

製品コード CY290

研究用

Takara

**Control Test Kit
(Viable Bacteria Selection)**

説明書

v201904Da

本キットは、生菌由来 DNA を選択的に検出するために Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズを用いて行う前処理 (EMA 処理) 操作が、検体成分等に由来する反応阻害を受けることなく正しく行われたことを確認するために使用します。Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズの試薬コンポーネントには、反応確認用のプラスミド DNA があらかじめ添加されており、検体に対して前処理が正しく行われるとこのプラスミド DNA も同時に修飾を受け、PCR 増幅できない状態になります。したがって、プラスミド DNA 上の領域をターゲットとして PCR 増幅を行うことで、前処理操作が阻害を受けずに行われたかどうかを確認することができます。

なお、増幅産物の検出はリアルタイム PCR (qPCR：サイクリングプローブ法で検出)、エンドポイント PCR (アガロースゲル電気泳動で検出) のどちらでも行うことができます。

リアルタイム PCR の場合、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。

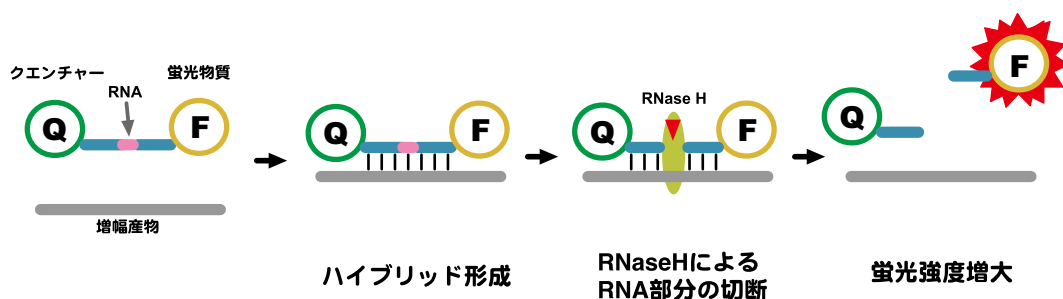


図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. 内容 (25 μ l 反応、50 回分)

1.	2 \times Cyclecleave Reaction Mixture* ¹	2 \times conc.	625 μ l
2.	Primer/Probe Mix* ²	5 \times conc.	250 μ l
3.	dH ₂ O		1 ml
4.	Positive Control* ³		125 μ l

* 1： 酵素、バッファー、dNTP mixture を含む qPCR/PCR 反応試薬です。

* 2： 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。

* 3： Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズに添加されているものと同一のプラスミド DNA です。本製品による PCR 増幅対象領域は、既知の微生物ゲノム DNA と顕著な相同性を有していないことを確認しています。

II. 保存 - 20°C

III. キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

【リアルタイム PCR 検出の場合】

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)
解析には、食品環境検査用ソフトウェア、または Thermal Cycler Dice Real Time System Software を用いてください。
- Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) など

【エンドポイント PCR 検出の場合】

サーマルサイクラー

- TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch* (製品コード TP350)
- TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Gradient* (製品コード TP600) など

電気泳動装置

- Mupid-One (製品コード O1-01)
- Mupid-2plus (製品コード M-2P)
- Mupid-exU (製品コード EXU-1) など

UV トランスイルミネーター (300 nm 前後のもの)

電気泳動ゲル撮影用装置

(SYBR® Green I を使用する場合は専用のフィルターが必要です。)

アガロース

- PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
- Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)

電気泳動用 buffer

- Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3 (製品コード T9131)
- TBE (Tris-borate-EDTA) powder (製品コード T905)

DNA マーカー

- 100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)
- φX174-*Hae* III digest (製品コード 3405A/B)

Loading buffer (6 × Loading Buffer) (上記の DNA マーカーに添付)

