

製品コード CY225

食品・環境分析用

Takara
CycleavePCR™
Campylobacter (jejuni / coli)
Typing Kit

説明書

v201901Da

カンピロバクターによる食中毒の発生件数は年々増加の傾向にあり、主要な食中毒原因菌のひとつとして注目されています。カンピロバクター属菌は酸素が3～10%の微好気条件下で増殖する螺旋状グラム陰性細菌です。カンピロバクターが引き起こす主たる症状は腸炎ですが、その原因菌の約90%が *Campylobacter jejuni* であり、数%が *Campylobacter coli* であると言われています。

現在、カンピロバクターの検出・同定は培養法によって行われていますが、菌の増殖が遅いため前培養で1～2日かかり、さらに生化学的性状解析による菌種同定に数日間を要し、カンピロバクターの確実な菌種同定には1週間程度かかります。そのためPCR法等の遺伝子検出技術を応用した迅速な検出・同定法が待ち望まれていました。

本キットは、カンピロバクター属菌が保有する Cytolethal distending toxin 遺伝子 (*cdt* genes) の C サブユニット遺伝子 (*cdtC* gene) をターゲットとして、*C. jejuni*、*C. coli* の2菌種をリアルタイムPCR装置を用いて検出および同定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、*C. jejuni* 検出系として、*C. jejuni* の *cdtC* gene 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 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、*C. coli* 検出系として、*C. coli* の *cdtC* gene 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 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。

FAM と ROX の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 *C. jejuni* の *cdtC* gene または *C. coli* の *cdtC* gene 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。

なお、本キットでは *C. jejuni* と *C. coli* の *cdtC* gene を検出・同定するために1サンプルに対して *C. jejuni* 検出系と *C. coli* 検出系の反応液を別に調製してリアルタイムPCRを行います。(注意：*C. jejuni*、*C. coli* 検出用 Primer/Probe Mix を混ぜて使うことはできません。)

本キットの製品化にあたりましては、大阪府立大学および扶桑薬品工業株式会社のご協力をいただきました。

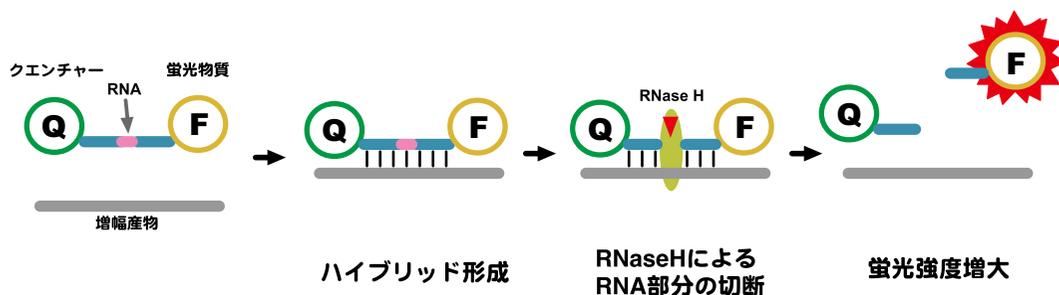


図1. サイクリングプローブ法の原理

I. 内容 (25 µl 反応、*C. jejuni*、*C. coli* 各 25 回分)

● 1.	2 × Cyclecleave Reaction Mixture	2 × conc.	625 µl
● 2.	<i>C. jejuni</i> Primer/Probe Mix (FAM, ROX) *1	5 × conc.	125 µl
● 3.	<i>C. coli</i> Primer/Probe Mix (FAM, ROX) *1	5 × conc.	125 µl
○ 4.	dH ₂ O		1 ml
● 5.	<i>C. jejuni</i> Positive Control *2		50 µl (10回分)
● 6.	<i>C. coli</i> Positive Control *2		50 µl (10回分)

* 1 : 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 : コンポーネント 5、6 は、製品に添付している小箱を利用し、他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 × Cyclecleave Reaction Mixture :

酵素、バッファー、dNTP mixture を含む PCR 反応試薬です。

***C. jejuni* Primer/Probe Mix :**

C. jejuni の *cdtC* gene 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、*C. jejuni* の *cdtC* gene (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 *C. jejuni* の *cdtC* gene 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。

***C. coli* Primer/Probe Mix :**

C. coli の *cdtC* gene 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、*C. coli* の *cdtC* gene (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 *C. coli* の *cdtC* gene 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、*C. jejuni* または *C. coli* の *cdtC* gene のことです。

インターナルコントロール DNA :

