

製品コード 7730
7730S

食品・環境分析用

TAKARA

**Viable *Legionella* Selection Kit
for LC EMA-qPCR**

説明書

微生物の検出および同定には主として培養法が用いられていますが、より簡便かつ迅速に結果が得られる方法として、PCR 法等の遺伝子検出技術を応用した手法が注目され、食品・環境分野の検査などにおいて普及しつつあります。しかし、遺伝子検出技術では原理的に、生菌だけでなく死菌由来 DNA も検出されるため、目的によっては死菌検出が偽陽性と見なされることがあります。

タカラバイオの Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズは、EMA-PCR 法（下図）により生菌由来 DNA を選択的に検出するためのキットです。独自開発の技術により高い効率で EMA 処理を行い、リアルタイム PCR のように増幅サイズが短い場合でも効果的に死菌由来 DNA からの検出を抑制します。

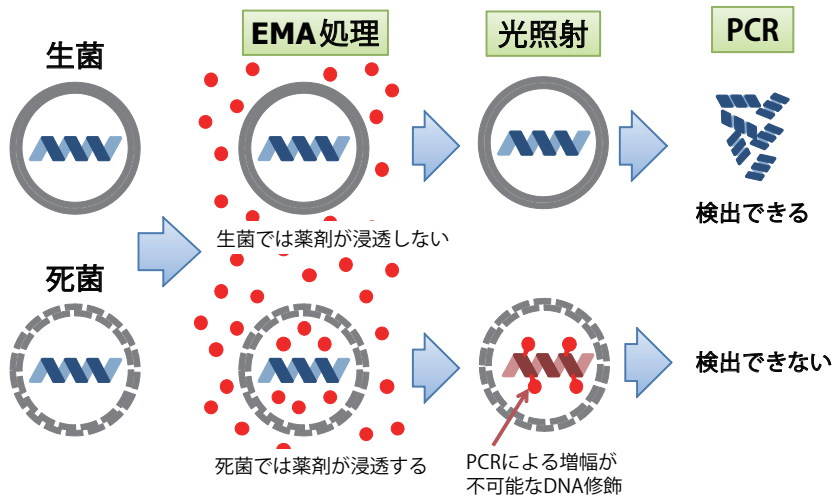


図 1. EMA-PCR 法

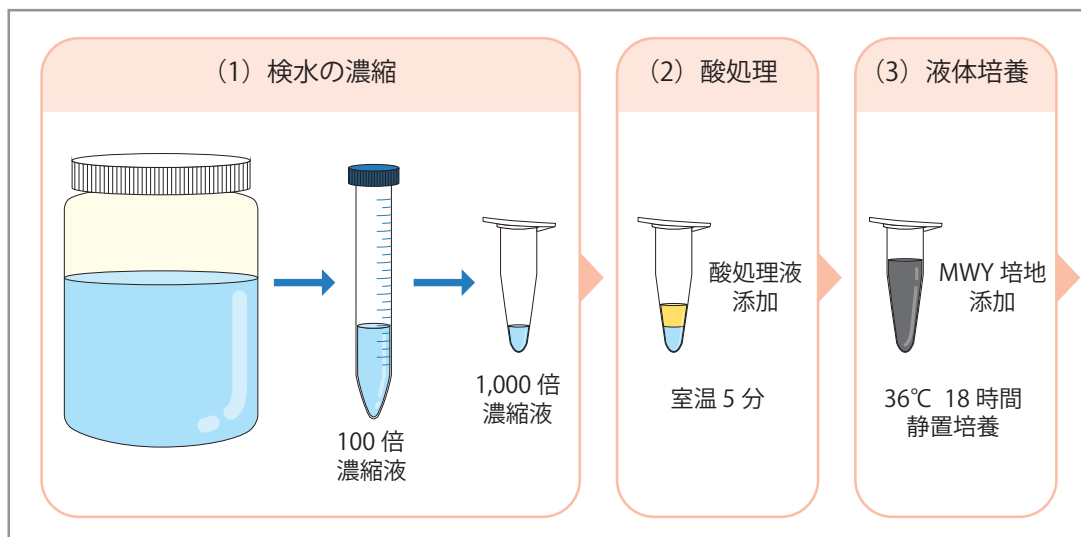
さらに進化した LC EMA-qPCR 法は、液体培養 (LC : liquid culture) による生菌の選択的増殖と EMA-PCR 法を組み合わせることにより、より確実かつ高感度に生菌を検出するための方法です。

