

製品コード CY223

食品・環境分析用

Takara

CycleavePCR™
Listeria monocytogenes (*inlA* gene)
Detection Kit

説明書

v201901Da

リステリア菌はグラム陽性、鞭毛を持つ無芽胞の短桿菌 (0.4 ~ 0.5 × 0.5 ~ 2.0 μm) です。分類学的には *Listeria* 属で、この属には 8 菌種があります。これらの中でヒトリステリア症の病原菌は、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) 1 菌種と報告されており、発熱、頭痛をともなった髄膜炎や敗血症、心内膜炎、肺炎などの多発性膿瘍を引き起こします。

1980 年以降、食品を媒介とする集団食中毒の原因菌であったことから、食中毒病原菌として注目されるようになりました。

本キットは *Listeria monocytogenes* が細胞内に侵入するときに関与する分子 Internalin A (*inlA*) をコードする遺伝子配列領域をターゲットとして、リアルタイム PCR による検出を行うためのキットです。

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、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、細胞侵入関連分子をコードする *inlA* 遺伝子を検出するための FAM 標識プローブと、インターナルコントロール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、一本のチューブで *inlA* 遺伝子の検出とインターナルコントロール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。

※本キットの開発には、東京海洋大学 木村 凡先生、高橋 肇先生にご協力いただきました。

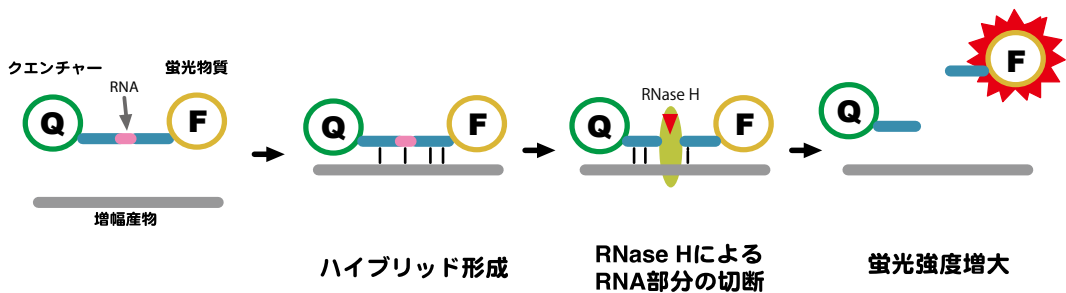


図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. 内容 (25 μ l 反応、50 回分)

●	1. 2 × Cyclecleave Reaction Mixture	2 × conc.	625 μ l
●	2. INL A Primer/Probe Mix (FAM, ROX) *	5 × conc.	250 μ l
○	3. dH ₂ O		1 ml
●	4. INL A Positive Control		150 μ l

* : 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。

2 × Cyclecleave Reaction Mixture :

PCR 反応試薬です。反応に必要な酵素、Buffer、dNTP mixture を含みます。

INL A Primer/Probe Mix (FAM, ROX) :

インターナルコントロール DNA を含むターゲット (*inlA*) 遺伝子検出用のプライマー・プローブの混合溶液です。プライマーにより、ターゲット (*inlA*) 遺伝子、または、インターナルコントロール DNA を増幅し、異なるレポーター色素が標識されたプローブにより、ターゲット (*inlA*) 遺伝子、または、インターナルコントロール DNA を検出します。ターゲット (*inlA*) 遺伝子検出用プローブは FAM、インターナルコントロール DNA 検出用プローブは ROX という蛍光物質が標識されています。

インターナルコントロール :

ターゲット (*inlA*) 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。すべての反応系に存在させることで、ターゲットが不検出の場合、インターナルコントロールの検出ができていれば、PCR 反応阻害が起こらず検出限界以下と判定できます。ターゲット (*inlA*) 遺伝子も、インターナルコントロールも不検出である場合、PCR 反応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のシグナルの立ち上が遅くなったり、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ということがあります。この場合、ターゲット遺伝子の検出が正しくなされており、陽性であると判定できます。

ターゲット遺伝子 :

標的となる遺伝子。このキットの場合、細胞侵入関連分子をコードする *inlA* 遺伝子のことです。

dH₂O : 滅菌精製水です。

INL A Positive Control :

inlA 遺伝子用陽性コントロール DNA です。

II. 保存 — 20°C

III. キット以外に必要な試薬、機器（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 //（製品コード TP900/TP960）
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）
- ※ チューブ 1 本ごとにフラットキャップが付いているキャップ付き 0.2 ml 8 連チューブを Thermal Cycler Dice Real Time System 専用として販売しています。チューブ間のコンタミの危険性が軽減できるので特にお勧めします。
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat caps（製品コード NJ600）