偽陰性の判定を目的とした、ターゲット遺伝子とは無関係な配列を有する DNA 分子です。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。この場合にもターゲットは陽性であると判定できます。

dH₂O : 滅菌精製水

***C. jejuni* Positive Control :** *C. jejuni* の *cdtC* gene 検出用陽性コントロール

***C. coli* Positive Control :** *C. coli* の *cdtC* gene 検出用陽性コントロール

II. 保存

− 20℃

開封後は、コンポーネント 1～4、および 5～6 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)

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

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)

【その他】

1,000 μl、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)

卓上遠心機

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 (IX. 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
増菌培養液やコロニーから菌体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)

<食品や便*、土壌、水などの環境由来検体の調製例>

- 増菌培養～分離培養で得たコロニーからサンプルを調製する場合：
 - (1) 検体を培地等に直接懸濁する、もしくはストマッカー等を用いて揉み出し液を作製する。
 - (2) 得られた処理液をボルトン培地もしくはプレストン培地に加え、37℃、24～48 時間、微好気条件下 (5% O₂、10% CO₂、85% N₂) で増菌培養を行う。
 - (3) 増菌培養液を CCDA 培地やスキロー寒天培地等の選択培地、もしくはフィルター法 [血液寒天上に滅菌用メンブレンフィルター (孔径 0.45 μm) を置き、その上に増菌培養液を広げる。30 分間、微好気条件下のインキュベータ内で静置した後、フィルターを取り除き、培養する] にて 42℃、48 時間、微好気条件下 (5% O₂、10% CO₂、85% N₂) で分離培養を行う。
 - (4) プレート (スキロー寒天培地など) 上のコロニーから、滅菌済み白金耳などで微量の菌体を取り、TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0) に懸濁する。このときの菌濃度は濁度 (A₆₀₀) で約 0.1 を目安に調製する。
 - (5) 沸騰水もしくは 95℃以上で 10 分間熱処理する。
 - (6) 15,000 rpm、10 分間遠心して得られた上清を熱抽出サンプルとする。
- 増菌培養液もしくは検体懸濁液からサンプルを調製する場合
 - (1) 増菌培養液もしくは検体の懸濁液を軽く遠心 (1,200 rpm、5 分間) し、残渣を取り除いた後、15,000 rpm、10 分間遠心する。
 - (2) 得られた沈殿に適量の TE buffer を加え、沸騰水もしくは 95℃以上で 10 分間熱処理する。
 - (3) 15,000 rpm、10 分間遠心して得られた上清を熱抽出サンプルとする。もしくは NucleoSpin Tissue を用いて DNA を抽出し、PCR テンプレートとする。

*：便検体の場合、直接 TE buffer に懸濁し、ボイル法にてテンプレートを作製することも可能です。ただし、便サンプル量を多く加えすぎると、逆に PCR 反応を阻害します。
通常、直腸スワブに付着した程度の便量ならば、直接熱抽出により PCR が可能です。

VI-2. 反応液の調製と反応開始

本キットでは、*C. jejuni* の *cdtC* gene と *C. coli* の *cdtC* gene を検出およびタイピングするために、1 サンプルに対して *C. jejuni* 検出系と *C. coli* 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。

C. jejuni 検出系では 1 本の反応チューブ内で *C. jejuni* の *cdtC* gene 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、*C. jejuni* 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。

C. coli 検出系では 1 本の反応チューブ内で *C. coli* の *cdtC* gene 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、*C. coli* 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）。

鋳型（検体サンプル等）以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、反応チューブに 20 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、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（陽性コントロール、陰性コントロールとして dH₂O を加えたもの）と設定する。

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture (●)	12.5 μ l	1 ×
<i>C. jejuni</i> (または <i>C. coli</i>) Primer/Probe Mix (5 × conc.) (●または●)	5 μ l	1 ×
検体サンプル or <i>C. jejuni</i> (または <i>C. coli</i>) Positive Control or dH ₂ O	(5 μ l) *	
dH ₂ O (○)	2.5 μ l	
Total	25 μ l	

*：検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。

(エリア 3 へ移動)

- (2) サンプル（鋳型）の添加（エリア 3 で実施）

陰性コントロール以外の各チューブについて、サンプルや *C. jejuni* (または *C. coli*) Positive Control 各 5 μ l を調製液に添加し、しっかりとふたをする。

【注意】 蛍光測定を行うため、チューブに汚れがつかないように注意する。ふたを閉めるときは手袋を着用する。

- (3) 0.2 ml チューブ用の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する。

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 // の場合】

- (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 >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。

