

製品コード CY222

食品・環境分析用

Takara

CycleavePCR™
O-157 (VT1/VT2) Typing Kit

説明書

v201901Da

O157:H7をはじめとする腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、血便と激しい腹痛を伴う出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群を引き起こす病原性大腸菌の一群です。これらの重篤な症状の原因は、EHEC が産生する細胞毒素であるベロ毒素です。EHEC の検出において、この毒素遺伝子の有無を的確に、かつ迅速にチェックする検査方法の重要性が指摘されています。

本キットは、O157:H7をはじめとする EHEC による食中毒の原因遺伝子であるベロ毒素遺伝子 VT1、VT2 をリアルタイム PCR 装置を用いて検出およびタイピングするためのキットです。本キットの増幅には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*[®] HS を使用しており、反応液調製時などサイクル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になります。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。

本キットには、VT1 遺伝子および VT2 遺伝子を検出するための 2 種類の FAM 標識プローブと、インターナルコントロール DNA とインターナルコントロール検出用の ROX 標識プローブが含まれています。二波長を同時にモニタリングすることで、1 本のチューブで VT1 遺伝子または VT2 遺伝子の検出と、インターナルコントロール DNA の検出による偽陰性のモニターが可能です。リアルタイム検出なので、電気泳動が不要であり、迅速に結果が得られます。

また、本キットでは各コンポーネントのプレミックス化、ならびに検体調製 (アルカリ熱抽出) に必要な試薬類の添付により、検出操作の簡便化を図っています。

【注意】

本キットでは VT1 遺伝子と VT2 遺伝子をタイピングするために 1 サンプルに対して VT1 検出系と VT2 検出系の反応液をそれぞれ調製してリアルタイム PCR を行います。VT1、VT2 遺伝子検出用 Primer/Probe Mix を混合して使用することはできません。VT1 遺伝子と VT2 遺伝子をタイピングをする必要がない場合は、CycleavePCR O-157 (VT gene) Screenig Kit Ver.2.0 (製品コード CY217A) をご使用ください。

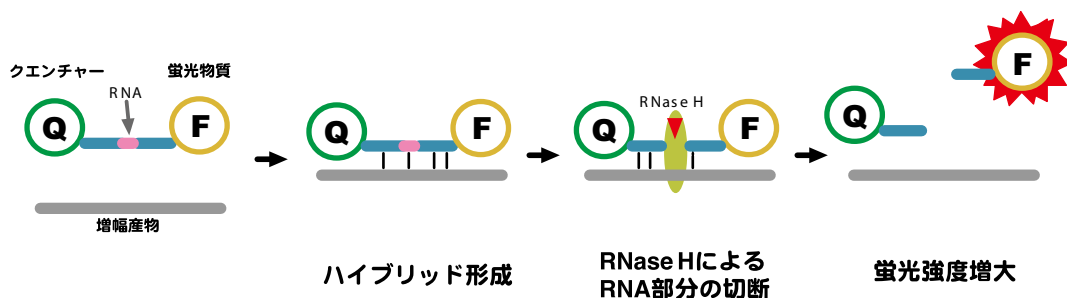


図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. 内容 (25 μ l 反応、VT1, VT2 各 25 回分)

●	1.	2 × Cycleave Reaction Mixture	2 × conc.	625 μ l
●	2A.	VT1 Primer/Probe Mix (FAM, ROX) *	5 × conc.	125 μ l
●	2B.	VT2 Primer/Probe Mix (FAM, ROX) *	5 × conc.	125 μ l
●	3.	dH ₂ O		1 ml
●	4.	NaOH Solution	50 mM	1.5 ml × 4
○	5.	Tris-HCl Buffer pH7.0	1 M	500 μ l × 2
●	6.	dH ₂ O (for Dilution)		1 ml
●	7.	VT1 Positive Control		100 μ l (20 回分)
●	8.	VT2 Positive Control		100 μ l (20 回分)

* : プライマーは株式会社島津製作所で製造されたものです。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。
本プライマーでは、ペロ毒素 1 型 (VT1) および 2 型 (VT2、VT2vha、VT2vhb、VT2vp1) 遺伝子を検出します。ターゲット遺伝子の増幅サイズは 171 bp です。