DNA 染色剤

- SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
- エチジウムブロマイド

【その他】

- 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)
- 卓上遠心機

IV. 操作上の注意

1. 本キットはリアルタイム PCR、エンドポイント PCR のどちらでも使用できます。反応液組成は共通です。増幅、検出、判定についてはそれぞれの操作方法に従ってください。
2. 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。
3. ヌクレアーゼの混入によりキメラプローブやプライマーが分解されると、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。
4. リアルタイム PCR 検出では、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。エンドポイント PCR の場合はさらにエリア4を設定し、電気泳動で検出を行います (VII. 補足: エリア分けについてを参照)。コンタミネーション発生の原因となりますので、エリア1~3においては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。
 - エリア4: 電気泳動等でエンドポイント PCR の増幅産物を解析します。
5. リアルタイム PCR により結果判定を行う場合、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。

V. 操作

操作の流れ

1. サンプルの調製
Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズによる前処理を行い、NucleoSpin Tissue XS 等を用いて DNA を抽出する。
2. qPCR/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、滅菌精製水 (陰性コントロール)、または検体サンプル、または Positive Control を添加する。
↓
反応チューブを qPCR/PCR 装置にセットし、反応を開始する。
↓
4. 検出

【リアルタイム PCR】 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	【エンドポイント PCR】 反応終了 ↓ アガロースゲル電気泳動で確認 ↓ 判定
---	---

V-1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

検体の懸濁液を用意し、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズによる前処理を行った後、NucleoSpin Tissue XS 等による DNA 抽出を行う (操作方法は、各製品の取扱説明書を参照)。

V-2. 反応液の調製と反応開始 (リアルタイム PCR、エンドポイント PCR で共通です。)

コントロール反応について

本キットでは、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズの試薬コンポーネントに添加されているプラスミド DNA を qPCR/PCR で増幅しますが、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズによる前処理が正しく行われると増幅産物が検出されません。PCR 反応自体の成否を確認するために、必ず Positive Control を用いた陽性コントロール反応を同時に行ってください。また、コンタミネーションの有無を確認するためにサンプルのかわりに滅菌精製水を加える陰性コントロール反応も同時に行うことをお勧めします。

- (1) 下記に示す反応液を氷上で調製する (エリア 1 で実施)。
鋳型 (検体サンプル等) 以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、反応チューブに 20 μ l ずつ分注して軽くふたをする。必要本数として、サンプル数 + 2 本 (Positive Control、陰性コントロールとして滅菌精製水を加えるもの) を準備する。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
2 \times Cycleave Reaction Mixture	12.5 μ l	1 \times
Primer/Probe Mix (5 \times conc.)	5 μ l	1 \times
検体サンプル or Positive Control or 滅菌精製水	(5 μ l) *	
dH ₂ O	2.5 μ l	
Total	25 μ l	

* : 検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。

- (2) 陰性コントロールとして、サンプルの代わりに滅菌精製水を加えたものを 1 本調製し、しっかりふたをする。(エリア 3 へ移動)
- (3) サンプル (鋳型) の添加 (エリア 3 で実施)
(1) で分注した残りのチューブについて、サンプルまたは Positive Control を調製液に添加し、しっかりふたをする。
【注意】リアルタイム PCR では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する。蓋を閉めるときは手袋を着用する。
- (4) 0.2 ml チューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、qPCR/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する。

V-3. 増幅、検出および判定

V-3-1. リアルタイム PCR の場合

操作の手順は、リアルタイム PCR 装置の機種により異なります。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。

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方法と、結果の判定について示します。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System の場合 】

- (1) ランファイルを新規作成し、解析タイプ<+/-判定 (CycleavePCR Kit)>を選択する。

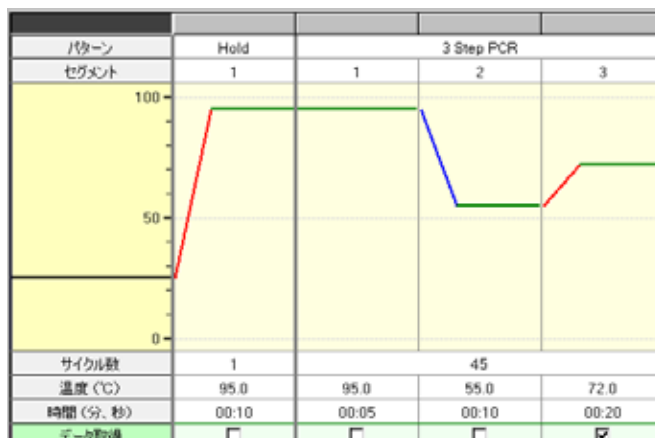


※ 解析タイプ<+/-判定 (CycleavePCR Kit)>は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、Experiment Type <PM(M) Plus/Minus Assay >を使用します。