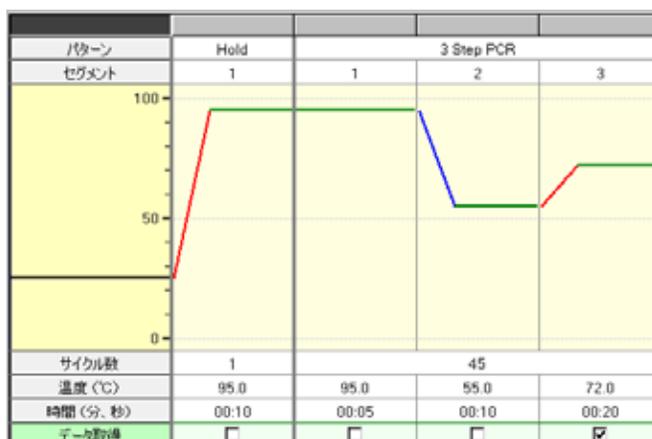
- (2) 反応条件設定画面では、デフォルトで検出フィルターは FAM と ROX の両方にチェックが入っており (これは変更できません)、PCR 条件は以下の条件になっていることを確認する (変更は可能ですが、このデフォルト値を使用します)。

初期変性 (Hold)

Cycle : 1
95°C 10 秒

3 step PCR

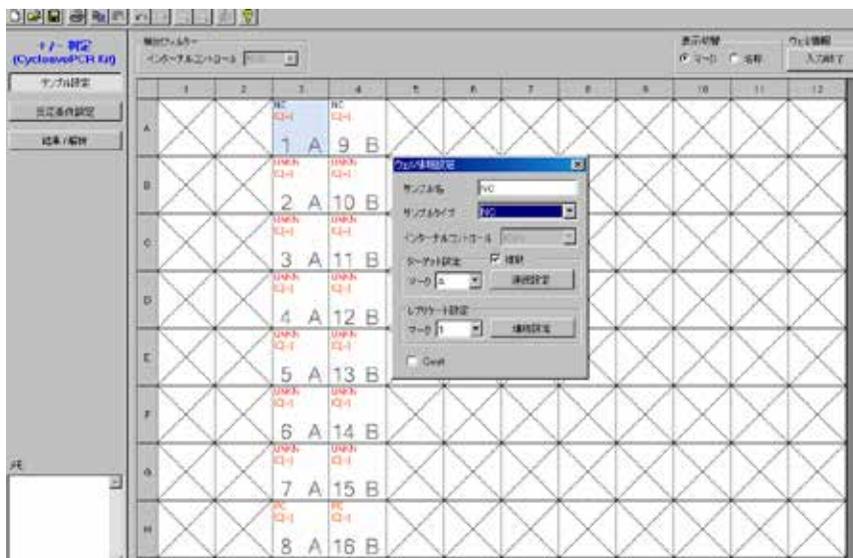
Cycle : 45
95°C 5 秒
55°C 10 秒
72°C 20 秒 (検出)



- (3) 画面右下の“Start Run” 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サンプル情報の設定を行う。6検体サンプル、陰性コントロール、陽性コントロール、各1連で行う場合の例を示す。