コンポーネント 1、2A、2B、3 は、製品に添付している小箱を利用し、4～8 のコンポーネントとは別にして、それぞれ -20℃ で保管してください。

【コンポーネントの説明】

2 × Cycleave Reaction Mixture : 酵素、Buffer、dNTP Mixture を含む PCR 反応試薬です。

VT1 Primer/Probe Mix :

VT1 遺伝子検出用プライマー・プローブの混合溶液です。インターナルコントロール DNA を含みます。プライマーにより、VT1 遺伝子 (ターゲット遺伝子) またはインターナルコントロール DNA を増幅し、FAM 標識プローブにより VT1 遺伝子を、ROX 標識プローブによりインターナルコントロール DNA を検出します。

VT2 Primer/Probe Mix :

VT2 遺伝子検出用プライマー・プローブの混合溶液です。インターナルコントロール DNA を含みます。プライマーにより、VT2 遺伝子 (ターゲット遺伝子) またはインターナルコントロール DNA を増幅し、FAM 標識プローブにより VT2 遺伝子を、ROX 標識プローブによりインターナルコントロール DNA を検出します。

ターゲット遺伝子 :

標的となる遺伝子。このキットの場合、ペロ毒素遺伝子 VT1 または VT2 のことです。

インターナルコントロール DNA :

ターゲット遺伝子とは無関係な配列を有する DNA 分子で、偽陰性の判定を目的としています。全ての反応系に存在させることで、ターゲットが検出されない場合にインターナルコントロール DNA の検出ができていれば、PCR 阻害が起こっていないと判断でき、サンプル中のターゲットが検出限界以下と判定できます。ターゲット、インターナルコントロール DNA がともに検出されないなら、PCR が正常に進まなかったことがわかります。なお、ターゲットの DNA 量が多い場合、そのターゲットの増幅反応が優先され、インターナルコントロール DNA のシグナルの立ち上がりが遅くなったり、シグナル強度が弱くなるあるいはシグナルが得られない場合があります。この場合、ターゲットは陽性であると判定できます。

dH₂O : 滅菌精製水です。

NaOH Solution :

アルカリ熱抽出にて、検体からサンプル調製を行うときに使用する 50 mM NaOH 溶液です。

Tris-HCl Buffer pH7.0 : アルカリ熱抽出後に中和するための溶液です。

dH₂O (for Dilution) :

反応阻害が見られた際の再反応などで、検体サンプルを希釈するために使用します。

VT1 Positive Control : VT1 遺伝子用陽性コントロールです。

VT2 Positive Control : VT2 遺伝子用陽性コントロールです。

II. 保存

－ 20℃

開封後は、コンポーネント 1～3、および 4～8 を別々の箱に入れ、それぞれ－ 20℃で保存してください。

III. キット以外に必要なもの（主なもの）

【機器】

- ・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）
Thermal Cycler Dice Real Time System Lite（製品コード TP700/TP760）
食品環境検査用ソフトウェア（日本語表示）
または、Thermal Cycler Dice Real Time System Software
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）
など
- ・ヒートブロック（95℃まで温度を上げられるもの）
- ・卓上遠心機
- ・微量高速遠心機

【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）

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/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。）
- ・判定の確定には遺伝子検査だけでなく、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) 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。
- 2) 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。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（VIII. 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。

- 4) 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。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。

VI. 操作

1. サンプルの調製
増菌培養液から菌体アルカリ熱抽出サンプルを調製する。
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
反応液を調製する。
↓
反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、または検体サンプル、または陽性コントロールを添加する。
↓
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。
↓
4. 結果表示
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

VI-1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

食品培養液からの腸管出血性大腸菌の DNA 抽出には、下記のアルカリ熱抽出法を推奨します。

《アルカリ熱抽出法》

食品培養液* 100 μ l を 1.5 ml または 2.0 ml 容量のねじ口チューブに採取する。

- ↓
- ← 10,000 $\times g$ 、10 分間遠心して上清を除く。
 - ← 沈渣に 50 mM NaOH Solution ● 85 μ l を添加し、100°C で 10 分間加熱処理する。
 - ← 1 M Tris-HCl (pH7.0) ○ 15 μ l を加えて中和する。
 - ← 2,000 ~ 10,000 $\times g$ 、10 分間遠心する。