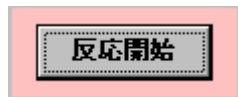
解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、弊社ウェブサイトのお問い合わせ>ダウンロードサービスの「Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードしてください。

- (2) 反応条件設定画面では、検出フィルターはFAM と ROX の両方にチェックが入っており (これは変更できません)、PCR 条件は以下の条件になっていることを確認する (変更は可能ですが、このデフォルト値を使用します)。

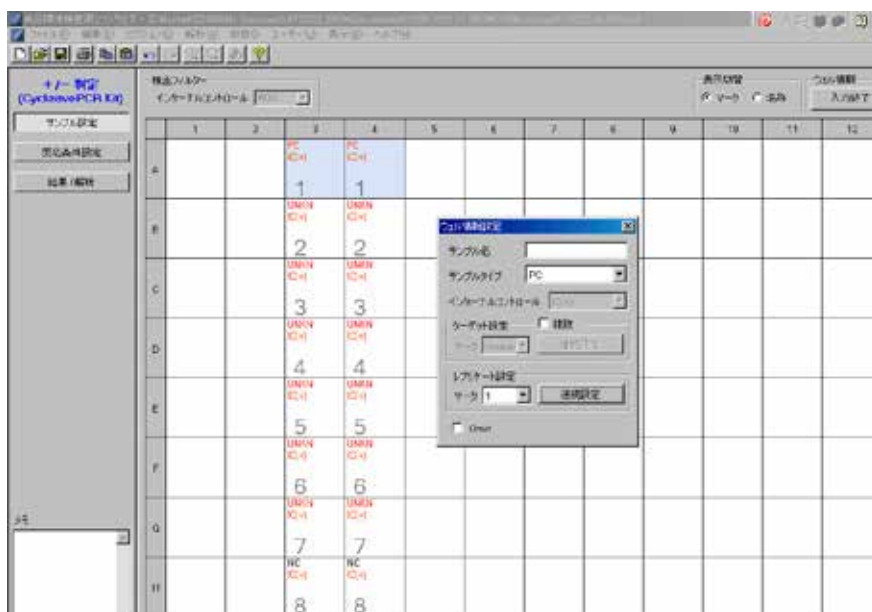
初期変性 (Hold)
Cycle : 1
95°C 10 秒
3 step PCR
Cycle : 45
95°C 5 秒
55°C 10 秒
72°C 20 秒 (検出)



- (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サンプル情報の設定を行う。6 検体サンプル、陰性コントロール、陽性コントロール、各 2 連で行う場合の例を示す。

