

製品コード MR101～MR107
MR109～MR113
MR201～MR205
MR207、MR208

食品・環境分析用

Takara

QuickPrimer (Real Time) シリーズ
病原因子遺伝子検出用
細菌遺伝子検出用

説明書

目次

I.	概要.....	3
II.	原理.....	4
III.	内容 (20 μ l 反応系、100 回分).....	6
IV.	保存.....	7
V.	本製品以外に必要な試薬および機器など (主なもの).....	8
VI.	使用に際して.....	9
VII.	操作上の注意.....	9
VIII.	操作.....	10
	VIII-1. サンプルの調製.....	10
	VIII-2. 反応液の調製.....	12
	VIII-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出.....	14
IX.	判定方法.....	20
X.	プライマーの特異性.....	21
XI.	トラブルシューティング.....	22
XII.	補足：エリア分けについて.....	23
XIII.	参考文献.....	23
XIV.	関連製品.....	24
XV.	注意.....	24

I. 概要

本製品は、主な食中毒病原菌および下痢性病原菌を、インターカレーター法によりリアルタイム PCR で検出するためのプライマーシリーズです。

現在、食中毒や下痢症の原因として多くの微生物が知られています。これまで病原体の分離や原因毒素の検出には、培養法などを用いて結果判定までに数日が必要でしたが、PCR 法を利用してその遺伝子を迅速に検出することで、より短時間のうちに検出結果が得られるようになりました。さらに増幅産物をリアルタイムで検出するリアルタイム PCR 法が開発され、さらなる迅速化・簡便化が実現されつつあります。

本プライマーは、特定の菌または病原因子の遺伝子の極めて特異的な配列部分に相補するよう設計されたリアルタイム PCR 専用のプライマーです。Thermal Cycler Dice® Real Time System III 等のリアルタイム PCR 専用装置を使用し、本プライマーと TB Green® *Premix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B) * を組み合わせて反応を行います。得られた増幅曲線と Ct 値 (PCR 増幅産物がある一定量に達した時のサイクル数)、および、融解曲線分析の結果得られた Tm 値 (融解曲線分析において PCR 産物が 1 本鎖に解離した温度) により結果を判定します。TB Green によるインターカレーター法のリアルタイム PCR 検出は、蛍光プローブを準備する必要がなく、2 × 濃度のプレミックスタイプの試薬である TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) に、Primer Mix とサンプル DNA を添加するだけで、非常に簡便・迅速に病原因子または細菌の遺伝子検出を行うことができます。従来行っていた電気泳動も不要です。

また、本プライマーシリーズはすべて同一の PCR 条件で反応を行うため、複数のプライマーによる反応を同時に実施でき、一度に複数種の検出が可能です。

本製品は、岐阜大学大学院 医学系研究科病原体制御学分野 教授 江崎孝行先生のご協力のもとに開発いたしました。

<注意>

- 本プライマーシリーズは、TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B) と組み合わせて使用するよう判定基準を設定しています。他の試薬を用いた場合、正確な判定ができませんので、必ず TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) と組み合わせてご使用ください。
- PCR 反応は、本取扱説明書に記載の条件で実施してください。
- 各プライマーでの標準的な増幅曲線および融解曲線のパターンは、それぞれのデータシートをご確認ください。

* : タカラバイオでは、インターカレーター法のリアルタイム PCR (qPCR) 試薬の製品名を、2017 年 10 月下旬より順次、「TB Green シリーズ」に名称変更いたします。製品コードや試薬の性能に変更はありません。これまで通りご使用ください。

II. 原理

本プライマーを用いて、TB Green *Premix Ex Taq* によりターゲット特異的な PCR 増幅を行います。

PCR 増幅産物は、TB Green によりリアルタイムでモニタリングできます。(リアルタイムに得られる蛍光強度をもとに増幅曲線が作成されます。)

引き続き融解曲線分析を実施します。

1. PCR 法

PCR 法は、微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで短時間に目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることが出来ます。

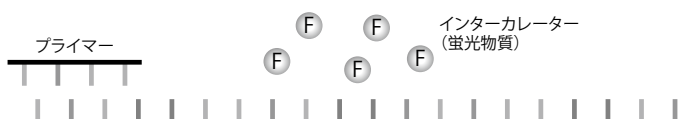
本製品では、増幅用試薬として Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq*® HS を使用した TB Green *Premix Ex Taq* を用いるため、反応液調製時など反応開始前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能です。

2. 蛍光検出法

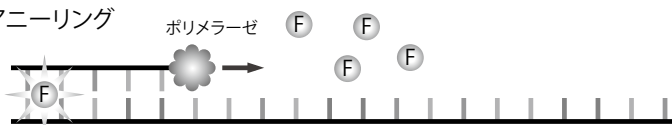
本製品では、蛍光検出法として TB Green によるインターカレーター法を採用しています。インターカレーター法とは、二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬(インターカレーター: TB Green など)を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると蛍光を発するため、この蛍光強度を検出することで増幅曲線を作成したり、融解曲線分析を行うことができます。

インターカレーター法の検出原理

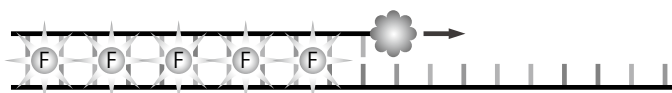
1) 熱変性



2) プライマーのアニーリング



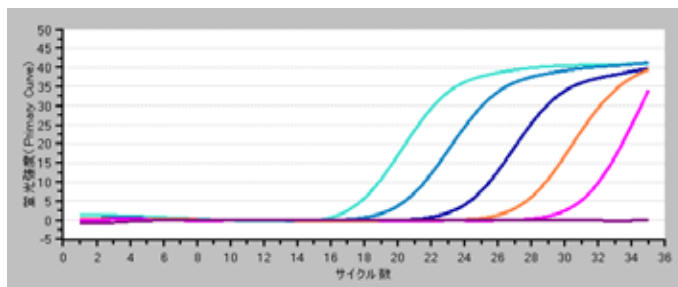
3) 伸長反応



3. 増幅曲線

増幅曲線とは、PCR 増幅に伴いリアルタイムに検出される蛍光強度をプロットすることにより得られる曲線です。初発鑄型量が多いほど、増幅曲線は早いサイクル数で立ちあがります。PCR 増幅産物がある一定量に達した時のサイクル数を Ct 値として数値化することで、初発鑄型量を比較することが可能です。

Thermal Cycler Dice Real Time System を用いた増幅曲線
(Primary Curve モードによる例)