上清を検体サンプルとして使用する。

VT1、VT2 検出用の検体サンプルとして 1 反応に 5 μ l を使用する。

*: 食品培養液は、それぞれ適切な標準プロトコールに従って食品サンプルから調製したものを使用する。

VI-2. 反応液の調製と反応開始

本キットでは、VT1 遺伝子と VT2 遺伝子をタイピングするために 1 サンプルに対して VT1 検出系と VT2 検出系の反応液を別々に調製してリアルタイム PCR を行います。

VT1 検出系では 1 本の反応チューブ内で VT1 とインターナルコントロール DNA の増幅産物を同時に検出します。正しい検出結果を得るために、VT1 陽性コントロール反応、および陰性コントロール反応を一緒に行ってください。

VT2 検出系では 1 本の反応チューブ内で VT2 とインターナルコントロール DNA の増幅産物を同時に検出します。正しい検出結果を得るために、VT2 陽性コントロール反応、および陰性コントロール反応を一緒に行ってください。

(1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、各反応チューブに 20 μ l ずつ分注し、軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして、dH₂O を 5 μ l 加えしっかりとふたをする。

必要本数は、サンプル数 + 2 本 (陰性コントロール反応として dH₂O を加えたもの、陽性コントロール反応) と設定する。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
● 2 × Cyclecleave Reaction Mixture	12.5 μ l	1 ×
● VT1 (または ● VT2) Primer/Probe Mix (5 × conc.)	5 μ l	1 ×
検体サンプル or VT1 (または VT2) Positive Control or dH ₂ O	(5 μ l) *	
● dH ₂ O	2.5 μ l	
Total	25 μ l	

* : 検体サンプルまたは陽性コントロール DNA は、ステップ (2) で加えるため、ここでは加えない。

【注意】 蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようご注意ください。

(エリア 3 へ移動)

(2) サンプル (鋳型) を添加する。(エリア 3 で実施)

陰性コントロール以外の各チューブに、検体サンプルまたは陽性コントロールを添加し、しっかりとふたをする。

反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム 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してください。

VI-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出、判定

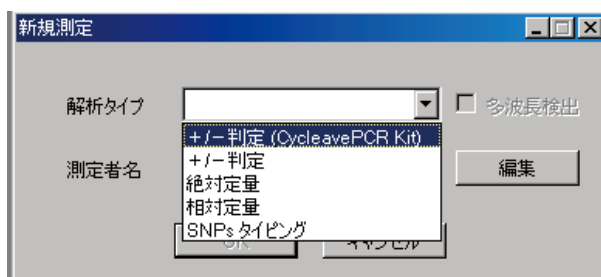
操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている取扱説明書をご確認ください。

ここでは、Thermal Cycler Dice Real Time System 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 // および Lite の場合 】

(食品環境検査用ソフトウェア)

- (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<+/-判定 (CycleavePCR Kit)>を選択する。

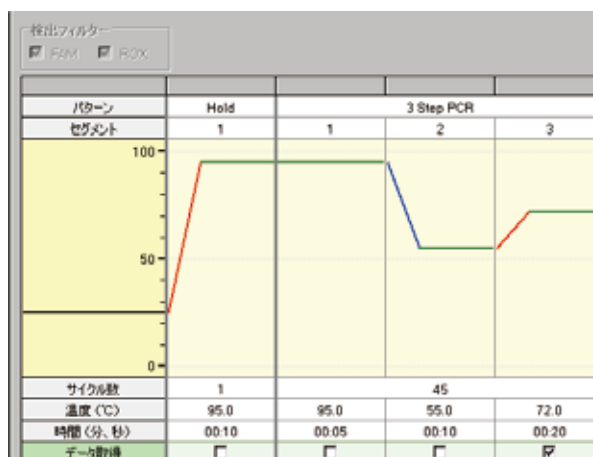


※ +/-判定 (CycleavePCR Kit) は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、<PM (M) Plus/Minus Assay 解析>を使用します。

