

製品コード RR165A

検便検査用

---

# TaKaRa

**TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子  
検出キット (Probe 検出用)**

---

説明書

v201910Da

本製品はプローブを用いるリアルタイム PCR により、検便検体から腸管出血性大腸菌 (EHEC)、サルモネラ属菌、赤痢菌の遺伝子を検出するキットです。検出対象遺伝子は、VT 遺伝子 (EHEC)、*invA* 遺伝子 (サルモネラ属菌)、*ipaH* 遺伝子 (赤痢菌) で、PCR 阻害の有無を確認するためのインターナルコントロールも同時に検出します。

#### 特長

- ・高速 PCR 試薬の採用により、約 50 分 (CFX96 Touch Deep Well 使用の場合) で結果が得られます。
- ・EHEC、サルモネラ属菌、赤痢菌の 3 菌種をマルチプレックス PCR により 1 反応で検出します。
- ・プローブによる検出法を採用しており、3 菌種を明確に区別し、それぞれを異なる蛍光で検出可能です。
- ・ウラシル-N- グリコシラーゼ (UNG) を反応系に添加しており、PCR 増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。

#### 【検出対象遺伝子】

検出対象菌種	検出対象遺伝子	プローブ標識
EHEC	VT1/2 遺伝子 ( <i>stx1a</i> , <i>1c</i> , <i>1d</i> , <i>stx2a</i> , <i>2b</i> , <i>2c</i> , <i>2d</i> , <i>2e</i> , <i>2g</i> ) *1	HEX / Dark Quencher
サルモネラ属菌	<i>invA</i> 遺伝子	ROX / Dark Quencher
赤痢菌	<i>ipaH</i> 遺伝子 *2	FAM / Dark Quencher
(PCR 阻害の有無の確認)	インターナルコントロール	Cyanine5 / Dark Quencher

\* 1 : *J Clin Microbiol.* 2012 Sep; **50**(9): 2951-2963. で報告された配列のうち、*stx2f* を除く配列を網羅できるよう設計されています。

\* 2 : *ipaH* 遺伝子を保有する腸管侵入性大腸菌 (EIEC) を検出する場合があります。

## I. 内容 (200 回分)

● 1	Probe qPCR Mix-UNG*1	2 ×	1.25 ml × 2
● 2	Primer/Probe Mix (VT/ <i>ipaH</i> / <i>invA</i> )*2	5 ×	1 ml
○ H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O		1 ml × 2
● 4	Positive Control Mix*3		50 μl

\* 1 : 反応に必要な dNTP Mixture、Mg<sup>2+</sup>、酵素等を含む。

\* 2 : 遮光に留意すること。

\* 3 : 他の試薬へのコンタミネーションに留意すること。

## II. 保存

− 20℃

## III. キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

#### 【器具】

- ・ 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)

#### 【機器】

- ・ 微量高速遠心機
- ・ ヒートブロック等 (95℃、5 分の熱処理に使用)
- ・ リアルタイム PCR 装置

CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD 社)

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

注 : Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System は使用できません。

LightCycler 96 システム (Roche Diagnostics 社) 等

---

## 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：本キットは検便検査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 および 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。)
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。プラスチックなど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. 操作上の注意

1. Probe qPCR Mix-UNG を使用する際には、泡立えないよう穏やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混和されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。なお、保存中に沈殿を生じた場合には、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。必ず均一に混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
2. Probe qPCR Mix-UNG 以外の各試薬は、溶解後よく混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
3. Primer/Probe Mix (VT/ipaH/invA) は、遮光に留意してください。
4. 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。
5. 万一、サンプルやプライマーが核酸分解酵素(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、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋着脱およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。
6. 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 (VII. 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。
7. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。解析ソフトウェアの補正機能などが適切でない場合、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、解析パラメーターの Manual 設定を行ってください。

## VI. 操作

### 1. 便検体懸濁液 (50 検体プール) の調製 (エリア 2 で実施)

検便は 50 検体を 1 つのバッチとし、下記のいずれかの方法で 50 検体を混合した便検体懸濁液を調製する。

<プロトコール A >

- 1) 1.5 ml チューブ 50 本に、精製水を 50  $\mu$ l ずつ分注する。
- 2) 採便棒を精製水中で懸濁する (1 検体 / 1 チューブ、各 5 ~ 10% 懸濁液)。
- 3) 各懸濁液を 10  $\mu$ l ずつ 50 本分プールする (合計 500  $\mu$ l)。

<プロトコール B >

- 1) 10 ~ 15 ml 容量のチューブ (高さ 5 cm 程度のチューブ) に精製水を 2.5 ml 入れる。
- 2) 精製水に 1 検体ずつ竹串で掻き採った便を懸濁する。
- 3) 同様に、1 つのチューブに 50 検体分の懸濁を繰り返す (5 ~ 10% 懸濁液)。

### 2. 前処理 (エリア 2 で実施)

- 1) プールした便検体懸濁液 (5 ~ 10%) を 1.5 ml チューブに 100  $\mu$ l 分取する。  
※ 95°C、5 分の熱処理が可能であれば、他の容器・容量でも問題ありません。
- 2) 95°C、5 分の熱処理を行う。
- 3) 8,000 ~ 15,000 rpm で 5 分間遠心する。  
遠心後、上清を PCR の鋳型として使用する (3. PCR 増幅のステップ 2)。  
【注意】前処理後のサンプルの保存はお勧めしません。