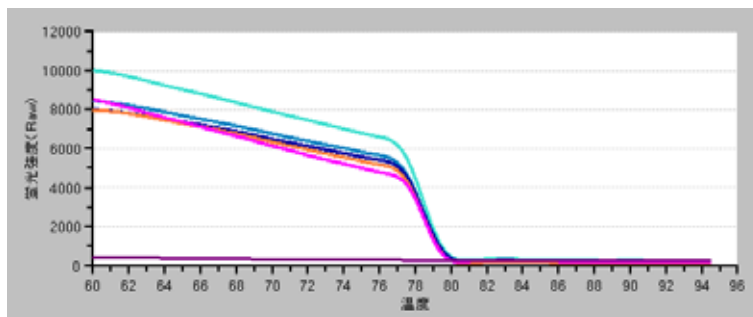


4. 融解曲線

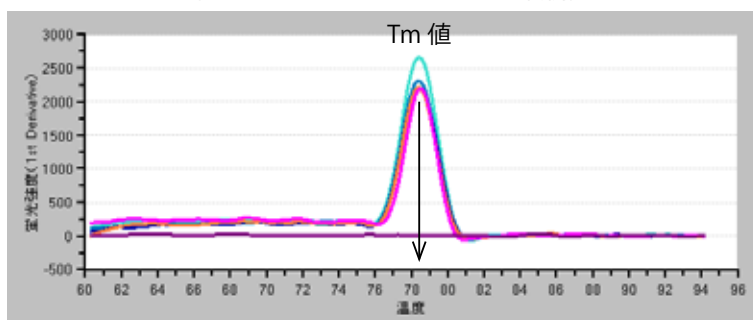
PCR 増幅後 PCR 反応液の温度を徐々に上げて、インターカレーター (TB Green など) の蛍光シグナルをモニタリングすると、最初は、PCR 増幅産物の DNA 二本鎖の形成による蛍光シグナルを発していますが、ある一定の温度に達すると一本鎖に解離し、蛍光シグナルが急激に低下するのが確認されます。この変化をプロットしたものが融解曲線です。また、この時の温度は融解温度 (T_m 値) と呼ばれ、増幅産物の配列に固有の値を示します。この性質を利用して、 T_m 値から増幅産物を特定する解析が融解曲線分析です。融解曲線を 1st Derivative で表示させると蛍光強度の変化量を見ることができます。この時のピークの温度が T_m 値となります。

Thermal Cycler Dice Real Time System を用いた融解曲線

(Raw モードによる記載例)



(1st Derivative モードによる記載例)



1st Derivative : 測定された蛍光値の一次微分値に -1 を乗じた値
蛍光強度の変化量を示す。

III. 内容 (20 μ l 反応系、100 回分)

Primer Mix (5 \times) (2 μ M each)

400 μ l

QuickPrimer (Real Time) シリーズ一覧表

病原因子遺伝子検出用

製品コード	製品名	検出対象遺伝子	対応する陽性コントロール DNA (製品コード)
MR101	QuickPrimer InvE 遺伝子	細胞侵入性因子 InvE 遺伝子	MR401
MR102	QuickPrimer IpaB 遺伝子	細胞侵入性因子 IpaB 遺伝子	MR402
MR103	QuickPrimer IpaH 遺伝子	細胞侵入性因子 IpaH 遺伝子	MR401
MR104	QuickPrimer Shiga I 遺伝子	志賀毒素 (ペロ毒素) I 型 Shiga I 遺伝子	MR403
MR105	QuickPrimer Shiga II 遺伝子	志賀毒素 (ペロ毒素) II 型 Shiga II 遺伝子	MR404
MR106	QuickPrimer LT 遺伝子	易熱性毒素 LT 遺伝子	MR405
MR107	QuickPrimer STI 遺伝子	ヒト耐熱性毒素 STI 遺伝子 (STh 遺伝子)	MR406
MR109	QuickPrimer Tdh 遺伝子	耐熱性溶血毒 Tdh 遺伝子	MR407
MR110	QuickPrimer CdtA 遺伝子	細胞膨張化致死毒素 CdtA 遺伝子	MR408
MR111	QuickPrimer InvA 遺伝子	細胞侵入性因子 InvA 遺伝子	MR409
MR112	QuickPrimer Enterotoxin (<i>Clostridium perfringens</i>) 遺伝子	腸管毒 Enterotoxin 遺伝子	MR410
MR113	QuickPrimer Nhe 遺伝子	非溶血性腸管毒 Nhe 遺伝子	MR415

細菌遺伝子 (16S rDNA) 検出用

製品コード	製品名	検出対象遺伝子	対応する陽性コントロール DNA (製品コード)
MR201	QuickPrimer <i>Escherichia / Shigella</i> group (16S rDNA)	16S rDNA 遺伝子	MR405
MR202	QuickPrimer <i>Staphylococcus</i> spp. (16S rDNA)	16S rDNA 遺伝子	MR411
MR203	QuickPrimer <i>Clostridium perfringens</i> (16S rDNA)	16S rDNA 遺伝子	MR410
MR204	QuickPrimer <i>Yersinia</i> spp. (16S rDNA)	16S rDNA 遺伝子	MR412
MR205	QuickPrimer <i>Campylobacter</i> spp. (16S rDNA)	16S rDNA 遺伝子	MR408
MR207	QuickPrimer <i>Listeria</i> spp. (16S rDNA)	16S rDNA 遺伝子	MR414
MR208	QuickPrimer <i>Bacillus cereus</i> group (16S rDNA)	16S rDNA 遺伝子	MR415

製品名に spp. が記載されている製品は対象属菌全般を増幅します。また group は対象菌種およびその類縁菌種を増幅します。

本シリーズでは、前ページに示したように毒素遺伝子を検出対象とした 12 種類、菌の同定にも利用される 16S リボソーム DNA を検出対象とした 7 種類の計 19 種類を取りそろえています。目的に合わせた組み合わせでご利用いただけます。

<目的別製品組み合わせ例>

食肉等の非加熱食品の場合の組み合わせ例

製品コード	製品名	検出対象遺伝子
MR101	QuickPrimer InvE 遺伝子	細胞侵入性因子 InvE 遺伝子
MR103	QuickPrimer IpaH 遺伝子	細胞侵入性因子 IpaH 遺伝子
MR104	QuickPrimer Shiga I 遺伝子	志賀毒素（ペロ毒素）I 型 Shiga I 遺伝子
MR105	QuickPrimer Shiga II 遺伝子	志賀毒素（ペロ毒素）II 型 Shiga II 遺伝子
MR111	QuickPrimer InvA 遺伝子	細胞侵入性因子 InvA 遺伝子