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 PCR 条件が以下の条件になっていることを確認する。

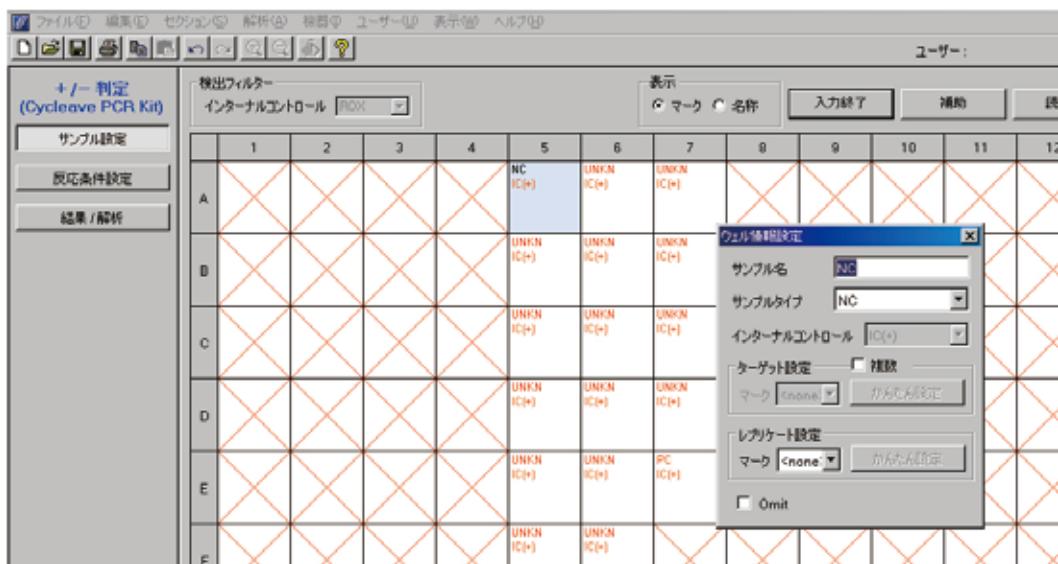
初期変性 (Hold)
Cycle : 1
95°C 10 秒
3 step PCR
Cycle : 45
95°C 5 秒
55°C 10 秒
72°C 20 秒 (検出)



- (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。

反応開始

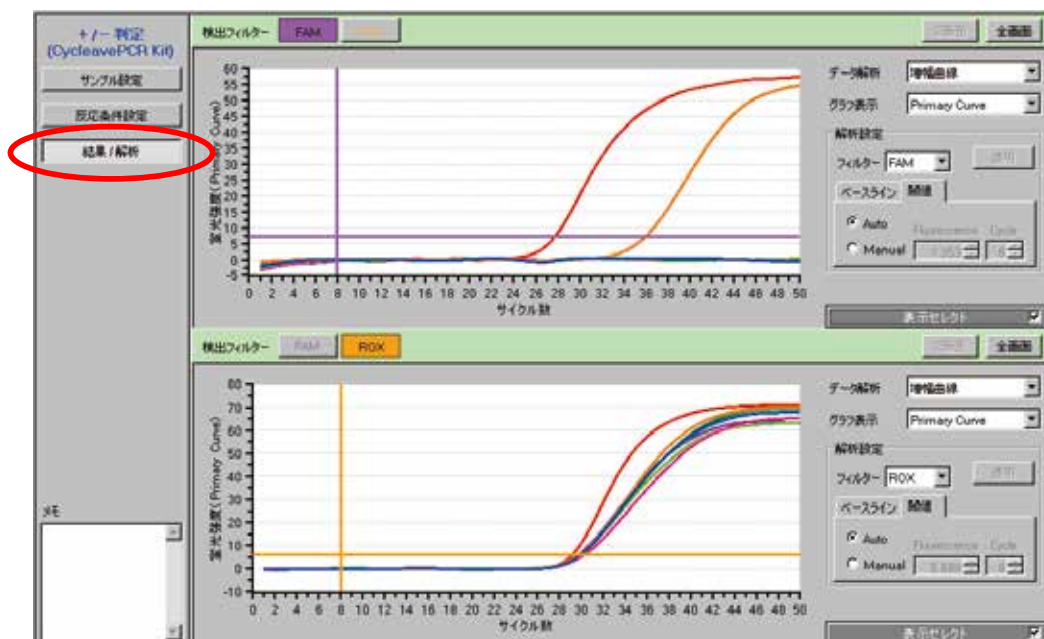
- (4) “サンプル設定”画面で“入力”ボタンをクリックしウェル情報設定を行う。反応に使用しないウェルはOmit設定する。