【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）
- ・卓上遠心器
- ・微量高速遠心機（4℃設定可能）

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) 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
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
画面の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. サンプルの調製例（エリア 2 で実施）

食品増菌液からの菌体 DNA 抽出サンプルの調製例

食品 25 g をハーフフレーザー培地、またはフレーザー培地*¹ 225 ml で食品乳剤とし、30℃で 24 時間増菌培養後、増菌培養液 1 ml をチューブに取り、集菌後、NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10）の説明書の「Support protocol for bacteria」に従って DNA を抽出する。最終的に 50 μ l で溶出し、2.5 μ l を PCR 用サンプルとする。

菌体熱抽出サンプルの調製例

プレート（PALCAM 寒天培地*² など）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で微量の菌体を取り、滅菌精製水 100 μ l に懸濁後、95℃で 5 分間熱処理する。その上清 2.5 μ l を PCR 用サンプルとする。

* 1：ハーフフレーザー培地、または、フレーザー培地；Merck 社

* 2：PALCAM 寒天培地；Merck 社

VI-2. 反応液の調製と反応開始

本製品は 1 本の反応チューブ内で *inlA* 遺伝子とインターナルコントロール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、*inlA* 遺伝子陽性コントロール反応 (INL A Positive Control)、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 22.5 μ l ずつ分注して軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして、滅菌精製水 2.5 μ l を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滅菌精製水を加えたもの、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 \times Cycleave Reaction Mixture ●	12.5 μ l	1 \times
INL A Primer/Probe Mix (5 \times conc.) ●	5 μ l	1 \times
検体サンプル または INL A Positive Control または滅菌精製水	(2.5 μ l) *	
dH ₂ O ○	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

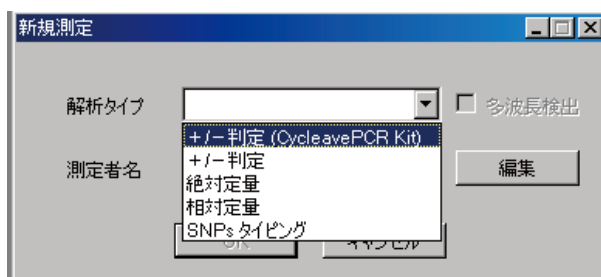
操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている取扱説明書をご確認ください。

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

(食品環境検査用ソフトウェア)

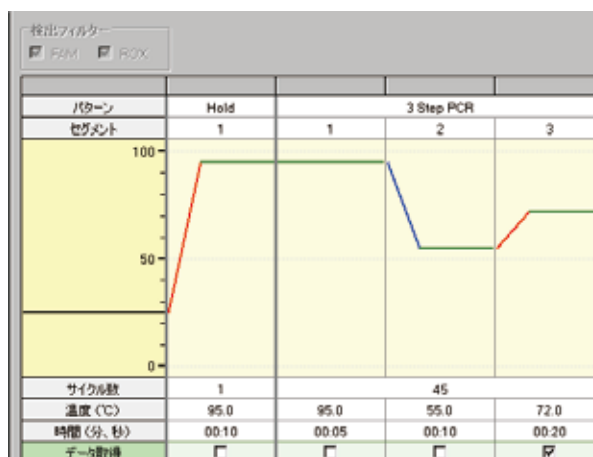
- (1) ランファイルを新規作成し、“新規測定”画面において解析タイプ<+/-判定 (CycleavePCR Kit)>を選択する。