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)。反応に使用しないウェルはOmit設定する。

C. jejuni、*C. coli*の両方を同時に反応する場合は"複数"に☑を付けて、*C. jejuni*、*C. coli*の各検出系を区別するための設定を行う。

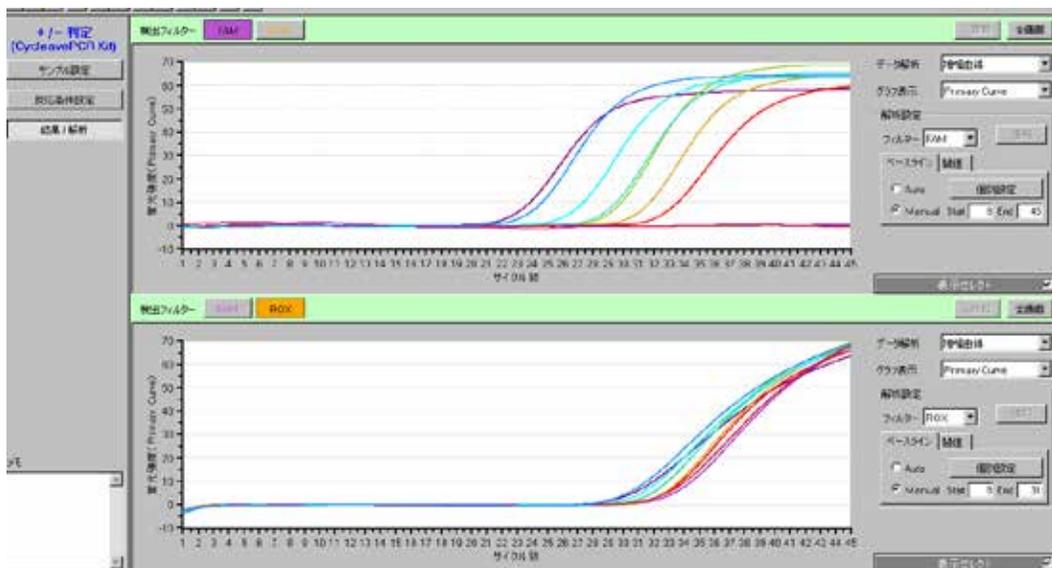
(例えば *C. jejuni* 検出系を Target Mark A、*C. coli* 検出系を Target Mark B として設定する。)

C. jejuni、*C. coli*のどちらかのみを検出反応を行う場合は☑は不要。

※判定の信頼性を高めるため、2連以上での反応を推奨します。

(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。

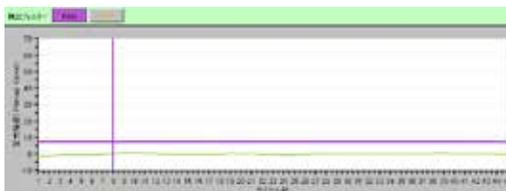


二画面の上部にターゲット検出のFAMフィルターでの増幅曲線が、下部にインターナルコントロール検出のROXフィルターでの増幅曲線が表示される。(通常閾値はAutoで解析を行いますが、*C. jejuni*、*C. coli*の結果を同時に選択すると閾値が表示されません。閾値を表示するには*C. jejuni*、*C. coli*検出系毎に確認します。)

2. NC および Positive Control での増幅曲線を確認する。

NC の FAM filter において蛍光シグナル変化の無いベースラインが得られ、閾値を超えていないことを確認する。超えている場合は、Manual にして数値を入力し、ベースラインが閾値を超えないように設定する。また、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。

NC : FAM
(ターゲット遺伝子)

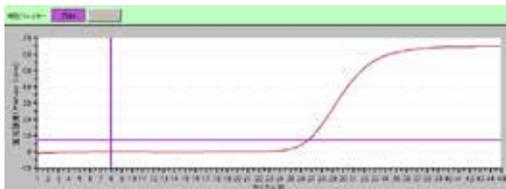


NC : ROX
(インターナルコントロール)



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

PC : FAM
(ターゲット遺伝子)



PC : ROX
(インターナルコントロール)



3. 表示セレクトで <U> を選択し、FAM フィルターにおいてベースラインや増幅曲線が正常に描かれていることを確認する。

(6) 結果の表示

データ解析<<判定結果>>にする。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			OK	OK								
B			Posi	Nega								
C			Nega	Nega								
D			Nega	Posi								
E			Nega	Posi								
F			Posi	Nega								
G			Nega	Nega								
H			OK	OK								

Negative Control << N >>陰性コントロール、Positive Control << P >>陽性コントロールの結果の表示

OK : コントロール反応が正常 (反応系が正しく進んだことを示す。)

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ことを示す。)

Unknown << U >> 検体サンプルの結果の表示

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 : インターナルコントロール、ターゲット遺伝子のどちらも検出せず、判定不能 (PCR 反応がうまく進まなかったことを示す。)

Error : 同一プレキケート内で判定が異なることを示す。

◆判定結果についての注意事項

- ・ 陰性コントロールの反応で、FAM フィルターにおいて増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られた場合 (判定結果では、OUT と表示される) :
 - コンタミネーションの疑いがあるため、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。
- ・ 陽性コントロール反応で、FAM フィルター、ROX フィルターの両方で、増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られなかった場合 (判定結果では、OUT と表示される) :
 - 何らかの原因で PCR、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。
- ・ 陽性コントロール反応の ROX フィルターではシグナルが確認されるが、FAM フィルターでシグナルが確認されなかった場合 (判定結果では、OUT と表示になる) :
 - Primer・Probe Mix に問題がある、または、陽性コントロールが分解している可能性がある。
- ・ 検体サンプルの反応で、FAM フィルター、ROX フィルターの両方で、増幅曲線、Primary Curve の設定で増幅曲線が得られなかった場合 (判定結果では、ND と表示される) :
 - 何らかの原因で PCR、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、サンプルを希釈して再反応を行う、または検体サンプルの再調製を行い、再反応を行う。
- ・ 検体サンプルの反応で、FAM フィルターで増幅曲線が確認されるが、ROX フィルターで確認されない場合 :
 - ターゲットの DNA 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 の増幅反応が競合抑制される場合がある。この場合、ターゲットは陽性であると判定できる。
 - 判定結果では Posi と表示される。