生食用魚介類がサンプルの場合の組み合わせ例

製品コード	製品名	検出対象遺伝子
MR104	QuickPrimer Shiga I 遺伝子	志賀毒素（ペロ毒素）I 型 Shiga I 遺伝子
MR105	QuickPrimer Shiga II 遺伝子	志賀毒素（ペロ毒素）II 型 Shiga II 遺伝子
MR109	QuickPrimer Tdh 遺伝子	耐熱性溶血毒 Tdh 遺伝子
MR111	QuickPrimer InvA 遺伝子	細胞侵入性因子 InvA 遺伝子

毒素遺伝子を検出対象とする場合は、他の毒素産生株の検出は行えません。

IV. 保存

－ 20℃

V. 本製品以外に必要な試薬および機器など（主なもの）

【試薬】

TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B) *
滅菌精製水 (RNase-free Water (製品コード 9012) など)

* : 本プライマーシリーズは、TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B) と組み合わせて使用するよう判定基準を設定しています。他の試薬を用いた場合、正確な判定ができませんので、必ず TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) と組み合わせてご使用ください。

【陽性コントロール DNA】

QuickPrimer (Real Time) シリーズ用 Positive Control DNA 全 14 種類*
(製品コード MR401 ~ MR412/MR414/MR415)

* : 各陽性コントロール DNA は、滅菌精製水を用いて 10 倍希釈し、陽性コントロール反応に使用してください。
希釈用滅菌水には、RNase-free Water (製品コード 9012) をご利用いただくと便利です。

【機器】

リアルタイム PCR 装置

Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)

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 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

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

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

【機器専用反応チューブ】

Thermal Cycler Dice Real Time System III を使用する場合 :

0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ902)

Thermal Cycler Dice Real Time System II / *Lite* を使用する場合 :

0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600) など

【その他】

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)

卓上遠心機

VI. 使用に際して

- ・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 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。

VII. 操作上の注意

- (1) 本製品は、融解後使用前に軽く遠心し試薬をチューブの底に落としてください。
- (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) 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。
- (4) TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) には、酵素が含まれています。融解の際には vortex を使用せずに、融解後ゆっくりとチューブの上下を反転させた後、卓上遠心機で軽く遠心する、あるいは穏やかにピペティングを行って全体を均一に混合してからお使いください。
- (5) 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 (XII. 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。

- (6) 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。

VIII. 操作

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
反応液を調製
↓
反応液を反応チューブに分注
↓
陰性コントロール（滅菌精製水）、またはサンプル、または陽性コントロール DNA（10 倍希釈液：用時調製）を添加
↓
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
↓ 画面上にリアルタイムに増幅曲線を表示
4. 反応終了
融解曲線分析により Tm 値を求める
5. 得られた Ct 値、Tm 値およびピークの波形をもとに結果を判定

VIII-1. サンプルの調製（エリア 2 で実施）

1. 増菌培養を実施する場合
ここでは、増菌培養を行った後の液体培養液からの一般的な DNA 調製法について記載します。増菌培養法は、各対象菌の標準プロトコールに従ってください。
 - (1) 精製 DNA を調製する場合
 - 1) 目的とする対象菌の培養標準プロトコールに従って検体から増菌培養を行い、得られた培養液を適量採取する。
 - 2) 市販の DNA 精製キットを用いて、DNA を調製する。
 - 3) 回収した精製 DNA 溶液を反応に用いる。
 - (2) 菌体を直接 PCR にかける場合
 - 1) 増菌培養液を 1,200 rpm で 5 分間軽く遠心し、残渣を取り除いた後、上部水層を再度 12,000 rpm、10 分間遠心して上清を取り除く。
 - 2) 得られた沈殿に適量の TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) を加え、95°C で 10 分間熱処理後、再度遠心して得られた上清を熱抽出サンプルとして用いる。

<熱抽出サンプルの調製例>

食品サンプルより標準の増菌培養を行った培養液 10 μ l を TE Buffer 90 μ l に加える。

※ 高い感度が必要な場合は、培養液 1 ml を 5,000 rpm、5 分間の遠心により集菌し、TE Buffer 100 μ l に懸濁する。

↓
95°C で 10 分間加熱処理後、12,000 rpm、1 分間の遠心分離により残渣を除く。

↓
遠心上清を反応に用いる。

参考：食材からの培養試料の調製例

食材 10 g (ml) に対し緩衝ペプトン水 90 ml を加え、ストマッカーで均質化した後、40 ml を分取する。遠心分離し上清を除去した後、生理食塩水 2 ml に懸濁する。全量を培養液に添加し培養する（食材 4 g (ml) に相当）。

2. 固形培地上のコロニーを使用する場合

- (1) 培養プレート上のコロニーから、滅菌済みのマイクロピペット用チップなどの先に極微量の菌体を取り 50～500 μ l の TE Buffer に懸濁し菌液を作製する。
- (2) 95℃、5～10 分の熱抽出処理後、12,000 rpm、4℃で 10 分間遠心し、得られた上清の適当量（本製品の標準添加量：3 μ l）を反応液に添加し反応を開始する。

注 1) 加工食品によっては（特に香辛料を多く含む食品）、PCR 阻害を生じる場合があります。この場合、より厳密な菌体からの DNA 抽出法を使用する必要があります。

注 2) 死菌数が多すぎる食品では、培養法を組み入れても死菌が検出される場合があります。

注 3) ビブリオ科細菌の中で好塩性のもは、BHI 培地*¹ や SCD 培地*² で良好な増殖性を示さない可能性があります。

注 4) 増菌培養より得た熱抽出 DNA を初めて PCR に使用される場合は、培地成分が結果に影響を及ぼす場合がありますのでご注意ください。

注 5) サンプルの取り扱いに際しては、適切な設備・保護具を使用し、規制・ガイドライン等に従い適切な作業を行ってください。

* 1：BHI 培地：ブレインハートインフュージョンブイオン、日水製薬（株）

* 2：SCD 培地：トリプトソーヤブイオン、日水製薬（株）

VIII-2. 反応液の調製

本製品を用いた各サンプルの反応は、必ず陽性コントロール DNA (10 倍希釈液; 用時調製) での反応および陰性コントロール反応と一緒に行ってください。各サンプルより得られた Tm 値が、同時に反応を行った陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) より得られた Tm 値 $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ の範囲 (判定基準 Tm 値) に含まれるかどうかにより判定を行います。

