		C	1407-AL-H	43702	++
5	NIIB0009	<i>L. bozemanii</i>	1	C	WIGA	33217	++
6	NIIB0687	<i>L. bozemanii</i>	2	C	Tronto-3	35545	++
7	NIIB0114	<i>L. brunensis</i>		E	441-1	43878	++
8	NIIB1254	<i>L. busanensis</i>		E	KCTC 12084、K9951	700510	+
9	NIIB0047	<i>L. cherrii</i>		E	ORW	35252	(+)
10	NIIB0113	<i>L. cincinnatiensis</i>		C	72-OH-H	43753	++
11	NIIB0417	<i>L. donaldsonii</i>		C	MDA 2706	BAA-693	++
12	NIIB0406	<i>L. drozanskii</i>		E	LLAP-1	700990	+
13	NIIB0078	<i>L. dumoffii</i>		E	NY 23	33279	++
14	NIIB0049	<i>L. erythra</i>	1	E	SE-32A-C8	35303	++
15	NIIB0146	<i>L. fairfieldensis</i>		E	1725-AUS-E	49588	+
16	NIIB0408	<i>L. fallonii</i>		E	LLAP-10	700992	++
17	NIIB0688	<i>L. feeleii</i>	1	E	WO-44C	35072	+
18	NIIB0689	<i>L. feeleii</i>	2	C	691-WI-H	35849	+
19	NIIB0193	<i>L. geestiana</i>		E	1308	49504	+
20	NIIB0234	<i>L. gormanii</i>		E	LS-13	33297	++
21	NIIB0147	<i>L. gratiana</i>		E	Lyon 8420412	49413	++
22	NIIB0404	<i>L. gresilensis</i>		E	Gre'oux 11D13	700509	+
23	NIIB0690	<i>L. hackeliae</i>	1	C	Lansing 2	35250	++
24	NIIB0691	<i>L. hackeliae</i>	2	C	798-PA-H	35999	+
25	NIIB0053	<i>L. israelensis</i>		E	Bercovier 4	43119	+
26	NIIB0046	<i>L. jamestowniensis</i>		E	JA-26-G1-E2	35298	++
27	NIIB0014	<i>L. jordani</i>		E	BL-540	33623	++
28	NIIB0148	<i>L. lansingensis</i>		C	1677-MI-H	49751	+
29	NIIB0194	<i>L. londiniensis</i>	1	E	1477	49505	+
30	NIIB1255	<i>L. londiniensis</i>	2	E	Mulhouse B26	BAA-518	+
31	NIIB0692	<i>L. longbeachae</i>	1	C	Long Beach 4	33462	++
32	NIIB0693	<i>L. longbeachae</i>	2	C	Tucker 1	33484	++
33	NIIB0045	<i>L. maceachernii</i>		E	PX-1-G2-E2	35300	++
34	NIIB0008	<i>L. micdadei</i>		C	TATLOCK	33218	++
35	NIIB0116	<i>L. moravica</i>		E	316-36	43877	++
36	NIIB0195	<i>L. nautarum</i>		E	1224	49506	+