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

増幅反応は以下の手順で行う。

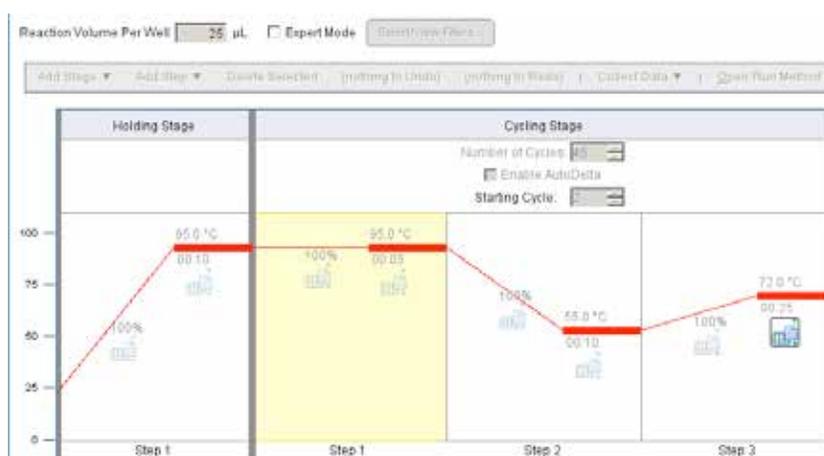
- (1) Advanced Setup で New Experiment を作成する。
- (2) Experiment Properties にて Quantification-Standard Curve を選択し、TaqMan Reagents または Other を選択する。(Other を選択した場合は Include Melt Curve の は外しておく。)
- (3) Plate Setup の Define Target にて Target Name を Jejuni、Reporter を FAM、Quencher を (none) にしたものを作成する。
- (4) Plate Setup の Define Target にて Target Name を Coli、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)、(4)、(5)、(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)