精製 DNA 以外のサンプル (熱抽出サンプルなど) では、不純物の影響により、Tm 値が判定基準 Tm 値に納まらない場合があります。そのような影響の有無を確認するためには、陽性コントロール DNA 反応液にサンプルを加えて得られた Tm 値と、陽性コントロール DNA のみの反応で得られた Tm 値とを比較することをお勧めします。また、サンプルの精製度が低い場合やサンプル中の DNA 量が多すぎる場合には、PCR 反応が正常に行われず、偽陰性となる場合がありますのでご注意ください。

(1) 反応液の調製 (エリア 1 で実施)

下記に示す反応液を氷上で調製する。

サンプル以外のコンポーネントを必要本数 + α 分を調製し、アルミプレートにセットした反応チューブに 17 μl ずつ分注し軽く蓋をする。必要本数は、サンプル数 + 2 本 (陽性コントロール DNA (10 倍希釈液: 用時調製)、陰性コントロールとして滅菌精製水を加えたもの) と設定する。

【Thermal Cycler Dice Real Time System の場合】

< 1 反応あたり >

試薬	液量	最終濃度
TB Green Premix Ex Taq (2 \times) *1	10 μl	1 \times
Primer Mix (5 \times)	4 μl	1 \times
サンプル	(3 μl) *4	
or 陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) *2,3		
or 滅菌精製水		
滅菌精製水	up to 20 μl	

【Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置の場合】

< 1 反応あたり >

試薬	液量	最終濃度
TB Green Premix Ex Taq (2 \times) *1	10 μl	1 \times
Primer Mix (5 \times)	4 μl	1 \times
サンプル	(3 μl) *4	
or 陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) *2,3		
or 滅菌精製水		
ROX Reference Dye or ROX Reference Dye II *5	0.4 μl	
滅菌精製水	up to 20 μl	

* 1: 反応に必要なバッファー、dNTP Mixture、酵素および TB Green を含みますので、激しい攪拌はおこなわないようご注意ください。

* 2: 陽性コントロール DNA は、プライマーに対応した QuickPrimer (Real Time) シリーズ用 Positive Control DNA (QuickPrimer Control DNA 1~15) をご使用ください。陽性コントロール DNA をリアルタイム PCR コンポーネントに誤って混入すると、正しい検出反応ができません。コンタミネーション防止のため、取り扱いには十分ご注意ください。

- * 3：陽性コントロール DNA は使用時に下記のように滅菌精製水で 10 倍希釈し、このうち 3 μ l を反応系に添加してください。残った希釈液は保存せずに廃棄してください。

< 10 倍希釈液の調製方法 >

QuickPrimer Control DNA	3 μ l
滅菌精製水	27 μ l
Total	30 μ l

- * 4：サンプル等の鑄型は、この段階では加えないでください。サンプル（鑄型）は、1～3 μ l の範囲で変更が可能です。最終反応液量が 20 μ l になるように滅菌精製水量を加減してください。
- * 5：StepOnePlus には ROX Reference Dye を、7500 および 7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II をご利用ください。Dye/Dye II は、TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B) に含まれています。

(2) 滅菌精製水（陰性コントロール）の添加

- (1) で反応液を分注したチューブの 1 本に陰性コントロール用としてサンプルの代わりに滅菌精製水を 3 μ l 添加し、しっかりと蓋をする。

エリア 3 に移動。

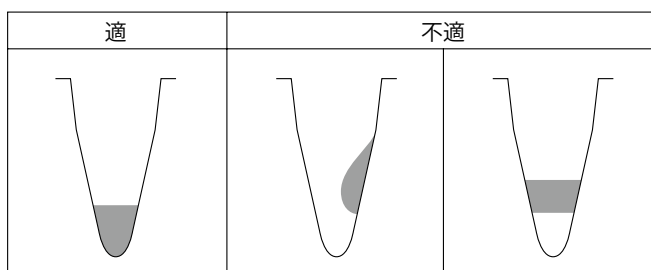
(3) サンプル（鑄型）の添加（エリア 3 で実施）

- (1) で反応液を分注した残りのチューブについて、サンプルまたは陽性コントロール DNA（10 倍希釈液）を添加し、しっかりと蓋をする。

【注意】 蛍光ノイズの原因になりますので、チューブや蓋には素手で触れないようにしてください。

(4) 反応チューブのセット

- 1) 反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心して、反応液をチューブの底に落とし、底部の気泡等を取り除く。



- 2) 使用するチューブ数が少ない場合は、リアルタイム PCR 装置の中央付近にセットし、端の列に空のチューブをセットする。

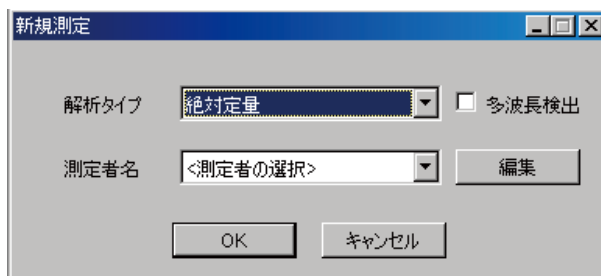
【注意】 調製後、なるべく 30 分以内に反応を開始してください。

VIII-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なりますので、詳しい操作方法はそれぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。

【 Thermal Cyclor Dice Real Time System (食品環境検査用ソフト) の場合 】

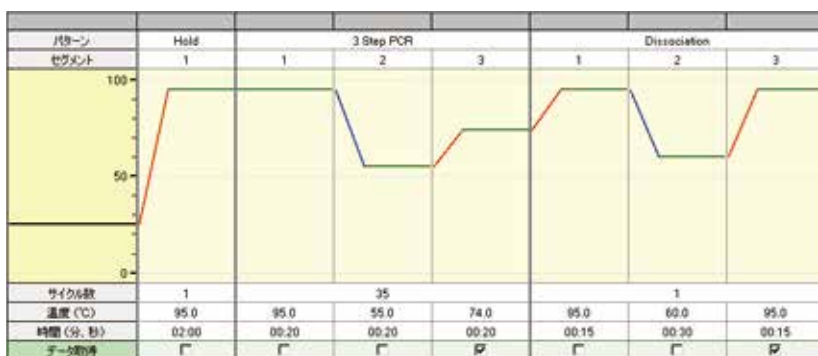
- (1) ランファイルを新規作成し、“新規測定”画面において解析タイプ《絶対定量》を選択する。



※ 《絶対定量》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 Cyclor Dice Real Time System Software をご使用の場合は、<Absolute Quantification>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 Cyclor 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 PCR 条件を設定する。



初期変性 (Hold)