	ID-No	Species	Serogroup	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	本製品での検出
37	NIIB0036	<i>L. oakridgensis</i>		E	OR-10	33761	(+)
38	NIIB0042	<i>L. parisiensis</i>		E	PF-209C-C2	35299	++
39	NIIB0033	<i>L. pneumophila</i>	7	E	Chicago 8	33823	++
40	NIIB0451	<i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-192		++
41	NIIB0453	<i>L. pneumophila</i>	10	E	H13-206		++
42	NIIB0462	<i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-239		++
43	NIIB0004	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	4	C	Los Angeles-1	33156	++
44	NIIB0005	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	5	E	Dallas 1E	33216	++
45	NIIB0063	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	15	C	Lansing 3	35251	++
46	NIIB0150	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	5	E	U8W	33737	++
47	NIIB0001	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1	C	Philadelphia-1	33152	++
48	NIIB0002	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	2	C	Togus-1	33154	++
49	NIIB0003	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	3	E	Bloomington-2	33155	++
50	NIIB0006	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	6	C	Chicago 2	33215	++
51	NIIB0034	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	8	C	Concord 3	35096	++
52	NIIB0050	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	10	C	Leiden 1	43283	++
53	NIIB0051	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	11	C	797-PA-H	43130	++
54	NIIB0060	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	12	C	570-CO-H	43290	++
55	NIIB0061	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	13	C	82A3105	43736	++
56	NIIB0062	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	14	C	1169-MN-H	43703	++
57	NIIB0304	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	9	E	IN-23-G1-C2	35289	++
58	NIIB0196	<i>L. quateirensis</i>		E	1335	49507	++
59	NIIB0260	<i>L. quinlivanii</i>	2	E	LC870	BAA-538	+
60	NIIB0407	<i>L. rowbothamii</i>		E	LLAP-6	700991	++
61	NIIB0048	<i>L. rubrilucens</i>		E	WA-270A-C2	35304	++
62	NIIB0039	<i>L. sainthelensi</i>	1	E	Mt St Helens 4	35248	++
63	NIIB0207	<i>L. sainthelensi</i>	2	C	Ly176.97	700517	++
64	NIIB0409	<i>L. santicrucis</i>		E	SC-63-C7	35301	++
65	NIIB0149	<i>L. shakespearei</i>		E	214	49655	++
66	NIIB0043	<i>L. spiritensis</i>	1	E	Mt St Helens 9	35249	++
67	NIIB0261	<i>L. spiritensis</i>	2	E	ML76	BAA-537	++
68	NIIB0041	<i>L. steigerwaltii</i>		E	SC-18-C9	35302	+
69	NIIB0262	<i>L. taurinensis</i>		E	Turin I no 1	700508	++
70	NIIB0117	<i>L. tucsonensis</i>		C	1087-AZ-H	49180	++
71	NIIB0032	<i>L. wadsworthii</i>		C	81-716A	33877	++
72	NIIB0206	<i>L. waltersii</i>		E	2074-AUS-E	51914	++
73	NIIB0197	<i>L. worsleiensis</i>		E	1347	49508	++
74	NIIB0305	<i>Legionella</i> genomospecies 1		E	2055-AUS-E	51913	+

---

各レジオネラ菌株の純培養菌より NucleoSpin Tissue XS で DNA を抽出し、DNA 抽出液各 1  $\mu$ l (83 ~ 542 ng) を鋳型として本製品による qPCR を実施した。qPCR 定量結果は、DNA 使用量で補正した後、*L. pneumophila* の平均収量に対して相対化した。

- ++ : *L. pneumophila* とほぼ同等の効率で検出される菌種  
(*L. pneumophila* を 100 とした場合の定量値が 50 以上)
- + : *L. pneumophila* よりやや検出効率が低い菌種  
(*L. pneumophila* を 100 とした場合の定量値が 20 以上)
- (+) : 検出されにくい菌種  
(*L. pneumophila* を 100 とした場合の定量値が 1 未満)

2. 以下の菌種について、クロス反応がないことを確認しています。

*Shigella sonnei*  
*Escherichia coli* VT1/VT2  
*Escherichia coli* VT2  
*Escherichia coli* LT (LTEC)  
*Escherichia coli* ST (ETEC)  
*Vibrio parahaemolyticus*  
*Campylobacter jejuni*  
*Salmonella enterica*  
*Clostridium botulinum*  
*Clostridium perfringens*  
*Staphylococcus aureus*  
*Yersinia enterocolitica*  
*Listeria monocytogenes*  
*Bacillus cereus*

## VI. 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 (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。
- 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。

## VII. 16S Positive Control を用いる定量解析について

本製品に含まれる 16S Positive Control は、レジオネラ由来の 16S rRNA 遺伝子領域を搭載したプラスミド DNA であり、OD<sub>260</sub> 値より換算した値で  $1 \times 10^6$  copies/ $\mu$ l に調整されています。EASY Dilution (for Real Time PCR) を用いて 16S Positive Control の 10 倍希釈系列を作製し、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、定量解析を行うことができます。