本製品 Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR は、LC EMA-qPCR を行う際に用いるレジオネラ属菌用に至適化された EMA 処理用キットです。本製品には、EMA 処理に必要な試薬が含まれており、検体の濃縮、液体培養、DNA 抽出、リアルタイム PCR に必要な試薬「III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの) 参照」とともに用いることにより、レジオネラ属菌の LC EMA-qPCR 法による生菌選択的な検出を可能にします。

※ 令和元年 9 月 19 日に、厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」(薬生衛発 0919 第 1 号) が発出されました。これは、水質基準の項目の一つであるレジオネラ属菌の検査方法につき具体的な手順を示したもので、定量可能な迅速検査法 (遺伝子検査法) として LC EMA-qPCR 法と qPCR 法が収載されました。その中で LC EMA-qPCR 法の用途については、「迅速検査法のみで [レジオネラ属菌の]*水質基準に適合しているか否かを判断する場合は、生菌の遺伝子を定量的に検出する方法 (LC EMA-qPCR 法) を用いる」と記載されています。

(* : [] 内の文言は補足のためにタカラバイオで追記)

1 日目



2 日目

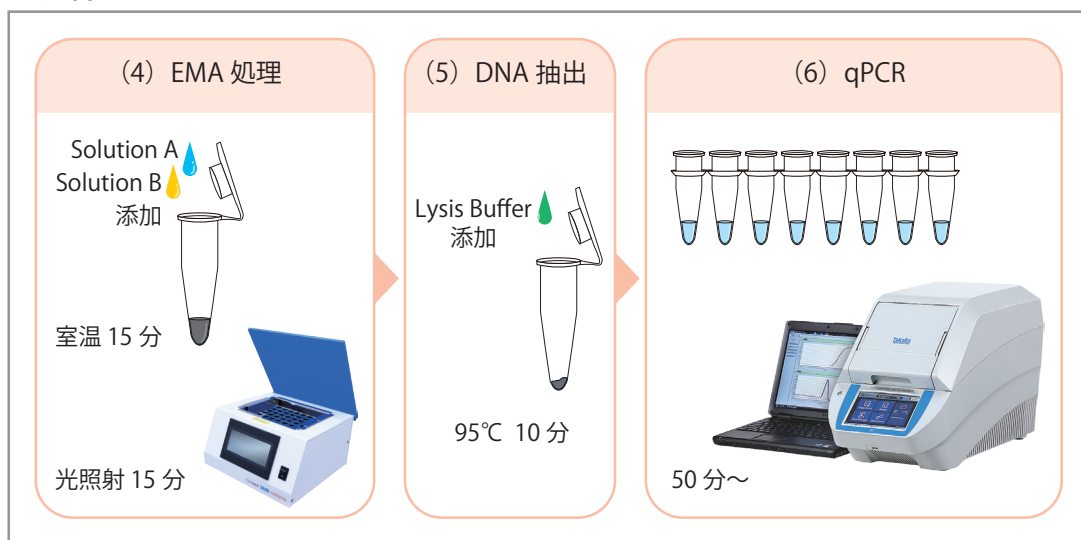


図 2. LC EMA-qPCR 法の操作フロー

I. 内容 [製品コード 7730 (50 検体分)、製品コード 7730S (25 検体分)]

	製品コード 7730	製品コード 7730S
1. Solution A-leg (LC)	625 $\mu\text{l} \times 2$	625 $\mu\text{l} \times 1$
2. Solution B-leg (LC)*	200 $\mu\text{l} \times 4$	200 $\mu\text{l} \times 2$

*：光による化学反応により物質性状が変化し、核酸修飾能が減衰しますので、遮光に留意してください。

Solution A-leg (LC)：

レジオネラ属菌の LC EMA-qPCR 法に至適化した核酸修飾反応促進試薬です。EMA 処理操作の成否を確認するためのプラスミド DNA を含みます (下記【注記】参照)。

Solution B-leg (LC)：

レジオネラ属菌の LC EMA-qPCR 法に至適化した選択的膜透過性色素 (EMA) を含む溶液です。

【注記】

別売の Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (製品コード CY290) と併せて使用することで、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズを用いた前処理操作が、検体由来成分による反応阻害などを受けることなく正しく行われたかどうかを確認することができます。