Cycle : 1
95°C 2分

3 step PCR

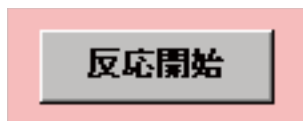
Cycle : 35
95°C 20秒
55°C 20秒
74°C 20秒 (検出)

Dissociation

注：“Speed”は、Thermal Cyclor Dice Real Time System III (製品コード TP950) の場合は Normal に、Thermal Cyclor Dice Real Time System II (製品コード TP900) や Lite (製品コード TP700) 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 の設定は各装置のデフォルト条件のままなので、設定の変更は不要です。

(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。

※ “サンプルタイプ” のプルダウンメニューには < PC > 表示がありません。陽性コントロール DNA の反応ウェルに対する設定には < STD > を代用されると便利です。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D			STD FAM 0.00E+000	UNKN FAM	UNKN FAM					UNKN FAM	NTC FAM	
E			1 A	2 A	3 A				A 8 A	9 A		
F			STD FAM 0.00E+000	UNKN FAM	UNKN FAM					UNKN FAM	NTC FAM	
G			10 B	11 B	12 B				B 17 B	18 B		
H												

(5) 結果解析

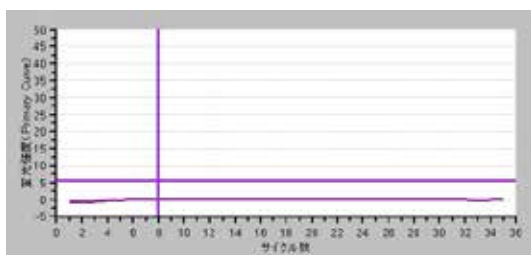
反応終了後、“結果/解析”ボタンをクリックする。

二画面の上部にサンプル検出の FAM フィルターでの増幅曲線（左図）を、下部に融解曲線（右図）を表示する。

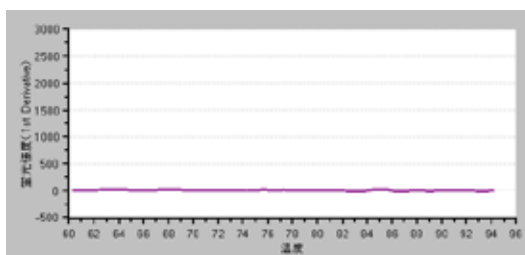
あわせて、NC（陰性コントロール）、PC（陽性コントロール DNA）での増幅曲線および融解曲線を確認する。

NC（陰性コントロール）

増幅曲線

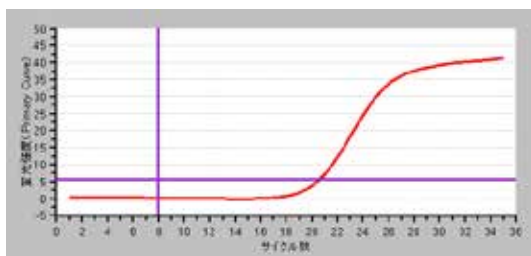


融解曲線

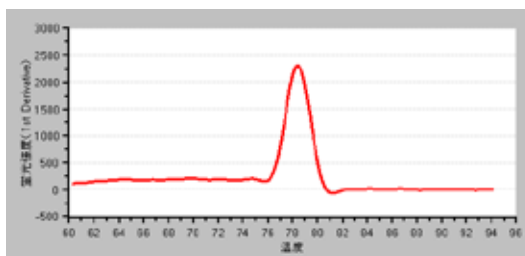


PC（陽性コントロール DNA）

増幅曲線

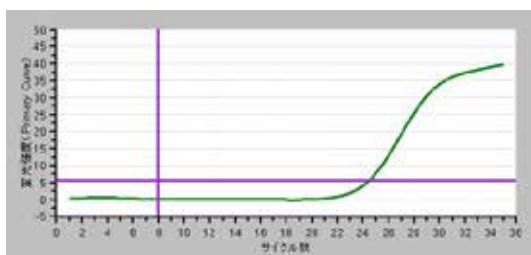


融解曲線

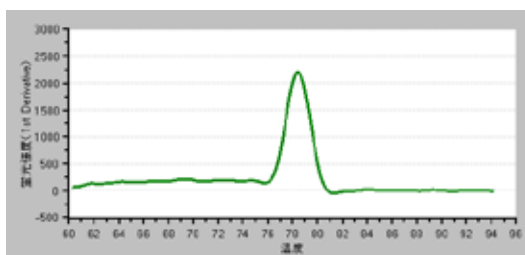


サンプル

増幅曲線



融解曲線



例： QuickPrimer InvE 遺伝子（製品コード MR101）を用いた場合の陰性コントロール、陽性コントロール DNA、サンプルの増幅曲線・融解曲線の波形イメージ

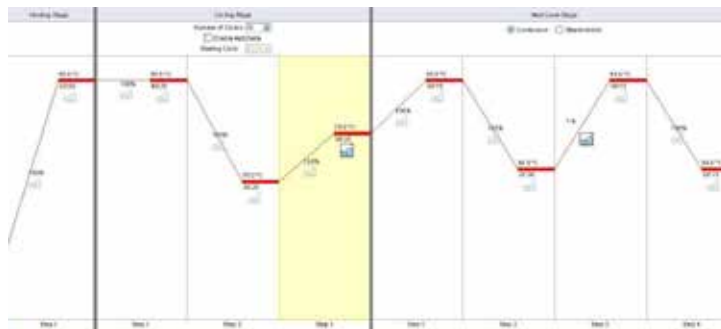
- (6) 上下いずれかの画面で“データ解析” <テキストレポート>を選択し、“表示項目” <SDM 法データ (2nd Derivative Maximum 法による解析)>の☑をはずし、<CP 法データ (Crossing Point 法による解析)>の結果を表示する。
- (7) “詳細項目”の Tm#1、Tm#2 に☑を入れ、<定量値 (CP) (検量線設定時にサンプル濃度を表示)>の☑を外す。必要に応じて、“詳細項目”より表示する項目を選択する。

ウェル	サンプル名	サンプルタイプ	ターゲットマーク	Ch値 (CP)	Tm #1	Tm #2
D3	InvE PC	STD	A	20.65	78.40	89.77
D4	InvE Sample-1	NTC	A	24.54	78.42	89.57
D5	InvE Sample-2	UNKN	A	27.91	78.39	71.86
D6	InvE Sample-3	NTC	A	31.14	78.50	89.90
D7	InvE Sample-4	NTC	A	-	78.76	75.28
D8	InvE Sample-5	NTC	A	-	75.34	63.58
D9	InvE Sample-6	NTC	A	-	62.62	60.77
D10	InvE Sample-7	NTC	A	-	89.66	84.74
D11	InvE NC	NTC	A	-	83.32	84.82

