

研究用

Takara

Salmonella serovar
Dublin Identification Kit

説明書

サルモネラは自然界に広く分布し、現在までに 2,500 以上の血清型が報告されています。従来から最も重要な食中毒起因菌のひとつであり、食肉や鶏卵などの畜産物が原因食品となっています。

サルモネラ血清型 Dublin は牛に敗血症、胃腸炎、肺炎、流産などを起こします。牛以外の動物からはほとんど分離されませんが、生乳を介してヒトに食中毒を起こすことが知られています。家畜伝染病予防法において監視伝染病病原体に指定されており、食肉衛生検査の過程で本血清型が分離された場合、その食肉は全て廃棄しなければなりません。したがって、サルモネラ感染が疑われた動物の枝肉は保留し、サルモネラの分離および血清型別を行う必要があります。その間、枝肉は 4℃で保存する必要があることから、Dublin による感染、汚染の有無を迅速、かつ正確に判定するスクリーニング検査手法の必要性が指摘されています。血清型の判定には、従来 4 日以上を必要としていましたが、本製品の使用により、分離されたサルモネラが Dublin であるか否かを 1 日で判定することが可能となりました。

本製品は、サルモネラが保持する遺伝子のひとつである侵入性因子関連遺伝子 (*invA* 遺伝子) と Dublin が特異的に保有する 3 遺伝子を検出することによって、サルモネラ血清型 Dublin を同定検出します。2×PCR Mix (Red) は、PCR に必要なコンポーネント (Hot Start 用 PCR 酵素、バッファー、dNTP Mixture 等) に、電気泳動に便利な色素マーカー (赤色)・比重剤を含みます。Primer Mix およびサンプルを添加するだけで反応でき、反応液を直接電気泳動に供することができるため、操作が簡便です。製品化にあたりましては、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所のご協力をいただきました。

I. 内容 (25 µl 反応系、50 回用)

1. 2×PCR Mix (Red)* ¹ (2× conc.)	625 µl
2. SD Primer Mix	250 µl
3. dH ₂ O	500 µl
4. SD Positive Control DNA* ²	50 µl

* 1 : 酵素、反応 Buffer、dNTP Mixture および色素マーカー (赤色) を含む 2 倍濃度の PCR 反応試薬です。

— 20℃では凍結しない形状ですが、保管条件によっては凍結する場合があります。その場合も性能に問題はありませぬ。転倒混和後、スピンドウンしてご使用ください。

* 2 : PCR が正常に行われているかを確認するための Positive Control DNA です。SD Positive Control DNA 由来の増幅産物は、サンプル由来の増幅産物とサイズが異なるので、万一、本コントロールにサンプルがコンタミしても区別することができます。

II. 保存 — 20℃

III. キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

本キットを用いた判別には、さらに次のような試薬、機器が必要です。

【試薬】

1. 滅菌精製水
2. 電気泳動用アガロース
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve（製品コード 5810A）
3. 電気泳動用 Buffer
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3（製品コード T9131）
または TBE (Tris-borate-EDTA) powder（製品コード T905）
4. DNA マーカー
100 bp DNA Ladder（製品コード 3407A/B）
5. Loading buffer (6× : 36% glycerol、0.05% bromophenol blue、0.035% xylene cyanol、30 mM EDTA) (4. に記載の DNA マーカーには添付されている。)
6. DNA 染色剤
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain（製品コード 5760A/5761A）
またはエチジウムブロマイド

【機器】

1. ヒートブロック (95°Cまで温度を上げられるもの)
2. 1.5 ml チューブ対応型冷却遠心機
3. 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）
4. 電気泳動装置
Mupid-2plus（製品コード M-2P）
Mupid-exU（製品コード EXU-1）
5. 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。)

【その他】

1. 0.2 ml PCR チューブ
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap（製品コード NJ200）など
2. 200 μ l、20 μ l、10 μ l 各マイクロピペット
3. 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 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. サーマルサイクラー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、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、操作は細心の注意を払ってください。
3. 反応液の調製から検出まで、次の4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)。コンタミネーション発生の原因となりますので、エリア4以外で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：PCR 反応液の調製、分注を行います。
 - エリア2：検体の調製 (DNA 抽出等) を行います。
 - エリア3：PCR 反応液へ鋳型 DNA の添加を行います。
 - エリア4：電気泳動等で PCR 増幅産物の解析を行います。

VI. 操作

1. サンプルの調製
菌体から DNA サンプルを調製する。
2. 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、Negative control、または検体サンプル、または Positive control を添加する。
↓
反応チューブをサーマルサイクラーにセットし反応を開始する。
↓
反応終了
↓
3. アガロースゲル電気泳動
↓
判定

VI-1. サンプルの調製例 (エリア 2 で実施)