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 があらかじめ混合されており、検体に対する前処理が正しく行われると、このプラスミド DNA も同時に修飾され、PCR 増幅できない状態になります。従って、前処理を行った検体に対して、このプラスミド DNA 上の領域をターゲットとする PCR 増幅を行うことで、前処理操作の成否を確認することが可能です。

II. 保存 -20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【検水の濃縮】

- 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 μm ; Millipore 社 Code. GTTP04700、Isopore メンブレンフィルターなど
- 濾過びん
- 吸引ポンプ
- ピンセット
- 滅菌 50 ml コニカルチューブ

【液体培養】

- 酸処理液（武藤化学、0.2 M 塩酸・塩化カリウム緩衝液 pH2.2(レジオネラ検査用) : Code. 41281)
- Legionella* LC Medium Base Ver.2 (製品コード 9017)
- レジオネラ発育サプリメント (BCYE) (関東化学 (Oxoid) ; Code. 713251-1)
- レジオネラ選択サプリメント (MWY) (関東化学 (Oxoid) ; Code. 713255-1)
- インキュベーター (36°C で使用可能なもの)

【EMA 処理】

- LED Crosslinker 30 (製品コード EM300)
- または LED Crosslinker 12 (製品コード EM200 : 終売)

【DNA 抽出】

- Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 (製品コード 9183) *1
- または Lysis Buffer for *Legionella* (製品コード 9181)
- * 1 : Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 では、夾雑物を Filter Column で除去できるため DNA 溶液をより簡便に回収できます。

【リアルタイム PCR】

- CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (製品コード CY240/CY240S)
- Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (製品コード CY290)
- 【注意】本製品は、CycleavePCR *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit Ver.2.0 (製品コード CY210) と組み合わせて使用することはできません。リアルタイム PCR には、必ず CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit をご使用ください。

リアルタイム PCR 用増幅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 : 終売)
- Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (製品コード TP700/TP760 : 終売)
- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) など

【各操作共通】

- ヒートブロック (95°C で使用可能なもの)
- 微量高速冷却遠心機
- 卓上遠心機
- ボルテックスミキサー
- 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)
- 1.5 ml マイクロチューブ*2

- * 2 : EMA 処理には、無色透明チューブの使用を推奨します。弊社では下記のチューブで実績があります。
 - DNA LoBind チューブ, 1.5 ml PCR clean (Eppendorf : Code. 0030108051)
 - 1.5 ml ループ付凍結保存チューブ (SARSTEDT : Code. 72.692.100)

IV. 使用に関して

本製品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。

使用目的： 本製品は環境分析に使用する製品です。

測定結果： 本製品は検体の前処理を行い、続いて CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit を用いてリアルタイム PCR を行うことにより、レジオネラ属菌の生菌由来 DNA を死菌由来 DNA と区別して検出することを目的としています。死菌の量や試料水の組成によっては前処理に影響が生じ、死菌由来 DNA が検出される場合もあります。従って、目的によっては培養法による検査も実施の上で、総合的に結果を判定することをお勧めします。
(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。)

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。EMA を含む試薬を廃棄する際は、活性炭を通して色素を吸着させてから捨ててください。この際に使用した活性炭は、危険物として処理してください。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. 操作上の注意

1. 装置および試薬などの取扱いは該当品の取扱説明書に従ってください。
2. 万一、Solution B-leg (LC) が光により劣化すると、死菌由来 DNA への修飾効果が薄れ、生菌および死菌由来 DNA の区別を行うことができません。操作中は遮光に細心の注意を払ってください。使用しない間は、チューブをアルミホイルなどで覆って遮光してください。使用後は、アルミパックに入れて早めに冷凍庫に戻してください。
3. Solution A-leg (LC) は粘性が高いため、注意深くゆっくりとピペティングを行ってください。
4. 各試薬は、溶解後、よく混合しスピンドウンしてから使用してください。
5. 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。

VI. 操作方法

A. 液体培養 (Liquid Culture)

1. 検水の濃縮

厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」(薬生衛発 0919 第 1 号) の「別添 公衆浴場における 浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」等を参照し、ろ過濃縮を行い、さらに遠心分離により再濃縮します。