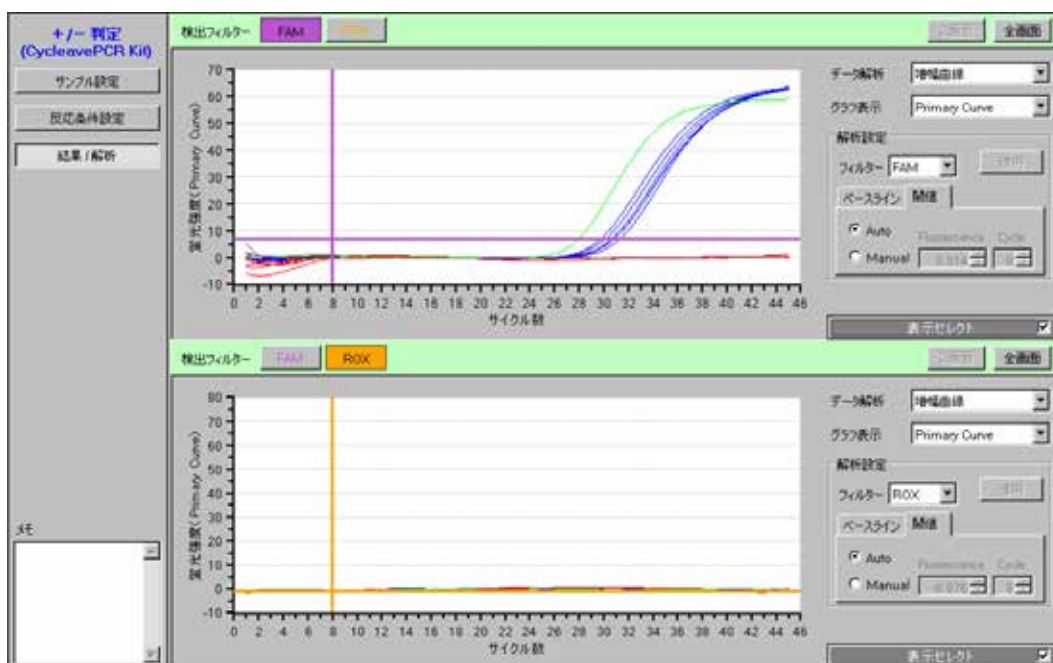


反応に使用しないウェルは Omit 設定する。

※判定の信頼性を高めるため、2 連以上での反応を推奨します。

(5) 結果解析

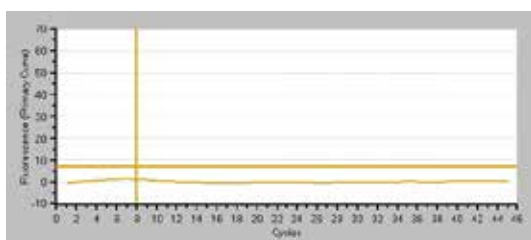
1. 反応終了後、“結果／解析” ボタンをクリックする。



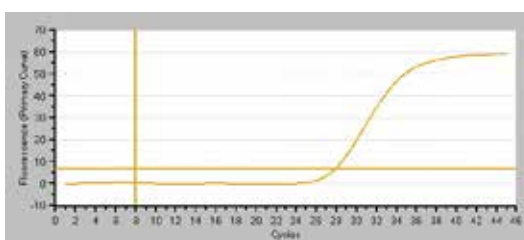
二画面の上部に FAM、下部に ROX の増幅曲線が表示されるが、本製品では FAM の結果のみ確認する。(本製品では、ROX は検出に使用しません。)

2. NC (陰性コントロール反応) および Positive Control (陽性コントロール反応) での増幅曲線を確認する。
NC において蛍光シグナル変化の無いベースラインが得られ、閾値を超えていないことを確認する。PC 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。

NC



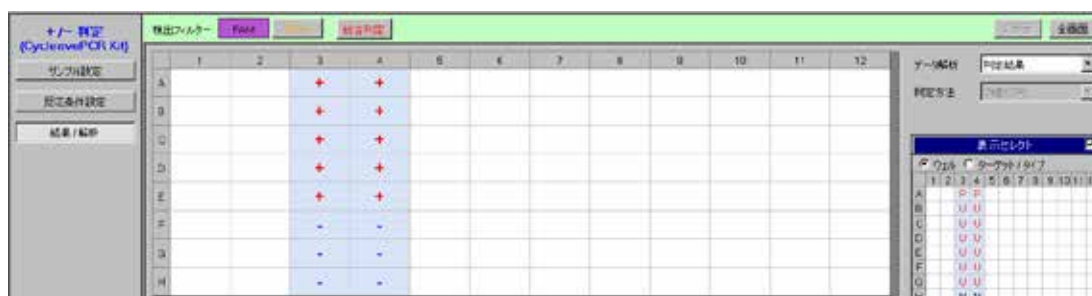
Positive Control



3. 表示セレクトで「U」を選択し、ベースラインや増幅曲線が正常に描かれていることを確認する。

(6) 結果の表示

データ解析<<判定結果>>にする。検出フィルター FAM ボタンをクリックする。



◆判定結果についての注意事項

- ・ 陰性コントロールの反応で、増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られた場合 (判定結果では、+と表示される) :
→ 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 (判定結果では、-と表示される) :
→ 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。