データ解析	テキストレポート
表示形式	ウェル
表示項目	<input type="checkbox"/> 解析条件 <input checked="" type="checkbox"/> CP法データ <input checked="" type="checkbox"/> SDM法データ
詳細項目	<input checked="" type="checkbox"/> ウェル <input checked="" type="checkbox"/> サンプル名 <input checked="" type="checkbox"/> サンプルタイプ <input checked="" type="checkbox"/> ターゲットマーク <input type="checkbox"/> ターゲット名 <input type="checkbox"/> レプリケートマーク <input type="checkbox"/> レプリケート名 <input type="checkbox"/> 検出フィルター <input type="checkbox"/> 最終蛍光値 (Raw) <input type="checkbox"/> 最終蛍光値 <input checked="" type="checkbox"/> Ch値 (CP) <input type="checkbox"/> 平均Ch値 (CP) <input type="checkbox"/> Ch値SD (CP) <input type="checkbox"/> 標準サンプル濃度 <input type="checkbox"/> 定量値 (CP) <input type="checkbox"/> 定量平均値 (CP) <input type="checkbox"/> 定量値SD (CP) <input checked="" type="checkbox"/> Tm #1 <input checked="" type="checkbox"/> Tm #2 <input type="checkbox"/> Tm #3

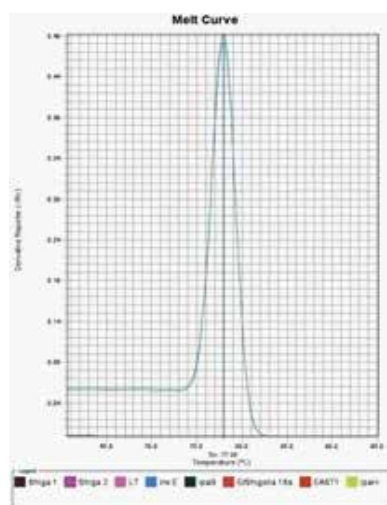
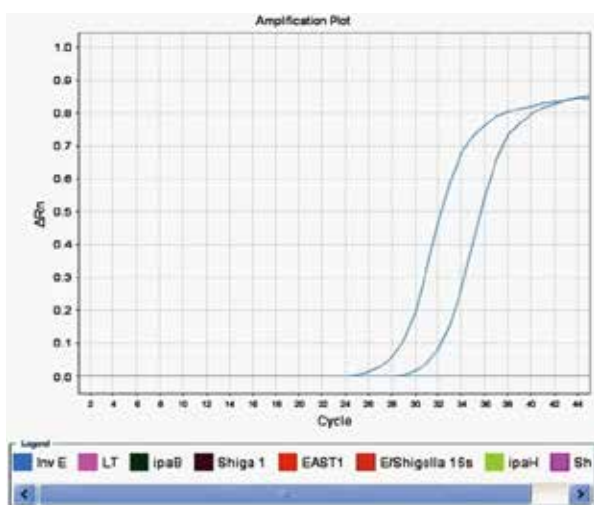
【 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合 】

- (1) Experiment Properties 画面設定を行う。
 - Quantitation-Standard Curve を選択する。
 - SYBR Green Reagents を選択し、Include Melt Curve の を確認する。
- (2) 反応条件を設定し、チューブをセットし、反応をスタートする。



Stage 1 : 初期変性
 Repts : 1
 95°C 2分
 Stage 2 : PCR 反応
 Repts : 35
 95°C 20秒
 55°C 20秒
 74°C 25秒 (検出)
 Melting

- (3) 反応終了後、Analysis 画面で、増幅曲線および融解曲線を確認し、T_m 値を求める。



#	mple...	Target N...	Task	Dyes	Cr	Cr Mean	Cr SD	Quantity	Quantity ...	Quantity ...	Tm1	Tm2	Tm3	AMP
1	E/Shigella	NTC	SYBR-None	40.998							72.971			
2	E/Shigella	STANDARD	SYBR-None	29.526	29.526			10			88.087			
3	E/Shigella	STANDARD	SYBR-None	25.216	25.216			100			87.509			
4	EAST1	NTC	SYBR-None	37.750							78.484	88.265		
5	EAST1	STANDARD	SYBR-None	34.440	34.44			10			80.309			
6	EAST1	STANDARD	SYBR-None	31.907	31.907			100			86.309			
7	Inv E	NTC	SYBR-None	Underflow							51.945			
8	Inv E	STANDARD	SYBR-None	32.936	32.936			10			77.95			
9	Inv E	STANDARD	SYBR-None	29.499	29.499			100			77.95			
10	LT	NTC	SYBR-None	39.500							76.528			
11	LT	STANDARD	SYBR-None	34.141	34.141			10			82.218			
12	LT	STANDARD	SYBR-None	30.909	30.909			100			82.218			

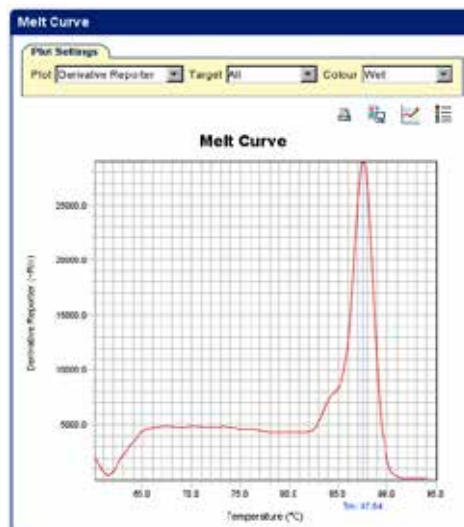
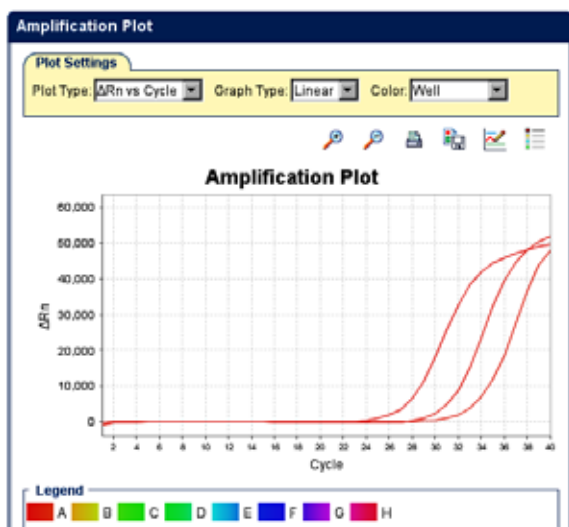
【 Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System の場合 】