- (1) 検水 500 ml を 100 倍濃縮し 5 ml とする。
- (2) 100 倍濃縮液 1 ml を 13,000 ~ 15,000 rpm で 4℃、5 分間遠心分離後、上清 900 μ l を除去して 1,000 倍濃縮液 100 μ l とする。

※ 残りの 100 倍濃縮液は、必要に応じて 4℃で保存してください。

2. ATP 測定 (可能な場合)

- (1) 100 倍濃縮液の ATP 値を測定する。

例：ルミテスター (キッコーマン) を用いる場合

- ・綿棒を 100 倍濃縮液に浸し、直ちに測定 (検水 10 ml 相当)
- ・5,000 RLU 以上の検体は、1,000 倍濃縮液と 100 倍濃縮液の両方で以下の操作を行うとともに、A-3-(2) の酸処理時間を 20 分に延長する。

3. 酸処理

- (1) 1,000 倍濃縮液 (および 100 倍濃縮液) 100 μ l に酸処理液を 100 μ l 添加する。
- (2) 室温で 5 分 (または 20 分) 静置する。

4. 液体培養 (Liquid Culture)

- (1) MWY 液体培地*1 を 900 μ l 添加し、ボルテックスで軽く混合する。
- (2) A-4-(1) の濃縮試料液加 MWY 液体培地を 36℃、18 時間静置培養する。
- (3) 培養後、ボルテックスで混合した後、500 \times g で 15 秒間遠心し、上清 100 μ l を 1.5 ml マイクロチューブに分取する。

※ 培養後、すぐに EMA 処理を行わない場合は、4℃で保存してください。

※ 残りの濃縮試料液加 MWY 液体培地は、必要に応じて 4℃で保管してください。

* 1 : MWY 培地の調製法

1. *Legionella* LC Medium Base Ver.2 を室温で溶解する。
2. レジオネラ発育サプリメントを滅菌精製水 (温水 : 50℃未満) 5 ml で溶解し、5 ml 全量を 1. に添加する。
3. レジオネラ選択サプリメントを滅菌精製水 2 ml で溶解し、2 ml 全量を 2. に添加する。
4. スターラーで攪拌しながらマイクロチューブに 1 ml ずつ分注し、- 20℃で保存する。*2

* 2 : 活性炭によるチップの目詰まりに注意してください。

B. EMA 処理

1. A-4-(3) で分取したサンプル 100 μ l に Solution A-leg (LC) を 25 μ l 添加する。

【注意】 Solution A-leg (LC) は粘性が高いので、ピペットマンでの操作はゆっくりと行い、分取した量を目視で確認してから添加してください。

2. Solution B-leg (LC) を 12.5 μ l 添加する。

[補足] 検体数が多い場合は、予め必要量 + α の Solution A-leg (LC) & Solution B-leg (LC) の混合液を調製し、それを各チューブに分注してご使用ください。その際には、溶液の粘性が高いので、よく混合し、分注操作にも留意してください。

3. ボルテックスで混合した後、手で軽くスピンドウンする (チューブの蓋や壁に付いた水滴がだいたいチューブ底に落ちる程度に)。あるいは、ピペッティングにより混合する。

【注意】 混合後、遠心機等を使用したスピンドウンは行わないでください。遠心操作により、活性炭と共にレジオネラ菌が沈殿すると、光照射が十分に行われない可能性があります。

4. 遮光下、室温で 15 分静置する。
(この間に活性炭が沈降し、レジオネラ菌は浮遊した状態となる。)

5. LED Crosslinker 30、または LED Crosslinker 12 で 15 分間光照射を行う。

【注意】 続いて、C-1. の操作を行い、この状態でのサンプル保存は行わないでください。(C-1. の操作後は、サンプルを一時保存可能です。)

C. DNA 抽出

Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 を用いる場合

※ 製品の取扱説明書に従って操作してください。

1. B-5. で EMA 処理を行ったサンプルを 12,000 ~ 15,000 rpm (最高速度)、4°C で 5 分遠心し、上清 112.5 μ 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 25 μ l とする。

2. 1. の残渣液 25 μ l に Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 を 25 μ 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。