(1) アルカリ熱抽出サンプルを調製する場合

- 1) 大きさ 1 mm 程度の菌体コロニーを 50 μ l の 25 mM NaOH 水溶液に懸濁する。
- 2) 95°C で 5 分間熱処理する。
- 3) 4 μ l の 1 M Tris-HCl (pH7.0 ~ 8.0) を加えて中和する。
- 4) 12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収する。これを熱抽出サンプルとして 1 μ l を PCR 反応に用いる。

(2) DNA 精製キットを用いる場合

増菌培養液から DNA を調製する場合は、NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50) を用いて DNA を調製し、PCR に使用する。なお、糞便から DNA を調製する場合は、NucleoSpin Soil (製品コード 740780.10/.50/.250) の使用を推奨する。

VI-2. 反応液調製と反応開始

正しい検出結果を得るために、Negative control 反応と Positive control 反応を一緒に行ってください。

- 1) 下記に示す反応液 (マスターミックス) を必要本数 (サンプル数 + Negative control + Positive control) + α 分、氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
2 × PCR Mix (Red)	12.5 μ l
SD Primer Mix	5.0 μ l
dH ₂ O	6.5 μ l
Total	24.0 μ l

- 2) 氷上にて上記マスターミックスを 24 μ l ずつ PCR 用チューブに分注後、軽くふたをする。その内の 1 本は Negative control として、滅菌精製水を 1 μ l 加えしっかりとふたをする。
- 3) サンプル (鋳型) の添加 (エリア 3 で実施)
Negative control 以外の各チューブに、それぞれサンプルを 1 μ l 添加し、しっかりとふたをする。Positive control として SD Positive Control DNA を 1 μ l 添加したものを準備する。
- 4) サーマルサイクラーにセットし、以下の条件で PCR 反応を行う。

94°C 2 min.
↓
98°C 10 sec.]
60°C 15 sec.] 30 cycles
68°C 30 sec.]

※ 反応は約 1 時間 15 分で終了する。
反応後のサンプルは 4°C、または - 20°C で保存可能。

VI-3. 電気泳動による反応確認 (エリア 4 で実施)

(1) アガロースゲルの作製

- 1) 三角フラスコに電気泳動用 Buffer を入れ、電気泳動用アガロースを 3% (w/v) になるように攪拌しながらゆっくり加える。
- 2) 電子レンジで 2 ~ 3 分加熱する。取り出してよく攪拌し、アガロース溶液が均一に溶解していることを確認する。均一に溶解するまで加熱・攪拌を繰り返す。
- 3) ゲル板の準備をする。
- 4) アガロースゲルが 50 ~ 60°C に冷めたらゲル板にアガロース溶液を注ぎ、サンプルを注入するスロットを作製するためにコームを差し込み、30 分 ~ 1 時間室温で放置してゲルを固める。

【エチジウムブロマイド先染めの場合】

ゲル溶液が 50 ~ 60°C に冷めたら最終濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ になるようにエチジウムブロマイド水溶液を加え、均一になるように穏やかに攪拌した後、ゲル板に注ぎ、サンプルを注入するためのスロットを作製するためにコームを差し込み、30 分 ~ 1 時間室温放置してゲルを十分に固める。

- 5) ゲルが破れないように注意しながらゆっくりとコームを抜き取る。
- 6) アガロースゲルを泳動槽にセットし、ゲルが充分つかるまで電気泳動用 Buffer を泳動槽に加える。

(2) 電気泳動

- 1) 電極を +、- を間違えないように接続する。(PCR で増幅した核酸は負に荷電しており、 $- \rightarrow +$ に泳動される。)
- 2) PCR 反応終了後の各反応液 5 μl を、マイクロピペットを用いてゆっくりとゲルのスロットに注入する。(両端のスロットには DNA マーカーを適量注入する。)
- 3) 50 ~ 150 V の定電圧をかけ、DNA マーカーの Bromophenol Blue (速く泳動する色素) がコームから 3 ~ 4 cm に移動するまで電気泳動する。

(3) 染色バンドの確認 (エチジウムブロマイド先染めの場合は 3) のみで良い)

- 1) ゲルが充分浸せる量の 1 $\mu\text{g/ml}$ のエチジウムブロマイド水溶液、または SYBR Green I 溶液 (電気泳動用 Buffer で 10,000 倍希釈したもの) を調製し、アガロースゲル染色用トレイに入れておく。
- 2) 電気泳動したゲルをトレイに入れ 20 ~ 30 分静置する。
- 3) UV トランスイルミネーターにゲルをセットして写真を撮影し*、DNA マーカーと照らし合わせ、増幅産物のバンドの有無とサイズを確認する。

* : SYBR Green I を使用する場合は専用フィルターを用いる。

操作上の注意

1. エチジウムブロマイド、SYBR Green I 溶液を扱う場合、およびこれら DNA 染色剤で染色したゲルを扱う場合は、必ず手袋を着用し、直接液が触れないようにご注意ください。
2. 250 bp 付近に非特異的増幅産物が見られる場合があります。増幅産物のサイズを正確に確認するため、適切な泳動距離で電気泳動を実施し、判定を行ってください。