ただし、本キットは遺伝子検出用キットであるため、死菌の遺伝子も検出されます。正確な生菌数が必要な場合には、培養法による検査も行う必要があります。

### <解析例>

出典：厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」：平成 24 年度分担研究報告書

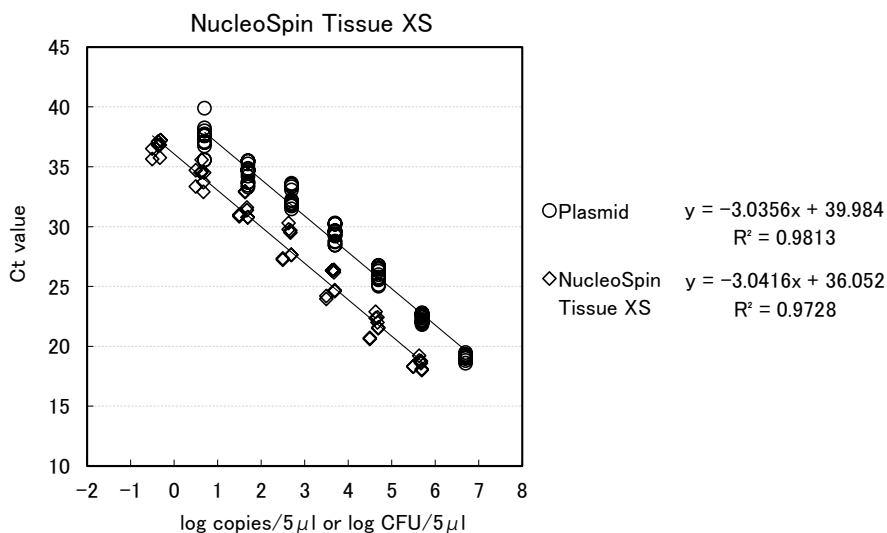


図 2. NucleoSpin Tissue XS を用いて菌液から抽出した DNA の検量線 (16S Positive Control との比較)

プラスミド DNA と抽出 DNA の回帰直線を比較すると、いずれも傾き  $-3.04$  で平行関係にあり、両者の増幅効率に差がないことが示された。得られた切片の差が 3.932 (プラスミドの切片 39.984 と抽出 DNA の切片 36.052 の差) であったことから、30 $^{\circ}$ C 培養 4 日目の菌およびアメーバ培養菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 15 コピー ( $2^{3.932} = 15.3$ ) に相当するものと計算された。



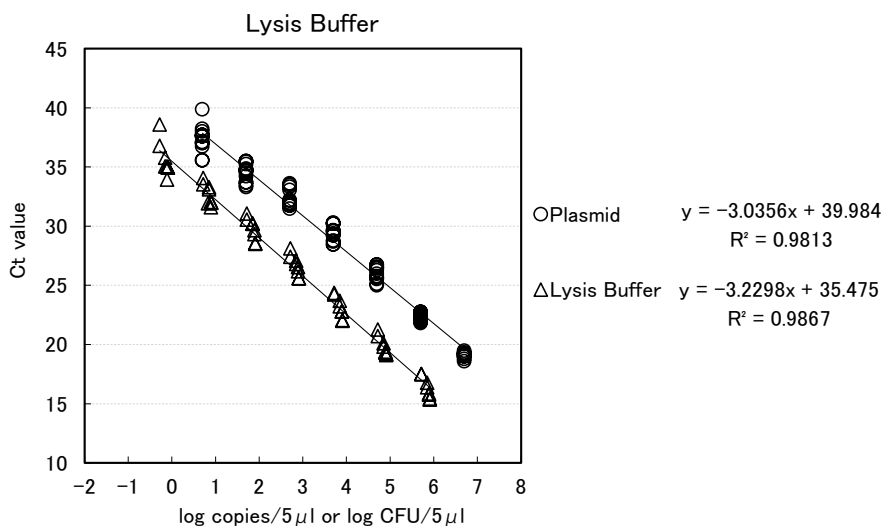


図3. Lysis Buffer (Lysis Buffer for *Legionella*、製品コード 9181) を用いて菌液から抽出した DNA の検量線 (16S Positive Control との比較)