【注意】 Lysis Buffer for *Legionella* は、4°C 保存で凍結厳禁です。

使用前にボルテックス等でよく混合してください。また、分取する前にピペッティングで混合し、樹脂量が均一になるよう注意してください。なお、先端の細いチップを用いると、チップが詰まる場合があります。その場合は、チップの先端を切断してご使用ください。

3. 95°C で 10 分インキュベートする。

4. ボルテックスで軽く混合した後、全量を Filter Column にアプライする。

5. 11,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。

6. 溶出液 (約 50 μ l) を DNA 溶液として回収する。

※ 抽出液が青くなりますが、リアルタイム PCR 反応には影響ありません。

※ DNA 抽出後、直ちにリアルタイム PCR を行わない場合は、- 20°C で保存してください。

Lysis Buffer for *Legionella* を用いる場合

※ 製品の取扱説明書に従って操作してください。

1. B-5. で EMA 処理を行ったサンプルを 12,000 ~ 15,000 rpm (最高速度)、4℃で 5 分遠心し、上清を除去する。ペレットを吸わないよう注意すること (少量の液体が残っても問題はない)。

※ 上清を除去したペレットの状態での -20℃ 保存が可能です。

2. 1. の沈殿物に Lysis Buffer for *Legionella* を 50 μl 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。

【注意】 Lysis Buffer for *Legionella* は、4℃ 保存で凍結厳禁です。

使用前にボルテックス等でよく混合してください。また、分取する前にピペティングで混合し、樹脂量が均一になるよう注意してください。なお、先端の細いチップを用いると、チップが詰まることがあります。その場合は、チップの先端を切断してご使用ください。

3. 95℃で 10 分インキュベートする。
4. ボルテックスで軽く混合した後、15,000 rpm (最高速度)、4℃で 10 分間遠心する。
5. 氷上で 5 分間静置する。
6. 上清 25 μl を DNA 溶液として回収する。

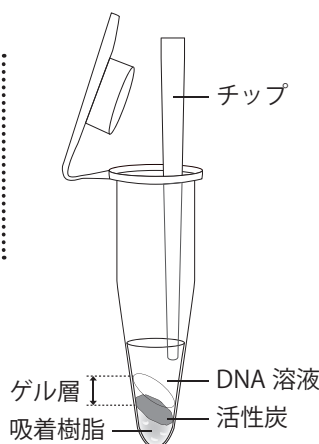
※ 抽出液が青くなりますが、リアルタイム PCR 反応には影響ありません。

※ DNA 抽出後、直ちにリアルタイム PCR を行わない場合は、-20℃で保存してください。

[補足] Lysis Buffer for *Legionella* には低濃度のゲルが添加されており、4. の遠心分離後、吸着樹脂の上にゲル層が形成されます (注: ゲル層は、目視では確認できません)。5. では、そのゲル層をしっかり固化させるため氷上で静置します。上清を回収する際は、チップの先端がゲル層に触れないよう、液面に近いところから回収するように注意してください。

◆ ここがポイント ◆

チップの先端がゲル層に触れないように、DNA 溶液を上の方からそっと吸い取ってください。



D. リアルタイム PCR (レジオネラ属菌の検出)

C-6. で調製した DNA 溶液を用いて CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (製品コード CY240/CY240S) によるリアルタイム PCR を行う。

※ CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit の説明書の「VIII. 操作」の「VIII-1-2. 反応液の調製と反応開始」から、操作を行ってください。

また、C-6. で調製した同じ DNA 溶液を Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) を用いてテストし、本製品の試薬中に含まれる反応確認用プラスミド DNA が、前処理操作後、qPCR で検出されないことを確認することにより、本製品による前処理操作が正しく行われたことを確認することができる。

【備考：死菌調製法について】

条件検討のため死菌を調製する際は、95℃、2分の熱処理または 1 ppm 30 分の次亜塩素酸処理を行う。遠心濃縮により菌を pellet down する操作が含まれるため、DNA が細胞外に遊離するような調製法は用いないこと。

VII. 検出結果の判断基準についての参考情報

1. LC EMA-qPCR 法におけるレジオネラ 1 CFU あたりの 16S Positive Control コピー数の決定

「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」より引用。

アメーバ培養レジオネラ菌の 10 倍希釈系列を用い、それぞれ 2 連で LC EMA-qPCR を行い、検量線を作成した。この回帰式の切片と、16S Positive Control の回帰式の切片の差から、レジオネラ 1 CFU 当りの 16S Positive Control コピー数が以下の通り算出された。