インターナルコントロールは、デフォルトでROXに設定されている（変更できません）。判定の信頼性を高めるため、2連以上の反応を推奨する。

(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。



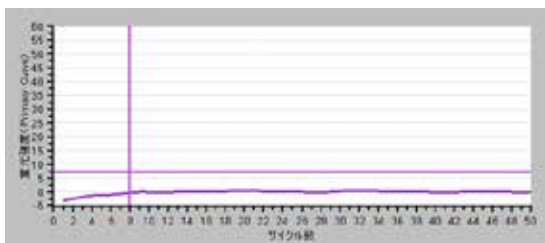
2画面の上部にターゲット遺伝子検出のFAMフィルターでの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール(IC)検出のROXフィルターでの増幅曲線が、表示される。(閾値はAutoで表示)

2. NC (陰性コントロール)、PC (陽性コントロール) での増幅曲線を確認する。

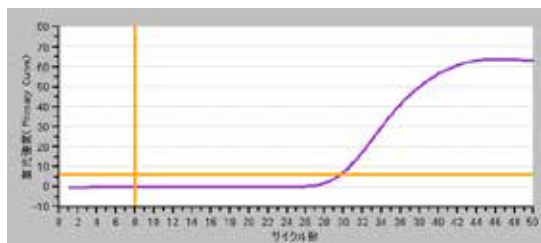
NC の増幅曲線の表示：表示セレクトで < N > を選択

FAM フィルターにおいて蛍光のシグナル変化が無いベースラインが得られ閾値を超えていないこと、ROX フィルター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。

FAM フィルター
(ターゲット遺伝子検出)



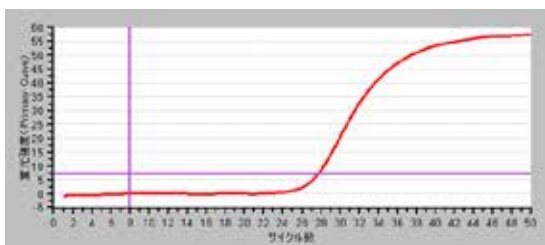
ROX フィルター
(IC 検出)



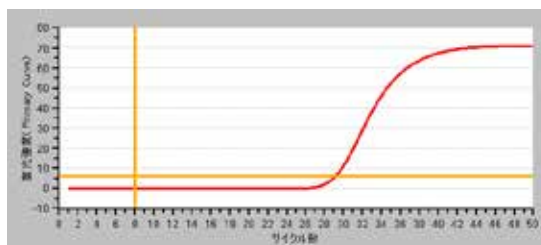
PC の増幅曲線の表示：表示セレクトで < P > を選択

FAM フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、ROX フィルターにおいても増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター
(ターゲット遺伝子検出)



ROX フィルター
(IC 検出)



3. サンプルの結果を、表示セレクトで < U > を選択し増幅曲線を確認する。

- (6) 判定結果の表示
データ解析<判定結果>を選択する。



総合判定結果の表示について

陰性コントロール<N>、陽性コントロール<P>の表示

- OK： コントロール反応が正常（反応系が正しく進んでいる。）
- OUT： コントロール反応が異常（反応系が正しく進んでいない。）

検体サンプル<U>の表示

- Posi： ターゲット遺伝子の検出が陽性
- Nega： ターゲット遺伝子が検出限界以下
- ND： 判定不能（PCR 反応が正しく進まなかった。）
インターナルコントロール、ターゲット遺伝子とも検出せず、
判定不能
- Error： 同一レプリケート番号の判定が異なる。

※ 判定は、閾値を超えているか否かにより行います。

■判定結果についての注意事項

- (1) 陰性コントロール反応において、総合判定解析が「OUT」となった。
 - ターゲット遺伝子検出において、増幅曲線が得られた。
→ 試薬中に目的産物が混入した可能性がある。再度、コンタミネーションに注意し反応を行う。
- (2) 陽性コントロール DNA 反応において、総合判定解析が「OUT」となった。
 - ターゲット遺伝子、インターナルコントロールともに増幅曲線が得られなかった。
→ 何らかの原因で PCR 反応、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。反応液の調製にミスがないことを確認し、再度反応を行う。
 - インターナルコントロール (ROX) では増幅曲線が得られるが、ターゲット遺伝子 (FAM) では増幅曲線が得られなかった。
→ Primer/Probe Mix に問題がある、または、陽性コントロール DNA が分解している可能性がある。
- (3) 検体サンプル反応において、総合判定解析が「ND」となった。
 - ターゲット遺伝子、インターナルコントロールともに増幅曲線が得られなかった。
→ サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈する、または検体サンプルの再調製を行った後、再反応を行う。