※ +/-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。

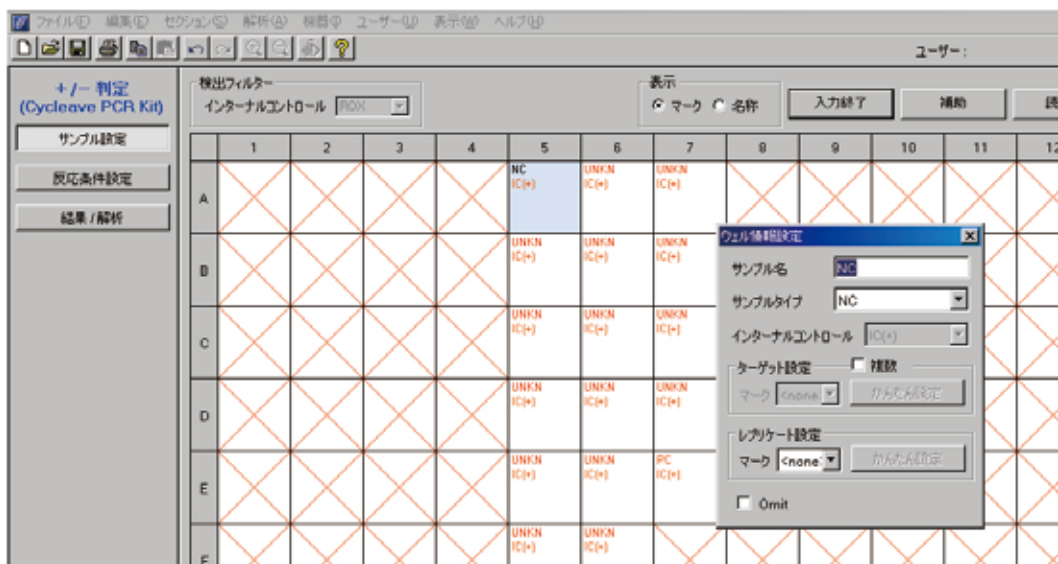
初期変性 (Hold)
Cycle : 1
95°C 10 秒
3 step PCR
Cycle : 45
95°C 5 秒
55°C 10 秒
72°C 20 秒 (検出)



- (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

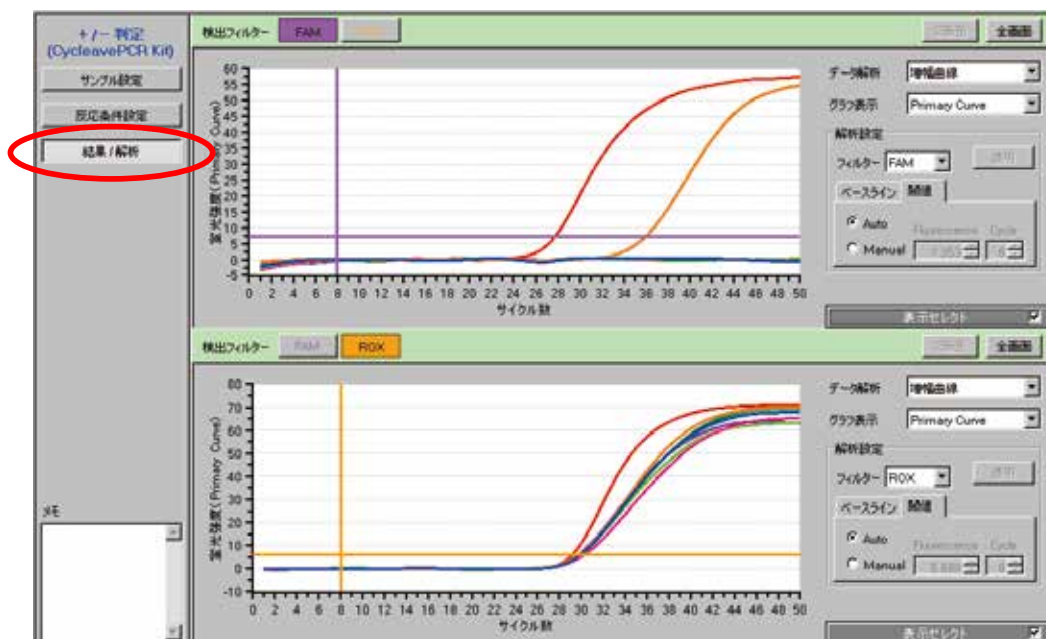
- (4) “サンプル設定”画面で“入力”ボタンをクリックしウェル情報設定を行う。反応に使用しないウェルはOmit設定する。



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連以上での反応を推奨する。

- (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。



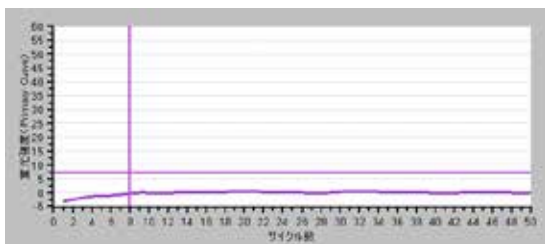
2画面の上部にターゲット遺伝子検出のFAMフィルターでの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール(IC)検出のROXフィルターでの増幅曲線が表示される。(閾値はAutoで表示)