プラスミド DNA と抽出 DNA の回帰直線を比較すると、抽出 DNA の方がやや傾きが大きいもののほぼ平行関係にあり、両者の増幅効率に大きな差がないことが確認された。得られた切片の差が 4.509 (プラスミドの切片 39.984 と抽出 DNA の切片 35.475 の差) であったことから、Lysis Buffer を用いて 30℃ 培養 4 日目の菌およびアメーバ培養菌 1 CFU 相当から得られる 16S rRNA 遺伝子量は、抽出効率や反応効率を含めてプラスミド 23 コピー ( $2^{4.509} = 22.8$ ) に相当するものと計算された。

【注意】

Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (製品コード 7730) や Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0 (製品コード 7714) を用いた EMA 処理によりレジオネラ属菌の死菌由来 DNA を修飾後、本キットを用いてレジオネラ 16S rRNA 遺伝子の検出を行う場合には、純培養菌による検証結果に基づき、別の方法で計算します。詳しくは各製品の取扱説明書をご参照ください。

## VIII. 操作

### VIII-1. 16S Positive Control を用いる定量解析

#### 操作の概要

1. サンプルの調製
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  
16S 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する。  
↓  
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 (EASY Dilution)、または検量線作成用スタンダードサンプル、または検体サンプルを添加する。  
↓  
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  
検量線から検体サンプルのコピー数を求める。  
↓  
菌数 (CFU) に換算する。

#### VIII-1-1. サンプルの調製例 (エリア 2 で実施)

下記は、「第 4 版レジオネラ症防止指針」に記載された「ろ過濃縮法」に沿ったサンプル調製の一例です。

なお、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心がけてください。

- 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、鋳型調製用を分ける)

#### 【試料の濃縮】

1. フィルターホルダー (47 mm フィルター用) に、メンブランフィルター (直径 47 mm、孔径 0.22  $\mu$ m) をセットする。
2. 試料水 500 ml をメンブランフィルターで吸引濾過する。
3. 吸引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50 ml 滅菌コニカルチューブに入れる。
4. チューブに滅菌水を 5 ml 加え、ボルテックスミキサーで 1 分間混和する。
5. 混和液 1 ml を 1.5 ml 用マイクロチューブにとる。
6. 13,000 ~ 15,000 rpm で 4°C、5 分間遠心分離後、DNA 抽出方法に応じて上清を除去する。

#### NucleoSpin Tissue XS を用いる場合

上清 940  $\mu$ l をマイクロピペットで穏やかに吸い取って除去し、残渣液を 60  $\mu$ l 残す。

#### Lysis Buffer for *Legionella* を用いる場合

すべての上清をマイクロピペットで穏やかに吸い取って除去する。ペレットを吸わないように注意すること (少量の液体が残っても問題はない)。

## 【DNA 抽出】

DNA 抽出法には、Lysis Buffer for *Legionella* による簡易抽出法と NucleoSpin Tissue XS によるカラム精製法の 2 種類の方法があります。簡易抽出法は、操作が簡便で抽出効率も高いことから、塩素消毒が施された循環式浴槽の検体など汚染の少ない検体に適しています。一方、泉質による PCR 反応阻害が予想される検体にはカラム精製法が適しています。