### 3. リアルタイム PCR 反応

#### 【コントロール反応について】

結果の判定を正しく行うため、以下のコントロール反応を同時に行ってください。

陰性コントロール： PCR 反応の際に、本製品の H<sub>2</sub>O を鋳型とした反応を「陰性コントロール」として実施します。

陽性コントロール： PCR 反応の際に、本製品の Positive Control Mix を鋳型とした反応を「陽性コントロール」として実施します。

- 1) 以下の反応液を調製する。(エリア 1 で実施)  
必要数 +  $\alpha$  分の反応液をまとめて調製し、リアルタイム PCR 用チューブに 23  $\mu$ l ずつ分注する。必要本数は、サンプル数 + 2 本 (陽性コントロール、陰性コントロール) と設定する。

#### [ 1 反応分の反応液 ]

● Probe qPCR Mix-UNG	12.5 $\mu$ l
● Primer/Probe Mix (VT/ipaH/invA)	5 $\mu$ l
○ H <sub>2</sub> O	5.5 $\mu$ l
Total	23 $\mu$ l

※ 反応液の調製は (氷上ではなく) 室温で行ってください。

※ 調製済の反応液を保存する際には、4°C での保存 (48 時間まで) をお勧めします。

- 
- 2) 熱処理済のサンプル（または● Positive Control Mix または○ H<sub>2</sub>O）を 2 μl 添加する。  
（エリア 3 で実施）

※ 本操作は室温で行ってください。

- 3) 以下の条件で反応を実施する。

◆ CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System、LightCycler 96 システムの場合

< Hold >

(25°C 10分)\*

95°C 30秒

< PCR : 5 サイクル >

95°C 5秒

60°C 20秒

< PCR : 40 サイクル >

**90°C 1秒**

60°C 20秒 (蛍光検出 : FAM/HEX/ROX (Red610)/Cy5)

◆ Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合

注 : モードは Standard mode を選択してください。

< Hold >

(25°C 10分)\*

95°C 30秒

< PCR : 5 サイクル >

95°C 5秒

60°C 25秒

< PCR : 40 サイクル >

**90°C 1秒**

60°C 25秒 (蛍光検出 : FAM/VIC/ROX/Cy5)

\* : PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、25°C 10分のステップを実施してください。UNG の作用により PCR 産物が分解されます。

#### 4. 判定

##### 【検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター】

検出対象菌種	検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
EHEC	VT1/2 遺伝子	HEX (VIC)
サルモネラ属菌	<i>invA</i> 遺伝子	ROX (Red610)
赤痢菌	<i>ipaH</i> 遺伝子	FAM
(PCR 阻害の有無の確認)	インターナルコントロール (IC)	Cy5

##### 【コントロール反応の確認】

	PCR の鋳型	IC	VT	<i>invA</i>	<i>ipaH</i>
陽性コントロール	Positive Control Mix	+/-	+	+	+
陰性コントロール	H <sub>2</sub> O	+	-	-	-

- ・ 陽性コントロールで VT、*invA*、*ipaH* 各遺伝子が検出されない場合は、何らかの原因で PCR 反応や検出が正常に行われていない。再反応を行う。
- ・ 陰性コントロールで VT、*invA*、*ipaH* 遺伝子が検出された場合は、コンタミネーションの疑いがある。反応液の調製場所や器具類を除染したうえで再反応を行う。

##### 【測定対象サンプルの判定】

###### <陽性判定の例>

IC	VT	<i>invA</i>	<i>ipaH</i>	判定
+/-	+	-	-	EHEC 陽性
+/-	-	+	-	サルモネラ属菌陽性
+/-	-	-	+	赤痢菌陽性

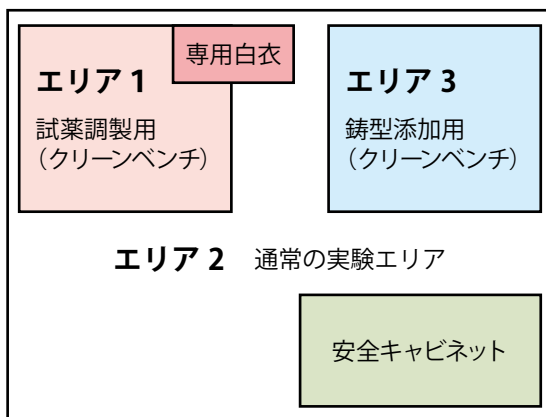
- ・ VT、*invA*、*ipaH* 遺伝子が検出された場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

###### <陰性検体の例>

IC	VT	<i>invA</i>	<i>ipaH</i>	判定
+	-	-	-	検出限界以下
-	-	-	-	判定不能

- ・ VT、*invA*、*ipaH* 遺伝子が共に検出されなかった場合には、IC の結果を確認する。
- ・ IC が検出されていれば、検出限界以下判定となる。
- ・ IC が不検出の場合は、PCR 阻害の疑いがある。サンプルを希釈するか、DNA 精製を行って再測定する。

## 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  
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。

## VIII. 関連製品

TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット Ver.2.0 (製品コード RR177A)

## IX. 注意

- ・ 本製品は検便検査用試薬です。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。
- ・ 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**