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。

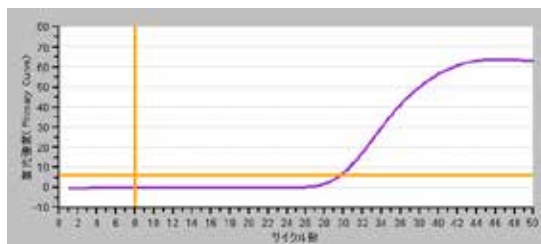
NC の増幅曲線の表示：表示セレクトで < N > を選択

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)



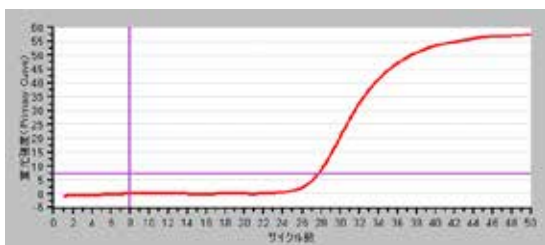
ROX フィルター
(IC 検出)



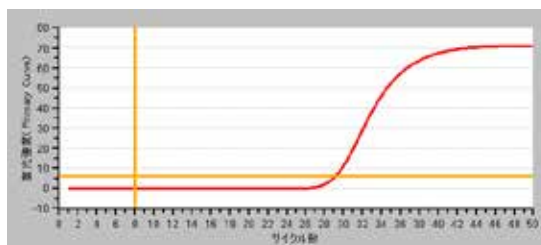
PC の増幅曲線の表示：表示セレクトで < P > を選択

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) 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未滿

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て反応を行う。

- (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 *inlA*、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 IC、Reporter を ROX、Quencher を (none) にしたものを作成する。
- (5) Define Samples にて NC、PC とサンプルを設定する。
- (6) (3)、(4)、(5) 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。
- (7) 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

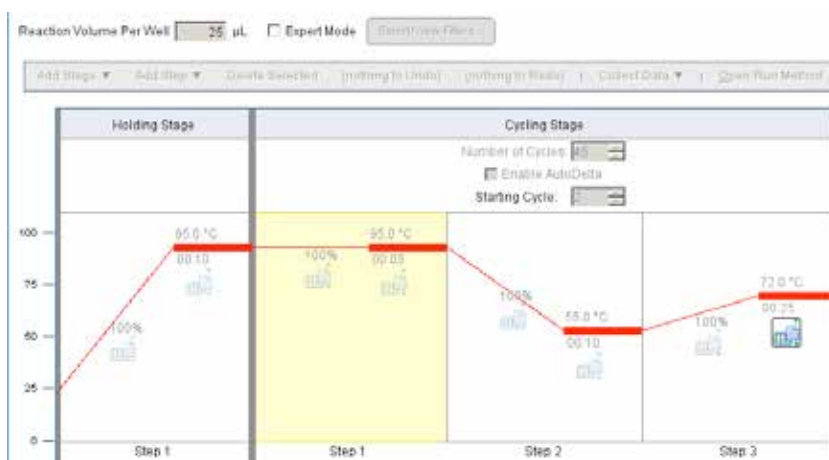
3 step PCR

Cycle : 45

95°C 5 秒

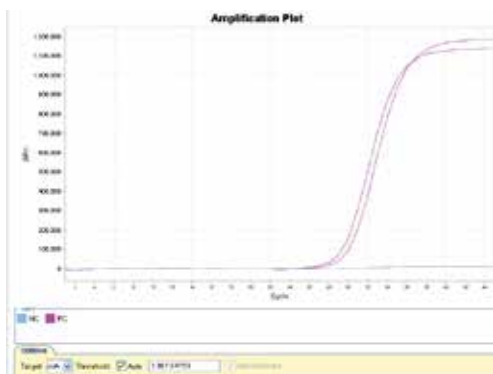
55°C 10 秒

72°C 25 秒 (検出)

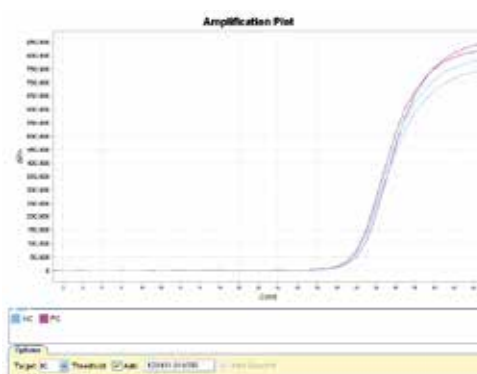


- (8) 反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。

- (9) 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。



inIA Target の検出 (FAM)



IC (インターナルコントロール) の検出 (ROX)