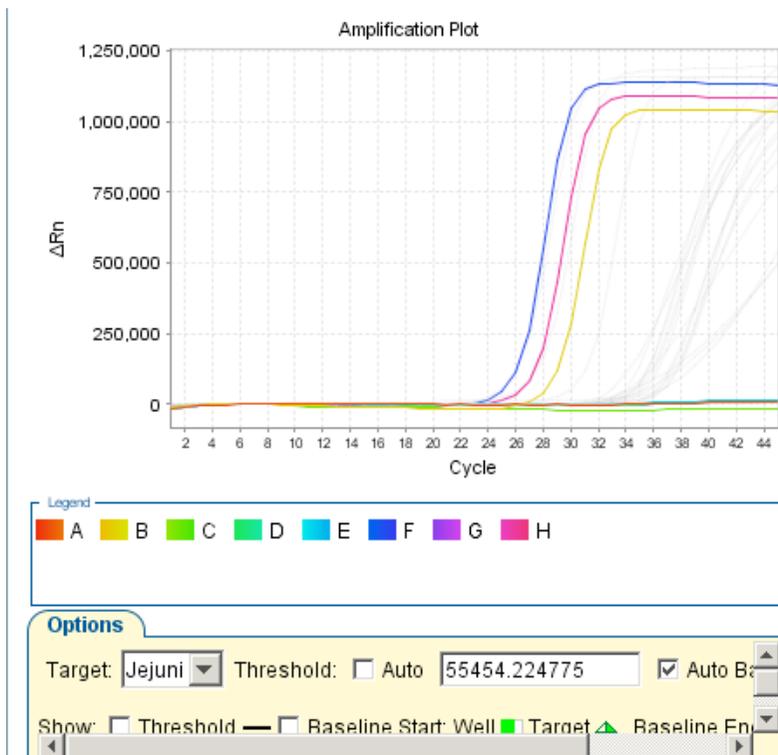
Cycle : 1
95°C 10 秒

3 step PCR

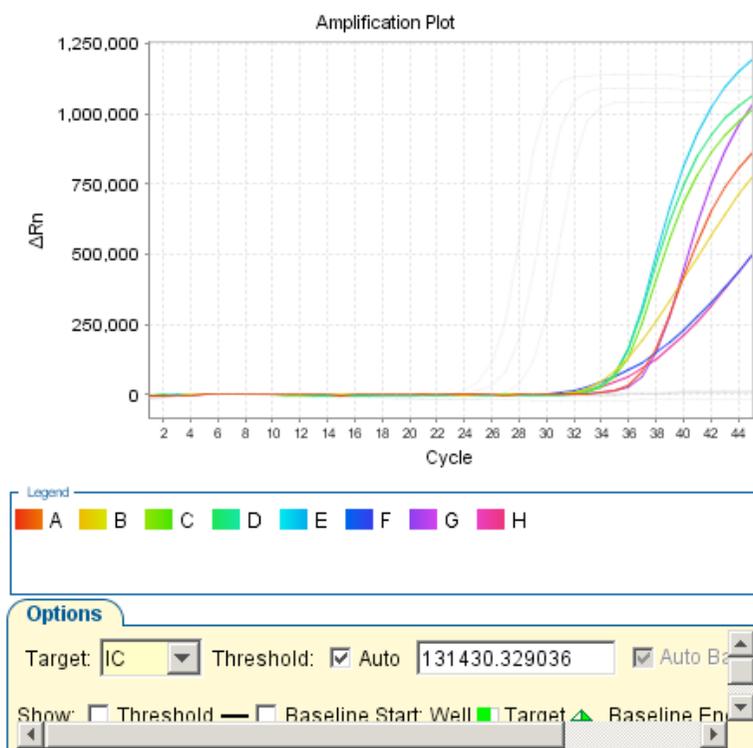
Cycle : 45
95°C 5 秒
55°C 10 秒
72°C 25 秒 (検出)



- (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。



Jejuni Target の検出 (FAM)



Jejuni IC (インターナルコントロール) 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	Sample N...	Target Na...	Task	Dyes	Ct
[-] NC						
1	A6	NC	IC	NTC	ROX-None	37.602
2	A6	NC	Jejuni	NTC	FAM-None	Undetermi...
3	A7	NC	Coli	NTC	FAM-None	Undetermi...
4	A7	NC	IC	NTC	ROX-None	37.889
[-] PC						
5	H6	PC	IC	UNKNOWN	ROX-None	38.126
6	H6	PC	Jejuni	UNKNOWN	FAM-None	26.620
7	H7	PC	Coli	UNKNOWN	FAM-None	25.218
8	H7	PC	IC	UNKNOWN	ROX-None	38.889
[-] Sample 1						
9	B6	Sample 1	IC	UNKNOWN	ROX-None	35.978
10	B6	Sample 1	Jejuni	UNKNOWN	FAM-None	28.308
11	B7	Sample 1	Coli	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...
12	B7	Sample 1	IC	UNKNOWN	ROX-None	37.358
[-] Sample 2						
13	C6	Sample 2	IC	UNKNOWN	ROX-None	35.931
14	C6	Sample 2	Jejuni	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...
15	C7	Sample 2	Coli	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...
16	C7	Sample 2	IC	UNKNOWN	ROX-None	36.110
[-] Sample 3						
17	D6	Sample 3	IC	UNKNOWN	ROX-None	35.677
18	D6	Sample 3	Jejuni	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...
19	D7	Sample 3	Coli	UNKNOWN	FAM-None	30.258
20	D7	Sample 3	IC	UNKNOWN	ROX-None	34.911

※ 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 (<i>C. jejuni</i> または <i>C. coli</i>)	増幅シグナル (+)	<i>cdtC</i> gene 陽性*1	<i>cdtC</i> gene 陽性*1
	増幅シグナル (-)	<i>cdtC</i> gene 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 (*C. jejuni* または *C. coli* 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 (<i>C. jejuni</i> または <i>C. coli</i>)	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*6

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 (<i>C. jejuni</i> または <i>C. coli</i>)	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*6