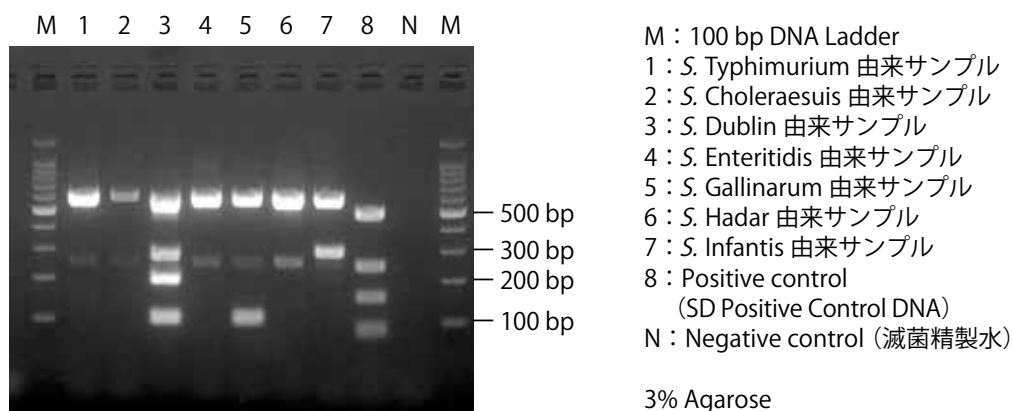
VII. 判定

サンプル中に血清型 Dublin が存在すれば、サルモネラ属 *invA* 遺伝子由来の増幅産物および血清型 Dublin 由来の増幅産物の 3 本、合計 4 本の増幅産物が検出されます。

反応結果は、Positive control 反応および Negative control 反応の結果と照らし合わせて判定してください。

PCR 反応による増幅産物の大きさは、以下の通りです。

	サンプルの増幅サイズ	Positive control の増幅サイズ
サルモネラ属 (<i>invA</i> 遺伝子)	605 bp	500 bp
血清型 Dublin	105 bp、203 bp、296 bp	85 bp、153 bp、246 bp

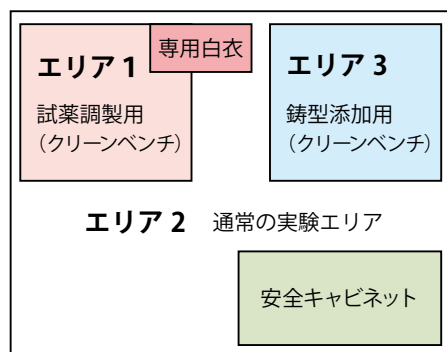


- サンプル中に血清型 Rostock あるいは血清型 Naestved を含む場合も陽性となるため、本製品で陽性と判定された場合は、他の方法と組み合わせて同定を行ってください。
- Negative control 反応において、増幅産物が得られないことを確認してください。増幅産物が得られる場合は、コンタミネーションが考えられますので、反応液を調製したエリアおよび使用した機器を洗浄したうえで、すべてのサンプルで再度反応を行ってください。
- Positive control 反応において、該当サイズの増幅産物が得られることを確認してください。正しいサイズの増幅産物が得られない場合、何らかの理由で PCR 反応が進まなかったことが考えられます。再度反応を行ってください。
- Negative control 反応、Positive control 反応で正しい結果が得られ、サンプルの反応において該当サイズの増幅産物 4 本が得られない場合は、陰性 (検出限界以下) であると判定します。

[注意]

本製品にはインターナルコントロールが含まれておりません。そのため、陰性の結果が得られた (4 本のバンドがいずれも見られない) 場合に、それがサンプル中の PCR 阻害物質の影響によるのか (偽陰性)、標的遺伝子を保持しないことを意味するのか明らかではありません。陰性と判定された場合、熱抽出サンプルに ST Positive Control DNA を 1 μ l 加えて反応を行い、Positive Control DNA 由来の増幅産物が得られることを確認してください。目的サイズの増幅産物が得られない場合は、サンプルに PCR 阻害物質が含まれていることが考えられます。その場合、サンプルの再調製および再反応をお勧めします。

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
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。

IX. 参考文献

Akiba, M., *et al.* Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods*. (2011) **85**: 9-15.

X. 関連製品

Salmonella serovar Typhimurium Identification Kit (製品コード R230A)
Salmonella serovar Choleraesuis Identification Kit (製品コード R231A)
Salmonella serovar Enteritidis Identification Kit (製品コード R232A)
Salmonella serovar Gallinarum Identification Kit (製品コード R234A)
Salmonella serovar Infantis Identification Kit (製品コード R235A)
Salmonella serovar Hadar Identification Kit (製品コード R236A)
NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)
NucleoSpin Soil (製品コード 740780.10/.50/.250)
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)
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)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
Mupid -exU (製品コード EXU-1)
Mupid -2plus (製品コード M-2P)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Touch (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)

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 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