- (1) Experiment Properties 画面設定を行う。
 - Quantitation-Standard Curve を選択する。
 - SYBR Green Reagents を選択し、Include Melt Curve の を確認する。
- (2) 反応条件を設定し、チューブをセットし、反応をスタートする。



Stage 1 : 初期変性
Reps : 1
95°C 2分
Stage 2 : PCR 反応
Reps : 35
95°C 20秒
55°C 20秒
74°C 20秒 (検出)
Melting

- (3) 反応終了後、Analysis 画面で、増幅曲線および融解曲線を確認し、T_m 値を求める。



View Plate Layout View Well Table

Select Wells With:

Show in Table ▼ Group By ▼ Expand All Collapse All

#	Omit	Flag	Sample N.	Target Name	Task	Ct	Ct Mean ¹	Tm1	Tm2	Tm3	Comments	A
61	<input type="checkbox"/>	▲		Escherichia-Shigella(16S)	UNKNOWN	19.630098	22.201057	88.126				
62	<input type="checkbox"/>	▲		Escherichia-Shigella(16S)	UNKNOWN	26.89925	22.201057	88.136				
63	<input type="checkbox"/>	▲		Escherichia-Shigella(16S)	UNKNOWN	30.477602	22.201057	72.13	87.998			
64	<input type="checkbox"/>	▲		Escherichia-Shigella(16S)	UNKNOWN	29.360868	22.201057	72.87	87.986			
65	<input type="checkbox"/>	▲		Escherichia-Shigella(16S)	UNKNOWN	4.6294684	22.201057	71.528	84.265			
66	<input type="checkbox"/>	▲		C.jejuni(16S)	UNKNOWN	19.744093	23.913694	78.898				
67	<input type="checkbox"/>	▲		C.jejuni(16S)	UNKNOWN	26.800935	23.913694	78.749				
68	<input type="checkbox"/>	▲		C.jejuni(16S)	UNKNOWN	31.04001	23.913694	78.502				
69	<input type="checkbox"/>	▲		C.jejuni(16S)	UNKNOWN	5.3794537	23.913694	64.424	74.204	91.394		
70	<input type="checkbox"/>	▲		C.jejuni(16S)	UNKNOWN	36.80398	23.913694	76.271	65.006			
71	<input type="checkbox"/>	▲		L.monocytogenes(16S)	UNKNOWN	15.764902	26.043875	87.838				
72	<input type="checkbox"/>	▲		L.monocytogenes(16S)	UNKNOWN	22.871875	26.043875	87.889				
73	<input type="checkbox"/>	▲		L.monocytogenes(18S)	UNKNOWN	27.267376	26.043875	87.89				
74	<input type="checkbox"/>	▲		L.monocytogenes(16S)	UNKNOWN	31.612482	26.043875	87.838	73.76			

IX. 判定方法

陽性の場合には、増幅曲線の蛍光シグナルの上昇を認めます。しかし、TB Green による検出は、非特異的な増幅においても蛍光シグナルが増加しますので、陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) と同じ融解曲線の波形パターンを示すこと、および同じ Tm 値であることを確認します。

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズをご使用の場合、解析には QuickPrimer 結果判定用エクセルシート*が利用できます。本シートに Thermal Cycler Dice Real Time System により得られた Tm 値をトランスポートすると、判定基準 Tm 値に一致するかどうかを自動表示することができます。

*：タカラバイオウェブカタログの本製品ページからダウンロードしてご利用いただけます。

【注意】

- 本製品の反応試薬系には、サンプル内に PCR 阻害物質が混在するかどうかを調べるためのインターナルコントロールが含まれておりません。精製度が低い DNA サンプルを反応させる場合には、PCR 反応が正常に行われず、偽陰性となる場合がありますのでご注意ください。
特に目的遺伝子が検出されるであろうと予測されるサンプルを反応させても、増幅曲線が得られない場合には注意が必要です。
XI. トラブルシューティング (4) をご参照ください。
- 熱抽出サンプルのような粗精製 DNA で反応を行う場合、増幅曲線から得られた Ct 値が 35 より小さく、融解曲線分析の波形も陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) と同じパターンを示しているものの、Tm 値が陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) の Tm 値 ± 1.5°C の範囲 (判定基準 Tm 値) に含まれない場合があります。このような場合には、サンプルに由来する物質が Tm 値に影響を及ぼしている可能性があります。別途、陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) 3 μ l + サンプル 3 μ l を添加して反応を行い、得られた Tm 値がサンプルのみの反応で得られた Tm 値と一致するかどうかを確認してください。一致した場合、Tm 値が判定基準 Tm 値外の値であってもサンプルは陽性である可能性がありますので、別途電気泳動法や他の微生物検出方法の結果と照らし合わせた上で、最終的な判定を行ってください。
- サンプル中に含まれる目的遺伝子量が少ない場合には、検出限界以下となり陰性と判定されます。検出感度についてはデータシートをご参照ください。
- 反応に用いる試薬は大腸菌で製造した酵素を使用しているため、QuickPrimer *Escherichia / Shigella* Group (16S rDNA) (製品コード MR201) を用いた反応では、ごく稀に陰性コントロールにおいても目的産物の増幅が認められる場合があります。サンプルの結果判定は、必ず陰性コントロールと Ct 値を比較して行ってください。

【判定基準】

サンプルの反応で増幅曲線より得られた Ct 値が 35 より小さく、融解曲線の波形が陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) の波形と同じパターンを示し、かつ得られた Tm 値が陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) より得られた Tm 値 ± 1.5°C の範囲 (判定基準 Tm 値) に含まれる時、陽性と判定します。(各プライマーを使用した時の標準的な波形パターンは、データシートをご参照ください。)

- (1) 陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) の反応で得られた融解曲線波形が、データシート記載のパターンと一致しているかを確認する。さらに陰性コントロールで Ct 値の数値表示がないか、もしくは Ct 値の数値表示があっても、陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) より得られた Tm 値 ± 1.5°C の範囲 (判定基準 Tm 値) に含まれないことを確認する。
 - ※ 陽性コントロール DNA および陰性コントロールの反応により、上記以外の結果が得られた場合は、検出試薬系に問題がある、またはコンタミネーションの疑いがある等の理由により反応がうまく行われておりませんので、再反応を実施してください。
- (2) サンプルの Ct 値の数値が 35 より小さい値であることを確認する。
 - ※ Ct 値が 15 サイクルよりさらに小さな値を示す場合は、鋳型量が多すぎるものが考えられます。鋳型量が多すぎる場合は、Ct 値、Tm 値が判定基準 Tm 値内に入らず偽陰性になることがありますのでご注意ください。そのような場合には、サンプルを 10 ~ 10,000 倍程度に希釈して再反応してください。
- (3) サンプルの融解曲線が、陽性コントロール DNA の波形と同じパターンを示すことを確認する。
- (4) サンプルの Tm 値が、判定基準 Tm 値に含まれているかを照らし合わせる。
 - ※ プライマーの種類により、サンプル中に含まれる鋳型が低濃度の場合に、Tm#1 の値が判定基準 Tm 値外であっても、Tm#2 として得られた Tm 値が判定基準 Tm 値内に含まれ、結果として陽性と判定できることがあります。Tm#1、Tm#2 の両方の値を用いて確認してください。