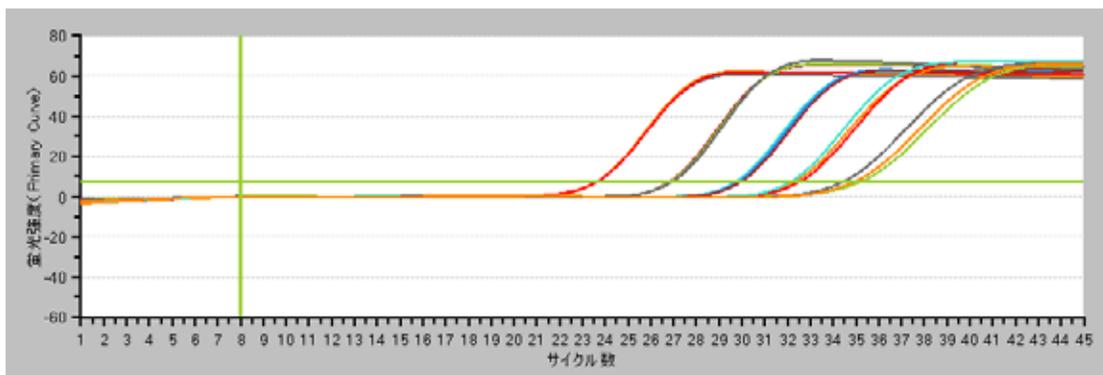
- * 1：インターナルコントロール DNA 検出結果の (+) / (-) に関わらず、*cdtC* gene が陽性である。陰性コントロール反応の結果から反応系にコンタミネーションがなかったことを確認すること。
- * 2：陽性コントロールの検出結果が (+) となる（反応系に問題がない）ことを確認すること。
- * 3：何らかの原因で PCR 反応またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、場合によっては検体の再調製が必要。
- * 4：ターゲット増幅用プライマーあるいはターゲット検出用プローブに問題があるか、陽性コントロールが分解している。
- * 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。
- * 6：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。

VIII. 参考データ

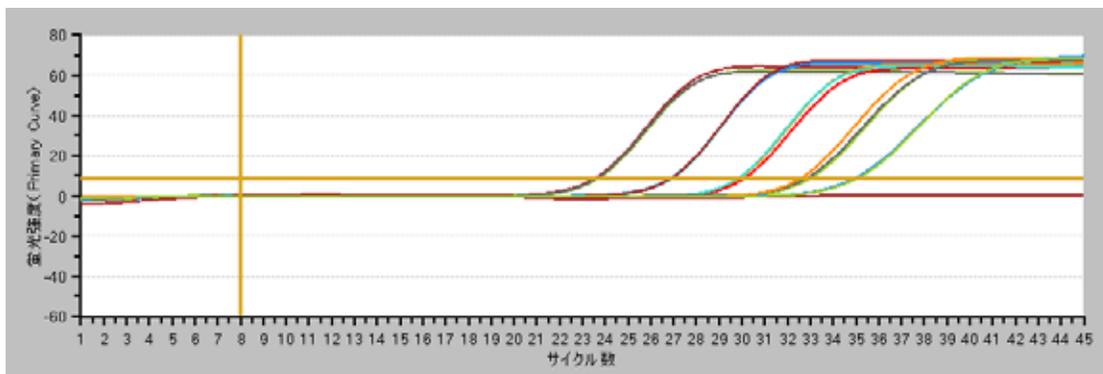
VIII-1. 検出感度の確認

コロニーカウント法により生菌数 (cfu : colony forming unit) を測定して調整した *C. jejuni* 81-176 株、*C. coli* Col-243 株の熱抽出サンプルを用いて検出限界を測定した。*C. jejuni*、*C. coli* とも、PCR チューブあたり 1 cfu の菌を特異的に検出できた。
($1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^4$ cfu/tube、N = 3 にて反応)

C. jejuni 検出系



C. coli 検出系



※ この結果は 1 cfu の検出感度を保証するものではありません。
検体の状態により検出感度は異なることがあります。

VIII-2. 由来の異なる *C. jejuni*、*C. coli* の検出例

由来の様々な *C. jejuni* 186 株、*C. coli* 65 株を用いて検出反応を行った結果、*C. jejuni* では 186 株中 185 株で陽性となり、検出率は約 99.5%であった。