○ 18 時間培養 EMA 処理後のコピー数（レジオネラ 1 CFU 当り）
 $2^{(39.984-33.276)} = 104.5 \approx 100$ コピー

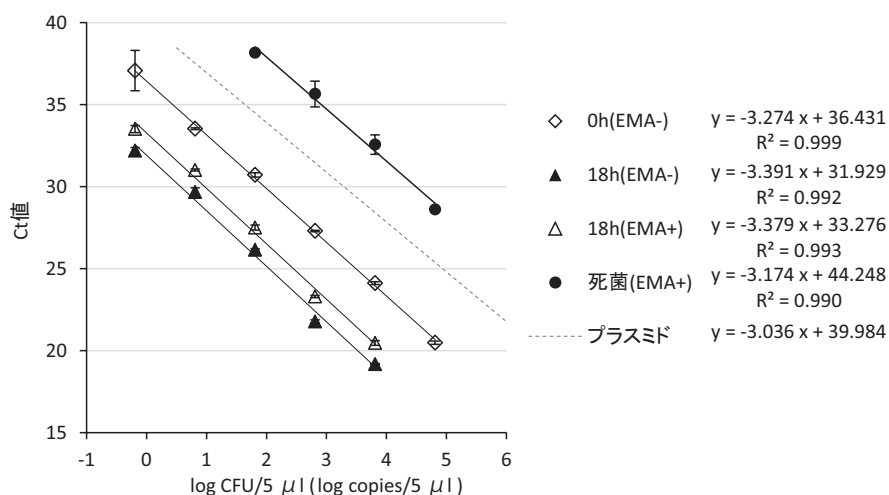


図 3. アメーバ培養レジオネラを用いた LC EMA-qPCR の検量線

図の説明：

- ◇ 0h(EMA-)： 0h（培養前）EMA 処理なし
- ▲ 18h(EMA-)： 18h（液体培養後）EMA 処理なし
- △ 18h(EMA+)： 18h（液体培養後）EMA 処理あり
- 死菌(EMA+)： 死菌 EMA 処理あり
- プラスミド： 16S Positive Control (log copies/5 μl)

※ 上記の試験では、DNA 抽出に Lysis Buffer for *Legionella* が使用されましたが、Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 を用いた場合も、コピー数から CFU への換算値は上記と同じ値を使用してください。

2. LC EMA-qPCR を用いた浴槽水等における検査結果

「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）レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究 平成 25～27 年度分担研究報告書」より引用。

全国 6 カ所の地方衛生研究所において、平成 26～27 年度に浴用施設から採取された 518 検体の試料について、平板培養法と LC EMA-qPCR 法の比較を行った。平板培養法では 140/518 検体 (27.0%) から 10 CFU/100 ml 以上のレジオネラ属菌が検出された。一方、LC EMA-qPCR 法では、カットオフ値を 1 CFU/100 ml 相当とした場合、207/518 検体 (40.0%) の検体からレジオネラ属菌の遺伝子が検出された。LC EMA-qPCR 法の平板培養法に対する感度は 89.3% (125/140 検体)、特異度は 78.3% (296/378 検体) であり、高い相関を示した。

表 1. 平板培養法と LC EMA-qPCR 法との比較

		平板培養法		計
		≥ 10	< 10	
LC EMA-qPCR 法	≥ 1	125	82	207
	< 1	15	296	311
計		140	378	518

感度 89.3% 特異度 78.3%

VIII. 参考文献

- 1) Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, and Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*. 2003 Apr; **34**(4): 804-808, 810, 812-813.
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」(薬生衛発 0919 第 1 号)
- 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
- 4) 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）「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」：平成 25～27 年度分担研究報告書

IX. 関連製品

CycleavePCR™ *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (製品コード CY240/CY240S)
Lysis Buffer for *Legionella* Ver.2 (製品コード 9183)
Lysis Buffer for *Legionella* (製品コード 9181)
Legionella LC Medium Base Ver.2 (製品コード 9017)
Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (製品コード CY290)
LED Crosslinker 30 (製品コード EM300)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)

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 PCR Ver.2.0 (製品コード 7714)

X. 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。
- ・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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社