実験にあたっては、手袋、マスク、防御眼鏡を使用し、安全キャビネット内で操作してください。

### NucleoSpin Tissue XS を用いた方法 (カラム精製法)

1. 残渣液 60  $\mu$ l に Buffer T1 を 160  $\mu$ l 加える。軽く混合して、スピンドウンする。
2. さらに Proteinase K\*1 を 16  $\mu$ l 加える。ボルテックスにて混合 (5 秒  $\times$  2) して、スピンドウンする。
3. 56°C、10 分間インキュベートする。
4. スピンドウンしたサンプルに Buffer B3 を 160  $\mu$ l 加える。ボルテックスにて混合 (5 秒  $\times$  2) して、スピンドウンする。
5. 70°C、5 分間インキュベートし、ボルテックスする。
6. 各サンプルが室温に戻ったことを確認して、スピンドウンしたサンプルにエタノール (96 ~ 100%) を 160  $\mu$ l 加え、ボルテックスにて混合 (5 秒  $\times$  2) して、軽くスピンドウンする。
7. NucleoSpin Tissue XS Column を Collection Tube (2 ml) にセットする。
8. 6. の溶液をカラムに添加し、11,000  $\times g$ 、1 分間遠心する。
9. カラムを新しい Collection Tube (2 ml) にセットする。
10. カラムに Buffer B5\*2 を 50  $\mu$ l 添加し、11,000  $\times g$ 、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。
11. カラムに Buffer B5\*2 を 50  $\mu$ l 添加し、11,000  $\times g$ 、2 分間遠心する。カラム上に液が残っていないことを確認する。
12. カラムを 1.5 ml マイクロチューブにセットする。
13. カラムに Buffer BE を 25  $\mu$ l 添加し、11,000  $\times g$ 、1 分間遠心し、DNA 溶液を回収する。(溶出 1 回目)
14. 再度、13. の操作を行う。(溶出 2 回目)
15. 回収液 50  $\mu$ l のうち、5  $\mu$ l をリアルタイム PCR に用いる。

\* 1 : Proteinase K : 製品コード 740901.50 (50 回用) の場合  
20 mg (1 vial) の Proteinase K (凍結乾燥品) に、Proteinase Buffer を 1 ml 加え溶解してください。溶解後の Proteinase K 溶液は - 20°C で保存してください。

\* 2 : Buffer B5  
Wash Buffer B5 (concentrate) 2 ml あたり、エタノールを 8 ml 加えてください。

### Lysis Buffer for *Legionella* を用いた方法 (簡易抽出法)

※製品の取扱説明書に従って操作してください。

1. 沈殿物に Lysis Buffer for *Legionella* を 50  $\mu$ l 添加し、ボルテックスで軽く混合した後、スピンドウンする。
2. 95°C で 10 分間インキュベートする。
3. ボルテックスで軽く混合した後、15,000 rpm (最高速度)、4°C で 10 分間遠心する。
4. 氷上で 5 分間静置する。
5. 上清 25  $\mu$ l を DNA 溶液として回収する。
6. 回収液のうち、5  $\mu$ l をリアルタイム PCR に用いる。

## VIII-1-2. 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レジオネラ由来16S rRNA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、ネガティブコントロール反応を一緒に行ってください。

1. 16S Positive Control ● を用いて、検量線作成用の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 ○ で以下の1~5の濃度の段階希釈液を調製する。(1反応にはそれぞれ5 μlを使用。N=2以上での反応を推奨)

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| (1) 10 <sup>6</sup> copies/μl | 16S Positive Control 原液                                       |
| (2) 10 <sup>5</sup> copies/μl | 16S Positive Control 原液 5 μl + EASY Dilution 45 μl            |
| (3) 10 <sup>4</sup> copies/μl | (2) の 10 <sup>5</sup> copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl |
| (4) 10 <sup>3</sup> copies/μl | (3) の 10 <sup>4</sup> copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl |
| (5) 10 <sup>2</sup> copies/μl | (4) の 10 <sup>3</sup> copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl |
| (6) 10 copies/μl              | (5) の 10 <sup>2</sup> copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl |

2. 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 μl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EASY Dilution ○ を5 μl加え、反応チューブのキャップをしっかりと閉める。(N=2以上での反応を推奨)

試薬	液量 (1反応)	最終濃度
2 × Cyclecleave Reaction Mixture ●	12.5 μl	1 ×
16S Primer/Probe Mix (FAM, ROX) (5 × conc.) ●	5 μl	1 ×
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 または EASY Dilution ○	(5 μl) *	
Solution E ●	2.5 μl	
Total	25 μl	

\* : 検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えません。

エリア3へ移動する。

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反応チューブについて、検体サンプルや検量線作成用スタンダードサンプルを、2. で分注した調製液に添加し、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。

### VIII-1-3. 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、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「絶対定量」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 一定量解析（絶対定量モード）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。

PCR 条件 ※ Speed は “Fast” を選択してください。

< Dice III の場合 >

初期変性 (Hold)

Cycle : 1  
95°C 10 秒

3 step PCR

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

< Dice II / Lite の場合 >

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)

#### 検出フィルター

FAM  
ROX

#### サンプルタイプ

陰性コントロール

サンプルタイプ : NTC (No Template Control)