また、*C. coli* では 65 株中 65 株で陽性となり、検出率は 100%であった。

C. jejuni で陰性となった 1 株は *cdt* 遺伝子変異株 5 株の内の 1 株のみであった。

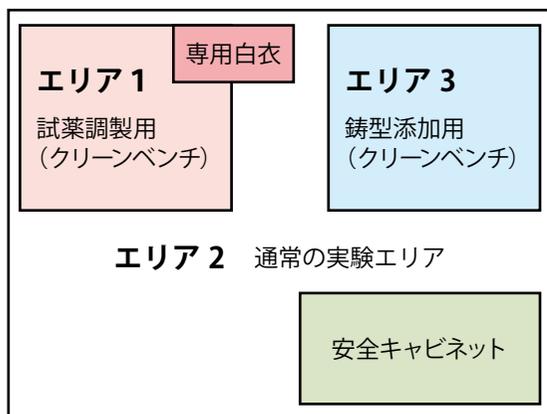
菌株名	菌株名、由来 (評価数)	検出数	
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
<i>C. jejuni</i>	ATCC33560 (1)	1	-
	ATCC43432 (1)	1	-
	81-176 株 (1)	1	-
	臨床検体分離株 (172)	172	-
	<i>cdt</i> 変異株 (5)	4	-
	動物由来分離株 (6)	6	-
合計	186	185	0
<i>C. coli</i>	ATCC33559 (1)	-	1
	ATCC43478 (1)	-	1
	臨床検体分離株 (27)	-	27
	<i>cdt</i> 変異株 (1)	-	1
	動物由来分離株 (23)	-	23
	食品由来分離株 (12)	-	12
合計	65	0	65

VIII-3. *C. jejuni*、*C. coli* 以外の細菌に対する特異性の確認

C. jejuni、*C. coli* 以外のカンピロバクター属細菌および代表的な病原細菌、81 株を用いて特異性を調べた結果、他のカンピロバクター属細菌を始め、他の菌では全て陰性となり、高い特異性を示した。

菌株名	菌株名、由来 (評価数)	検出結果	
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
<i>C. fetus</i>	ATCC27374 (1)	—	—
	ATCC19438 (1)	—	—
	臨床検体または動物由来の分離株 (11)	—	—
<i>C. lari</i>	ATCC43675 (1)	—	—
<i>C. upsaliensis</i>	ATCC43954 (1)	—	—
<i>C. hyointestinalis</i>	ATCC35217 (1)	—	—
<i>C. helveticus</i>	ATCC51209 (1)	—	—
<i>C. consisus</i>	ATCC33237 (1)	—	—
<i>Arcobacter butzleri</i>	食品由来分離株 (4)	—	—
<i>Helicobacter hepaticus</i>	ATCC51449 (1)	—	—
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	臨床検体分離株 (1)	—	—
<i>Vibrio parahaemoliticus</i>	エビ由来分離株 (17)	—	—
<i>V. cholerae</i> (O1)	臨床検体分離株 (4)	—	—
<i>V. cholerae</i> (O139)	臨床検体分離株 (3)	—	—
<i>V. cholerae</i> (NAG)	臨床検体分離株 (3)	—	—
<i>V. harveyi</i>	エビ由来分離株 (1)	—	—
<i>Shigella dysenteriae</i>	臨床検体分離株 (5)	—	—
<i>S. flexineli</i>	臨床検体分離株 (3)	—	—
<i>S. boydi</i>	臨床検体分離株 (1)	—	—
<i>S. sonnei</i>	臨床検体分離株 (2)	—	—
<i>Escherichia coli</i> (cdt positive)	臨床検体分離株 (7)	—	—
<i>Salmonella</i> spp.	臨床検体分離株 (5)	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	臨床検体分離株 (1)	—	—
<i>Proteus</i> spp.	臨床検体分離株 (1)	—	—
<i>Aeromonas</i> spp.	臨床検体分離株 (3)	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	臨床検体分離株 (1)	—	—
合計	81	0	0

IX. 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。

X. 参考文献

- 1) Worada Samosornsuk. *et al. Microbiol Immunol.* (2007) **51**(9): 909-917.
- 2) Asakura M. *et al. Microb Pathog.* (2007) **42**: 174-183.

XI. 関連製品

Campylobacter (cdt gene) PCR Detection and Typing Kit (製品コード RR134A)
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™ *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0 (製品コード CY205)
CycleavePCR™ *Vibrio (tdh gene)* Detection Kit (製品コード CY220)
CycleavePCR™ *Bacillus cereus* (CRS gene) Detection Kit (製品コード CY221)
CycleavePCR™ *Listeria monocytogenes (inlA gene)* Detection Kit (製品コード CY223)

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)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
96 well Hi-Plate for Real Time (製品コード NJ400)
Sealing Film for Real Time (製品コード NJ500)
48 well snap plate (製品コード NJ700)
Flat cap for snap plate (製品コード NJ720)
Plate Sealing Pads (製品コード 9090)
NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)

XII. 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。
- 本製品は、扶桑薬品工業株式会社及び公立大学法人大阪府立大学よりライセンスを受け、タカラバイオ株式会社が製造販売しています。
- 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