X. プライマーの特異性

- 病原因子 (または毒素) の遺伝子配列は菌株ごとに配列の違いがある場合があります、一つの菌種に属するすべての菌株を検出できない場合があります。また、これらの遺伝子は他の菌種にも分布していることがあり、検出対象以外の菌種でも増幅が認められる場合があります。従って、他法 (培養法等) と必ずしも結果が一致するとは限らないことに注意してください。
- 標的とする毒素や溶血性の遺伝子などは、保存中に脱落したり変異することがあるため、本製品を用いた場合でも増幅できない場合があります。
- 16S rDNA を検出対象遺伝子として反応させた場合には、類縁菌を検出する場合があります。詳しくは、各プライマーのデータシート裏面をご確認ください。

XI. トラブルシューティング

- (1) Thermal Cycler Dice Real Time System を使用した時、増幅曲線がプラトーにならずにサイクル数が増えるほど蛍光強度が下がる波形が見られる。

- サンプルに含まれる鑄型が非常に多く、反応初期に増幅曲線が立ち上がる場合に起こります。データ解析画面の右上の“データ解析”のプルダウンメニューから<増幅曲線>を選択、さらに、“グラフ表示”より<Primary Curve>を選択して、画面右側に表示される解析設定のベースライン設定を変更することで改善できます。
ベースラインタブを選び、設定を Auto より Manual に変更し Start または End の数値を適宜入力変更します。増幅による蛍光の増加がない範囲を確認し、Manual の数値を入力、「適用」をクリックします。



“グラフ表示”プルダウンメニューより<Primary Curve>を<Raw>に選びなおすことで生データが表示され、増幅による蛍光の増加がない範囲を確認することができます。

- (2) サンプルの Tm 値は陽性コントロール DNA (10 倍希釈液) より得られた Tm 値 ± 1.5°C の範囲 (判定基準 Tm 値) 内であったが、得られた融解曲線の波形が陽性コントロール DNA の波形と異なった。

- 目的産物の増幅であることを確認するために、陽性コントロール DNA での増幅産物および陰性コントロールでの増幅産物と一緒にサンプル増幅産物を 3% アガロースゲル電気泳動に供し、バンドサイズの確認を行ってください。各プライマーのデータシート記載の増幅鎖長をご参考の上、陽性コントロール DNA と同じ位置にサンプルの増幅産物のバンドがあることを確認してください。

※ 電気泳動を実施する際にはコンタミネーションに十分ご注意ください。
また作業は VII. 操作上の注意 (5) に記載のエリア 1～3 以外の場所で実施してください。

- 適宜希釈したサンプルを反応させ融解曲線分析を行い、融解曲線分析の波形が陽性コントロール DNA での波形と同じになるかを再度確認してください。
- サンプルに多量の不純物が含まれている可能性があります。サンプルの精製を行った上で、再度反応を実施してください。

- (3) 陽性コントロール DNA の反応が陰性となった。

- 反応液の調製にミスがないことを確認してください。

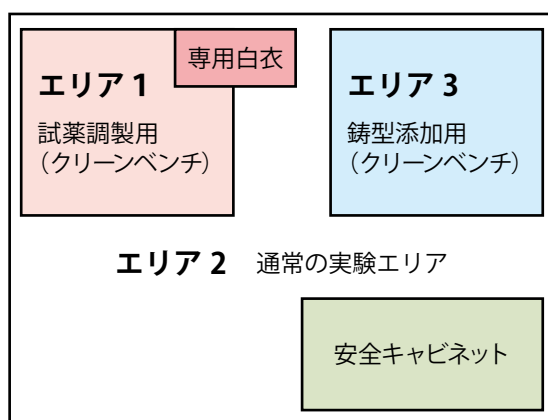
(4) 増幅曲線が得られなかったサンプルについて、検出限界以下であるのか、PCR 反応阻害によるものかを調べたい。

- サンプルを 1,000 倍程度まで段階希釈して再度測定を行い、サンプル由来物質による PCR 反応阻害でないことを確認してください。
- 陽性コントロール DNA (反応 1) と、陽性コントロール DNA + サンプル (反応 2) の測定結果を比較し、反応 2 の Ct 値に遅れがなく、Tm 値が判定基準 Tm 値内であれば、サンプル由来の物質による PCR 反応阻害ではないことが確認できます。

(5) 陰性コントロールで増幅曲線が得られ、Tm 値が判定基準 Tm 値内であった。

- 試薬中に目的産物が混入した可能性があります。再度、コンタミネーションに注意し反応を行ってください。

XII. 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。

XIII. 参考文献

食品衛生検査指針 微生物編 厚生労働省監修 2004 社団法人日本食品衛生協会

XIV. 関連製品

- QuickPrimer (Real Time) シリーズ用 Positive Control DNA
(製品コード MR401 ~ MR412/MR414/MR415)

製品コード	製品名	対応する QuickPrimer (製品コード)
MR401	QuickPrimer Control DNA 1	MR101、MR103
MR402	QuickPrimer Control DNA 2	MR102
MR403	QuickPrimer Control DNA 3	MR104
MR404	QuickPrimer Control DNA 4	MR105
MR405	QuickPrimer Control DNA 5	MR106、MR201
MR406	QuickPrimer Control DNA 6	MR107
MR407	QuickPrimer Control DNA 7	MR109
MR408	QuickPrimer Control DNA 8	MR110、MR205
MR409	QuickPrimer Control DNA 9	MR111
MR410	QuickPrimer Control DNA 10	MR112、MR203
MR411	QuickPrimer Control DNA 11	MR202
MR412	QuickPrimer Control DNA 12	MR204
MR414	QuickPrimer Control DNA 14	MR207
MR415	QuickPrimer Control DNA 15	MR113、MR208

- TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)
- Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)
- 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)
- 0.1 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ902)
- 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)

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