検量線用スタンダード

サンプルタイプ : STD (Standard)

初期鋳型量 :  $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^6$  copies

検体サンプル

サンプルタイプ : UNKN (Unknown)

サンプル名	サンプルタイプ	初期鋳型量 (検量線設定)
Negative control	NTC	—
Control DNA	STD	5.00E+001 (50 コピー)
Control DNA	STD	5.00E+002 (500 コピー)
Control DNA	STD	5.00E+003 (5,000 コピー)
Control DNA	STD	5.00E+004 (50,000 コピー)
Control DNA	STD	5.00E+005 (500,000 コピー)
Control DNA	STD	5.00E+006 (5,000,000 コピー)
Sample ⋮ ⋮	UNKN	—

---

【Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) 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 25 秒 (検出)

#### Passive Reference

(none)

#### Define Targets

Target Name : 16S、 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)

検量線用スタンダード

サンプルタイプ : Standard

初期鋳型量 :  $5 \times 10 \sim 5 \times 10^6$  copies

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。

### VIII-1-4. 定量解析

リアルタイム PCR の結果として得られたコピー数を以下の式で菌数 (CFU) に換算します。ただし、本キットは遺伝子検出用キットであるため、死菌の遺伝子も検出されます。正確な生菌数が必要な場合には、培養法による検査も行う必要があります。

#### 1. コピー数から菌数 (CFU) への換算

- ・ NucleoSpin Tissue XS を用いた方法 (カラム精製法) :  $CFU = \text{コピー数} / 15$
- ・ Lysis Buffer for *Legionella* を用いた方法 (簡易抽出法) :  $CFU = \text{コピー数} / 23$

#### 2. 検水 100 ml 中の菌数 (CFU) への換算 (VIII-1-1. の操作法で行った場合)

VIII-1-1. の操作法の場合、1. でコピー数から換算した菌数 (CFU) は検水 10 ml 中の値に相当します。したがって、どちらの DNA 抽出法を用いた場合でも、1. で得た菌数を 10 倍することで 100 ml 検水中の菌数 (CFU) に換算できます。

※ 「VII. 16S Positive Control を用いる定量解析について」を参照。

※ 解析手順の詳細は、別冊の「リアルタイム PCR によるレジオネラ属菌検出」をご参照ください。

## VIII-2. オプション：＋／－判定での解析

＋／－判定では、ターゲット遺伝子が陽性か、検出限界以下であるかを判定します。この場合、検量線用スタンダードサンプルを調製する必要はありません。

### 操作の概要

1. サンプルの調製 (10 ページ参照)
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 (EASY Dilution)、または検体サンプル、または陽性コントロール (16S Positive Control) 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

### VIII-2-1. 反応液の調製と反応開始

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 20  $\mu$ l ずつ分注して軽くキャップを閉める。その内の 1 本に陰性コントロールとして EASY Dilution ● を 5  $\mu$ l 加え、反応チューブのキャップをしっかりと閉める。(N = 2 以上での反応を推奨)

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture ●	12.5 $\mu$ l	1 ×
16S Primer/Probe Mix (FAM, ROX) (5 × conc.) ●	5 $\mu$ l	1 ×
検体サンプルまたは 16S Positive Control ● または EASY Dilution ●	(5 $\mu$ l) *	
Solution E ●	2.5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l	

\* : 検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えません。

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ついて、検体サンプルや 16S Positive Control (陽性コントロール) を、1. で分注した調製液に添加し、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。

---

## VIII-2-2. リアルタイム PCR 装置による増幅・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 III 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 一定性解析 (+/-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。

PCR 条件 ※ Speed は “Fast” を選択してください。

初期変性 (Hold)

Cycle : 1

95°C 10 秒

3 step PCR

Cycle : 45

95°C 5 秒

55°C 20 秒

72°C 20 秒 (検出)

検出フィルター

FAM

ROX

サンプルタイプ

陰性コントロール : NC (Negative Control)

陽性コントロール : PC (Positive Control)

検体サンプル : UNKN (Unknown)