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

増幅反応は以下の手順で行う。

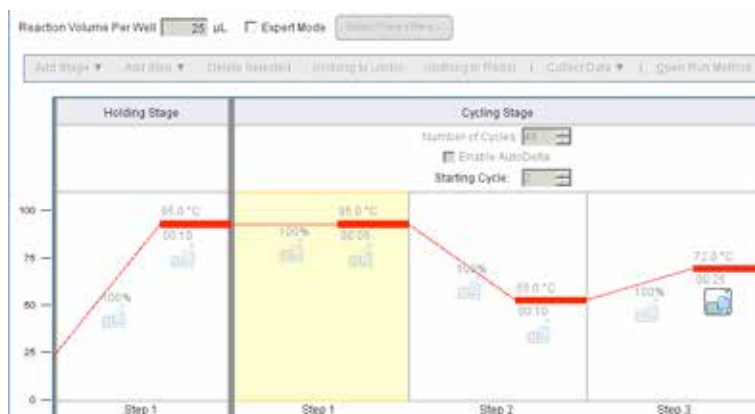
- (1) Advanced Setup で New Experiment を作成する。
- (2) Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan Reagents または Other を選択する。(Other を選択した場合は Include Melt Curve の は外しておく。)
- (3) Plate Setup の Define Target にて Target Name を VT1、Reporter を FAM、Quencher を (none) にしたものを作成する。
- (4) Plate Setup の Define Target にて Target Name を VT2、Reporter を FAM、Quencher を (none) にしたものを作成する。
- (5) Plate Setup の Define Target にて Target Name を IC、Reporter を ROX、Quencher を (none) にしたものを作成する。
- (6) Define Samples にて NC、PC とサンプルを設定する。
- (7) (3) ~ (6) 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。
- (8) 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

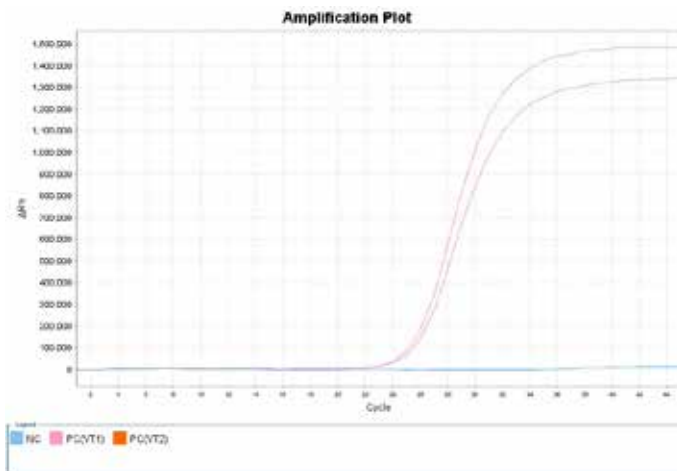
3 step PCR

Cycle : 45
95°C 5 秒
55°C 10 秒
72°C 25 秒 (検出)

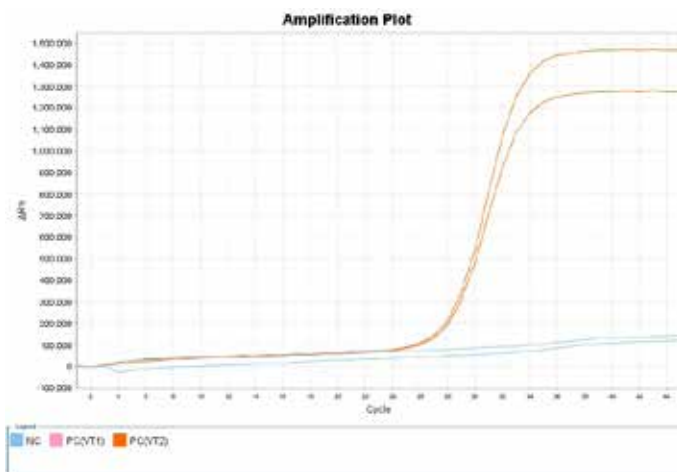


- (9) 反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。
- (10) 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線が確認できる。
(Target のプルダウンメニューから各々のターゲットを選択)