陰性コントロール反応、陽性コントロール反応で適切な結果が得られ、検体サンプルを鋳型とした反応で増幅産物が検出されなければ、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズによる前処理操作が阻害を受けることなく正しく行われたことがわかります。前処理を行った検体サンプルでの生菌由来 DNA 検出を実施してください。一方、検体サンプルを鋳型とした反応で増幅産物が検出された場合には、検体に由来する成分が前処理操作を阻害した可能性が高いため、検体からの夾雑物の除去あるいは検体の希釈などを検討してください。

※ プラスミド DNA と細菌では、前処理の作用が異なる場合があります。各菌種に対する前処理の効果については、予め死菌を用いた条件検討により確認してください (Viable Bacteria Selection Kit for PCR 取扱説明書参照)。

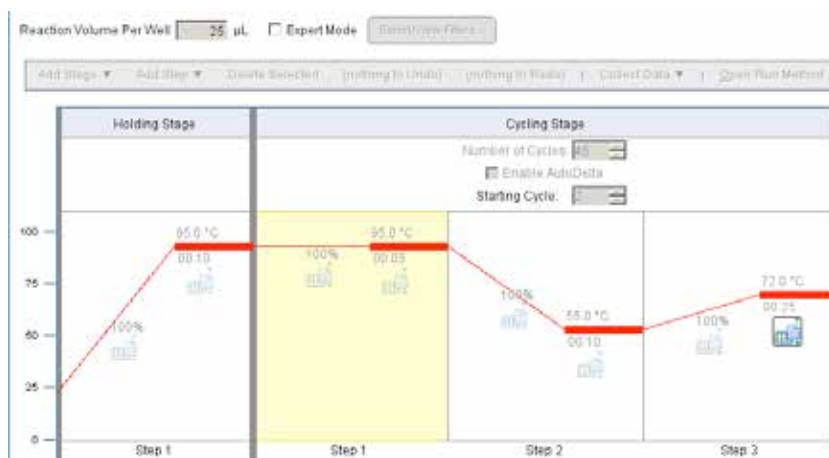
【 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合 】

増幅反応は以下の手順で行う。

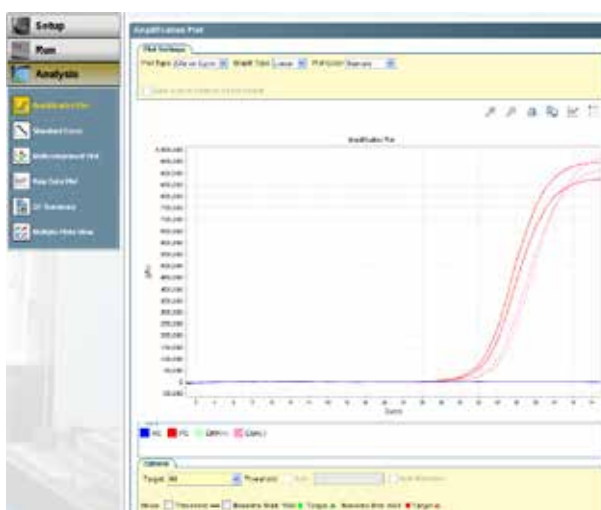
- (1) Advanced Setup で New Experiment を作成する。
- (2) Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan Reagents または Other を選択する。(Other を選択した場合は Include Melt Curve の は外しておく。)
- (3) Plate Setup の Define Target にて Reporter を FAM、Quencher を (none) にしたものを作成する。
- (4) Define Samples にて NC、PC とサンプルを設定する。
- (5) (3)、(4) で作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。
Passive Reference は (none) にする。

(6) Instrument タブをクリックし、以下の反応条件を入力する。

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)