### 【Thermal Cycler Dice Real Time System II / Lite の場合】

食品環境検査用ソフトウェアの「+/-判定 (CycleavePCR Kit)」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 - CycleavePCR キットによる定性解析用-」(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。

PCR 条件 ※ Speed は “Fast” を選択してください。

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)

検出フィルター

FAM

ROX

サンプルタイプ

陰性コントロール : NC (Negative Control)

陽性コントロール : PC (Positive Control)

検体サンプル : UNKN (Unknown)



### VIII-2-3. 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 (16S rRNA)	増幅シグナル (+)	16S rRNA 遺伝子陽性*1	16S rRNA 遺伝子陽性*1
	増幅シグナル (-)	16S rRNA 遺伝子 検出限界以下*2	判定不能*3

判定結果表 2：

ポジティブコントロール (16S 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 (16S rRNA)	増幅シグナル (+)	16S 検出系に問題なし	16S 検出系に問題なし
	増幅シグナル (-)	16S 検出系に問題あり*4	判定不能*3

判定結果表 3：

ネガティブコントロール (EASY Dilution を添加したもの)

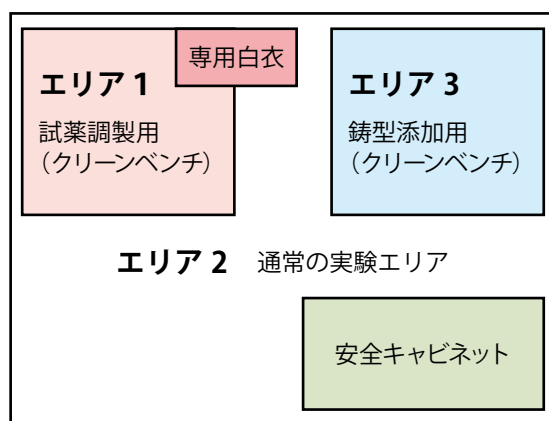
		ROX (インターナルコントロール)	
		増幅シグナル (+)	増幅シグナル (-)
FAM (16S rRNA)	増幅シグナル (+)	16S コンタミネーションの疑い*5	16S コンタミネーションの疑い*5
	増幅シグナル (-)	16S コンタミネーションはない	判定不能*3

- \* 1：インターナルコントロールの (+) / (-) に関わらず、16S rRNA 遺伝子が陽性である。ネガティブ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：ポジティブ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。
- \* 4：16S 増幅用プライマーあるいは 16S 検出用プローブに問題があるか、16S ポジティブコントロールが分解している。
- \* 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。

## IX. 判定結果についての注意事項

- ・ 陰性コントロール反応で 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。
- ・ スタンダードサンプルおよび陽性コントロールの反応で 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
  - 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。
- ・ スタンダードサンプルおよび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
  - 16S Primer/Probe Mix に問題がある、または、16S 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、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
  - 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、インターナショナルコントロール 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。

## 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

- 1) Fields B S, Benson R F, and Besser R E. Legionella and Legionnaires' disease:25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* (2002) **15**: 506-526.
- 2) Benin A I, Benson R F, and Besser R E. (2002) Trends in legionnaires disease, 1980-1988: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin Infect Dis.* (2002) **35**: 1039-1046.
- 3) 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合事業)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」：平成 24 年度分担研究報告書
- 4) 「第 4 版レジオネラ症防止指針」(発行：公益財団法人 日本建築衛生管理教育センター)

## XII. 関連製品

NucleoSpin Tissue XS (製品コード 740901.10/.50/.250)  
Lysis Buffer for *Legionella* (製品コード 9181)  
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)  
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)

### <レジオネラ属菌 生菌検出法 (LC EMA-qPCR 法) >

Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (製品コード 7730)  
*Legionella* LC Medium Base (製品コード 9016)  
Lysis Buffer for *Legionella* (製品コード 9181)

### <レジオネラ属菌 生菌検出法 (EMA-qPCR 法) >

Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0 (製品コード 7714)  
Lysis Buffer for *Legionella* (製品コード 9181)

### <水質検査に>

Cycleave RT-PCR *Cryptosporidium* (18S rRNA) Detection Kit (製品コード CY230)  
Cycleave RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit (製品コード CY231)

## 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。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**