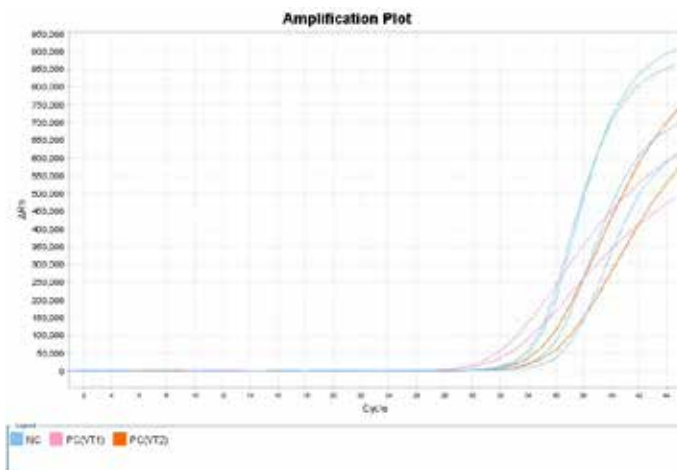
※ Threshold、Baseline は必要に応じて Manual にて設定する必要があります。



VT1 遺伝子の検出 (FAM)



VT2 遺伝子の検出 (FAM)



Internal control の検出 (ROX)

(11) 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	Cntrl	Sample No.	Target Name	Task	Date	Cr	Cr Min	Cr SD	Quantity	Quantity	Quantity	AMPLC	HSP-SD	Flag	Control
IC																
1	A1	NC	IC	NTC	ROX-HIQ-W08	37.143	36.593	0.557								
2	B1	NC	IC	NTC	ROX-HIQ-W08	36.622	36.593	0.027								
3	C1	PG(VT1)	IC	URP-DOWN	ROX-HIQ-W08	33.936	33.491	0.719								
4	D1	PG(VT1)	IC	URP-DOWN	ROX-HIQ-W08	33.931	33.491	0.719								
5	E1	NC	IC	NTC	ROX-HIQ-W08	34.836	34.676	0.177								
6	F1	NC	IC	NTC	ROX-HIQ-W08	34.821	34.676	0.177								
7	D1	PG(VT2)	IC	URP-DOWN	ROX-HIQ-W08	35.521	36.150	0.93								
8	H1	PG(VT2)	IC	URP-DOWN	ROX-HIQ-W08	36.915	36.150	0.93								
VT1																
9	A1	NC	VT1	NTC	FAM-F2-M00	36.719	36.643	0.187								
10	B1	NC	VT1	NTC	FAM-F2-M00	36.553	36.643	0.187								
11	C1	PG(VT1)	VT1	URP-DOWN	FAM-F2-M00	28.538	31.181	0.324								
12	D1	PG(VT1)	VT1	URP-DOWN	FAM-F2-M00	21.844	21.193	0.324								
VT2																
13	E1	NC	VT2	URP-DOWN	FAM-F2-M00	33.931	36.523	2.386								
14	F1	NC	VT2	URP-DOWN	FAM-F2-M00	36.876	36.676	3.896								
15	G1	PG(VT2)	VT2	URP-DOWN	FAM-F2-M00	28.634	27.795	0.7								
16	H1	PG(VT2)	VT2	URP-DOWN	FAM-F2-M00	28.936	27.795	0.7								
No Target Name																
17	A1															
18	A2															
19	A3															

※ StepOnePlus Real-Time PCR System も同様な操作で使用できます。ただし、ROX の検出感度が低いため、全 target を同時に表示すると、ROX (IC) の増幅曲線が小さく表示されます。FAM と ROX の target を別々に表示させて解析してください。

VII. 判定結果表

- 判定結果表 1：検体サンプルを添加した場合
(各コントロール反応の結果とあわせて最終判定を行うこと)

		ROX (インターナルコントロール DNA)	
		増幅シグナル (+)	増幅シグナル (-)
FAM (VT1 または VT2)	増幅シグナル (+)	ベロ毒素遺伝子陽性*1	ベロ毒素遺伝子陽性*1
	増幅シグナル (-)	ベロ毒素遺伝子検出限界以下*2	判定不能*3