- (7) 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。
 (8) 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線が確認できる。
 ※ Threshold、Baseline は必要に応じて Manual にて設定する必要があります。



(9) View Well Table タブをクリックして結果のデータを参照できる。

#	Well	Omit	Sample No.	Target Name	Task	Dyes	Co
Monitoring_CY290							
1	A0	<input type="checkbox"/>	NC	Monitoring_C..._NTC	FAM-None	Unc	
2	B6	<input type="checkbox"/>	NC	Monitoring_C..._NTC	FAM-None	Unc	
3	C6	<input type="checkbox"/>	EMA(+)	Monitoring_C..._USP-NONH	FAM-None	Unc	
4	D6	<input type="checkbox"/>	EMA(+)	Monitoring_C..._USP-NONH	FAM-None	Unc	
5	E6	<input type="checkbox"/>	EMA(-)	Monitoring_C..._USP-NONH	FAM-None	Unc	
6	F6	<input type="checkbox"/>	EMA(-)	Monitoring_C..._USP-NONH	FAM-None	Unc	
7	G6	<input type="checkbox"/>	PC	Monitoring_C..._STANDARD	FAM-None	Unc	
8	H6	<input type="checkbox"/>	PC	Monitoring_C..._STANDARD	FAM-None	Unc	

V-3-2. エンドポイント PCR の場合

エンドポイント PCR の場合は、反応終了後アガロースゲル電気泳動を行い、目的サイズ (162 bp) のバンドを検出することで判定を行います。

(1) 以下の条件で PCR 増幅を行う。

95°C	10 秒	} 45 サイクル
↓		
95°C	5 秒	
55°C	10 秒	
72°C	20 秒	

(2) PCR 反応液 5 μ l をアガロースゲル電気泳動に供す。(エリア 4 で実施)

目的の増幅産物は 162 bp であるため、3% PrimeGel Agarose PCR-Sieve や 2% Agarose L03 の使用を推奨する。

(3) エチジウムブロマイド等でゲルを染色し、検出を行う。

(4) 陽性コントロールでバンドが検出され、陰性コントロールではバンドが検出されないことを確認する。

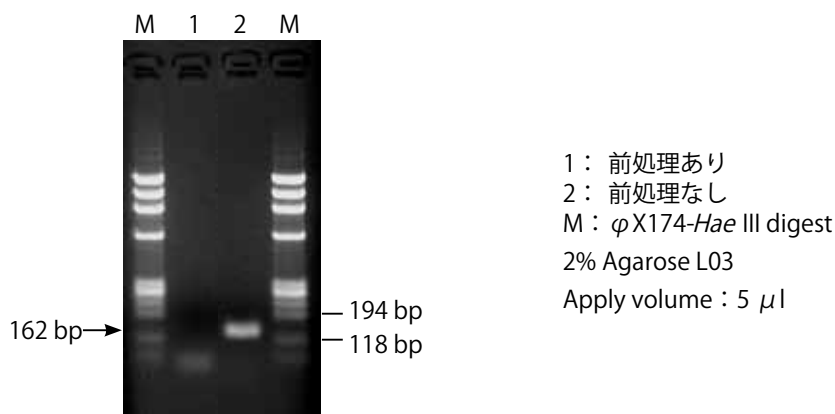


図 2. アガロースゲル電気泳動による確認

◆判定結果についての注意事項

- ・ 陰性コントロールの反応で、目的サイズ (162 bp) のバンドが検出された場合：
→ 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で、目的サイズ (162 bp) のバンドが検出されなかった場合：
→ 何らかの原因で PCR 増幅が正常に行われていない。再反応を行う。

陰性コントロール反応、陽性コントロール反応で適切な結果が得られ、検体サンプルを鋳型とした反応で増幅産物が検出されなければ、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズによる前処理操作が阻害を受けることなく正しく行われたことがわかります。前処理を行った検体サンプルでの生菌由来 DNA 検出を実施してください。一方、検体サンプルを鋳型とした反応で増幅産物が検出された場合には、検体に由来する成分が前処理操作を阻害した可能性が高いため、検体からの夾雑物の除去あるいは検体の希釈などを検討してください。