- (10) 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	Omit	Sample No.	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity
IC										
1	C6	<input type="checkbox"/>	NC	IC	UNKNOWN	ROX-NFO-MGB	32.935	32.881	0.076	
2	D6	<input type="checkbox"/>	NC	IC	UNKNOWN	ROX-NFO-MGB	32.827	32.881	0.076	
3	E6	<input type="checkbox"/>	PC	IC	UNKNOWN	ROX-NFO-MGB	32.772	32.991	0.309	
4	F6	<input type="checkbox"/>	PC	IC	UNKNOWN	ROX-NFO-MGB	33.209	32.991	0.309	
inIA										
5	C6	<input type="checkbox"/>	NC	inIA	NTC	FAM-NFO-MGB	30.853	30.586	0.377	
6	D6	<input type="checkbox"/>	NC	inIA	NTC	FAM-NFO-MGB	30.319	30.586	0.377	
7	E6	<input type="checkbox"/>	PC	inIA	UNKNOWN	FAM-NFO-MGB	24.967	25.436	0.663	
8	F6	<input type="checkbox"/>	PC	inIA	UNKNOWN	FAM-NFO-MGB	25.904	25.436	0.663	
No Target Name										
9	A1	<input type="checkbox"/>								
10	A2	<input type="checkbox"/>								
11	A3	<input type="checkbox"/>								
15	A4	<input type="checkbox"/>								

- ※ 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：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）	
		増幅シグナル（+）	増幅シグナル（-）
FAM (<i>inlA</i> 遺伝子)	増幅シグナル（+）	<i>inlA</i> 遺伝子陽性*1	<i>inlA</i> 遺伝子陽性*1
	増幅シグナル（-）	<i>inlA</i> 遺伝子検出限界以下*2	判定不能*3

判定結果表 2：ポジティブコントロール（INL A Positive Control を添加したもの）

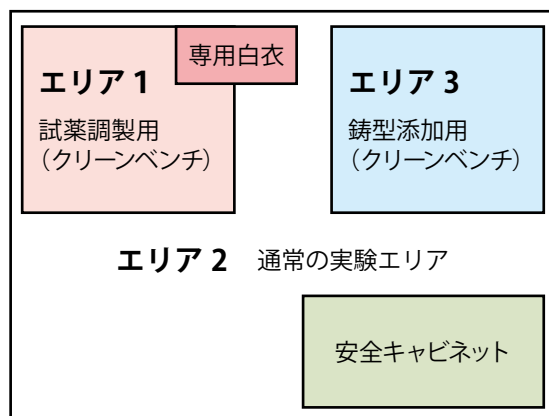
		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（+）	増幅シグナル（-）
FAM (<i>inlA</i> 遺伝子)	増幅シグナル（+）	<i>inlA</i> 遺伝子検出系に問題なし	<i>inlA</i> 遺伝子検出系に問題なし
	増幅シグナル（-）	<i>inlA</i> 遺伝子検出系に問題あり*4	判定不能*3

判定結果表 3：陰性コントロール（滅菌水を添加したもの）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（+）	増幅シグナル（-）
FAM (<i>inlA</i> 遺伝子)	増幅シグナル（+）	<i>inlA</i> 遺伝子検出系にコンタミネーションの疑い*5	<i>inlA</i> 遺伝子検出系にコンタミネーションの疑い*5
	増幅シグナル（-）	<i>inlA</i> 遺伝子検出系にコンタミネーションはない	判定不能*3

- * 1：インターナルコントロールの（+）/（-）に関わらず、*inlA* 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反応で（+）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：INL A Primer/Probe Mix に問題があるか、INL A 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。
(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。

IX. 参考文献

Handa-Miya S, Kimura B, Takahashi H, Sato M, Ishikawa T, Igarashi K, Fujii T:
Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes*
isolates from ready-to-eat seafood products in Japan.
Int J Food Microbiol. (2007) **117**(3): 312-318.

X. 関連製品

CycleavePCR™ O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0 (製品コード CY217A/B)
CycleavePCR™ O-157 (VT1/VT2) Typing Kit (製品コード CY222)
CycleavePCR™ *Bacillus cereus* (CRS gene) Detection Kit (製品コード CY221)
CycleavePCR™ *Vibrio* (*tdh* gene) Detection Kit (製品コード CY220)
CycleavePCR™ *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0 (製品コード CY205)
CycleavePCR™ *Staphylococcus aureus* (*DnaJ* gene) Detection Kit (製品コード CY228)
CycleavePCR™ *Campylobacter* (*jejuni/coli*) Typing Kit (製品コード CY225)
NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)
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)
96 well 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)

IX. 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。*Cycleave*PCR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