- 判定結果表 2：陽性コントロール (VT1 (VT2) Positive Control を添加したもの)

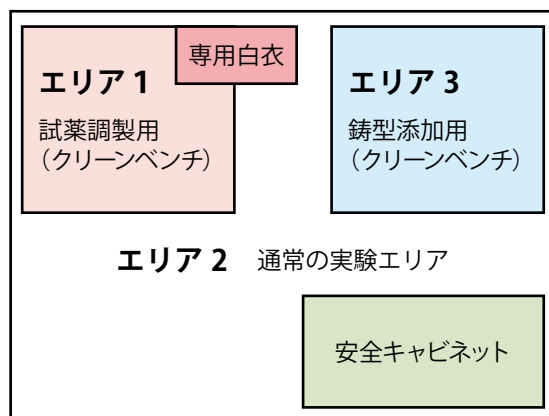
		ROX (インターナルコントロール DNA)	
		増幅シグナル (+)	増幅シグナル (-)
FAM (VT1 または VT2)	増幅シグナル (+)	ターゲット検出系に問題なし	ターゲット検出系に問題なし
	増幅シグナル (-)	ターゲット検出系に問題あり*4	判定不能*3

- 判定結果表 3：陰性コントロール (dH₂O を添加したもの)

		ROX (インターナルコントロール DNA)	
		増幅シグナル (+)	増幅シグナル (-)
FAM (VT1 または VT2)	増幅シグナル (+)	ターゲット検出系に コンタミネーションの疑い*5	ターゲット検出系に コンタミネーションの疑い*5
	増幅シグナル (-)	ターゲット検出系に コンタミネーションはない*2	判定不能*3

- * 1： インターナルコントロール DNA 検出結果の (+) / (-) に関わらず、VT1 あるいは VT2 遺伝子が陽性である。陰性コントロール反応の結果から反応系にコンタミネーションがなかったことを確認すること。
- * 2： 陽性コントロールの検出結果が (+) となる (反応系に問題がない) ことを確認すること。
- * 3： 何らかの原因で PCR 反応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。サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、場合によっては検体の再調製が必要。
- * 4： ターゲット増幅用プライマーあるいはターゲット検出用プローブに問題があるか、Positive Control が分解している。
- * 5： コンタミネーションの疑いがある場合は、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。

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
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鑄型となる 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鑄型 DNA の添加を行う。
標準サンプルの希釈もここで行う。

IX. 参考文献

- 1) Takao, T., T. Tanabe, Y. -M. Hong, Y. Shimonishi, H. Kurazono, T. Yutsudo, C. Sasakawa, M. Yoshikawa, and Y. Takeda. Identity of molecular structure of Shiga-like toxin (VT1) from *Escherichia coli* O157: H7 with that of Shiga toxin. *Microb Pathog.* (1988) **5**: 357-369.
- 2) Jackson, M. P., R. J. Neil, A. D. O' Brien, R. K. Holmes, and J. W. Newland. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural gene for Shiga-like toxin Öüand Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbio Lett.* (1987) **44**: 109-114.
- 3) Ito, H., A. Terai, H. Kurokawa, Y. Takeda, and M. Nishibuchi. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91: H21 isolated from a patient with the haemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog.* (1990) **8**: 47-60.
- 4) Weinstein, D. L., M. P. Jackson, J. E. Samuel, R. K. Holmes, and A. D. O' Brien. Cloning and Sequencing of a Shiga-like toxin typell variant from a *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol.* (1955) **170**: 4223-4230.

X. 関連製品

CycleavePCR™ O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0 (製品コード CY217A/B)
CycleavePCR™ EHEC (O157/O26) Typing Kit (製品コード CY237)
CycleavePCR™ EHEC (O111/O121) Typing Kit (製品コード CY238)
CycleavePCR™ EHEC (O103/O145) Typing Kit (製品コード CY239)
CycleavePCR™ EHEC (O165) Typing Kit (製品コード CY241)
EHEC (O antigens) PCR Typing Kit (製品コード RR133A)
CycleavePCR™ *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0 (製品コード CY205)

Thermal Cycler Dice® Real Time System // (製品コード TP900/TP960)
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)
96well 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)
48 well snap plate (製品コード NJ700)
Flat cap for snap plate (製品コード NJ720)
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)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)

XI. 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。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社