※ プラスミド DNA と細菌では、前処理の作用が異なる場合があります。各菌種に対する前処理の効果については、予め死菌を用いた条件検討により確認してください (Viable Bacteria Selection Kit for PCR 取扱説明書参照)。

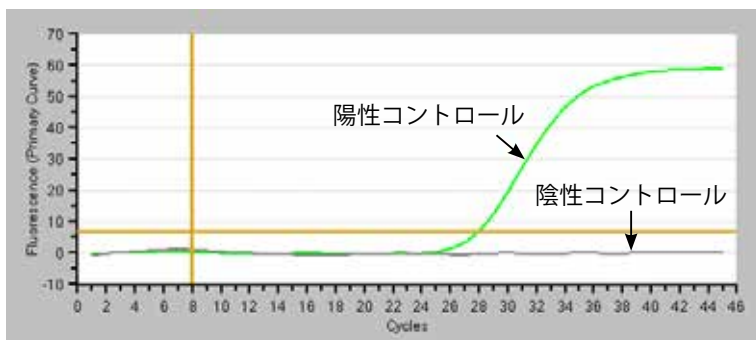
VI. 実験例

【方法】

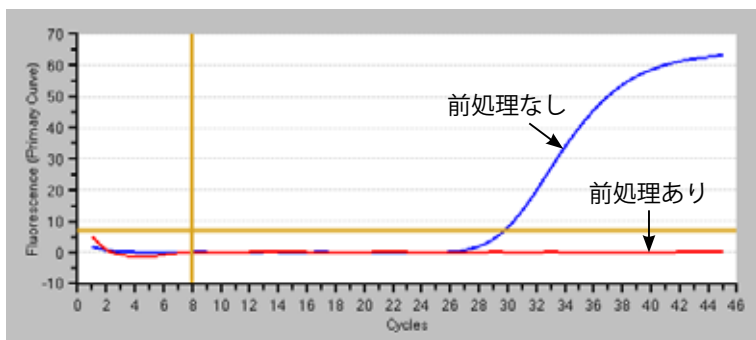
Viable *Legionella* Selection Kit for PCR を用いて培養レジオネラ菌懸濁液の前処理を行った。その際、比較対象として前処理を行わないサンプルも用意した。続いて NucleoSpin Tissue XS による DNA 抽出を行い、得られた DNA を鋳型として本製品による前処理の成否の確認をリアルタイム PCR で行った。

【結果】

前処理を行わなかった DNA からは陽性コントロールと同様に増幅曲線が得られたが、前処理を行った DNA からは増幅が起こらず、正しく前処理が行われたことが確認された。

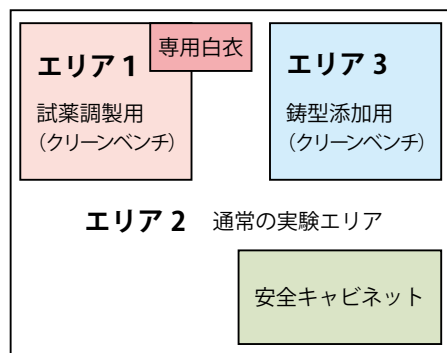


陽性コントロールおよび陰性コントロールの結果



前処理ありサンプルおよび前処理なしサンプルの結果

VII. 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
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。
- エリア4：PCR 産物を取扱うエリア
PCR 後の増幅産物を電気泳動する場合は、エ
リア1、2、3 とは異なる別室で行う。

VIII. 関連製品

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (製品コード 7700)
Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive) (製品コード 7705)
Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (製品コード 7730)
Viable *Legionella* Selection Kit for PCR Ver.2.0 (製品コード 7714)
NucleoSpin Tissue XS (製品コード 740901.10/.50/.250)

Thermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード TP900/TP960)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
96 well 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)
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)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)

IX. 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。
- ・Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Life Technologies Corporation の登録商標です。PrimeGel 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