

製品コード RC111A

食品・環境分析用

Takara

ETEC (LT/STp/STh) qPCR Typing Kit (with ROX Reference Dye)

説明書

v202009Da

本製品はリアルタイム PCR により、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の LT 遺伝子、STp 遺伝子、STh 遺伝子をタイピングするためのキットです。蛍光標識プローブにより二波長を同時にモニタリングすることで、各遺伝子を 2 本のチューブでタイピングすることが可能です。また、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。

【検出対象遺伝子】

Primer/Probe Mix (LT/STh) 使用の場合

検出対象菌種	検出対象遺伝子	プローブ標識
ETEC	LT	HEX / Dark Quencher
	STh	FAM / Dark Quencher

Primer/Probe Mix (STp/IC) 使用の場合

検出対象菌種	検出対象遺伝子	プローブ標識
ETEC	STp	FAM / Dark Quencher
(PCR 阻害の有無の確認)	インターナルコントロール (IC)	HEX / Dark Quencher

I. 内容 (各 25 回分)

PCR 反応試薬

● 1. Probe qPCR Mix* ¹	2 ×	625 μl
● 2. Primer/Probe Mix (LT/STh) -2* ²	5 ×	125 μl
● 3. Primer/Probe Mix (STp/IC) -2* ²	5 ×	125 μl
○ _{H₂O} 4. H ₂ O		1 ml
● 5. ROX Reference Dye* ²	50 ×	30 μl
● 6. ROX Reference Dye II* ²	50 ×	30 μl

陽性コントロール

● 7. ETEC Positive Control Mix* ³		100 μl
--	--	--------

アルカリ熱抽出用試薬

● 8. NaOH Solution	50 mM	1.5 ml × 2
○ 9. Tris-HCl Buffer pH7.0	1 M	500 μl

* 1 : 反応に必要な dNTP Mixture、Mg²⁺、酵素等を含みます。

* 2 : 遮光に留意してください。

* 3 : 他の試薬へのコンタミネーションに留意してください。

II. 保存

− 20°C

III. 本製品以外に必要な器具、機器（主なもの）

【器具】

- ・ 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（アルカリ熱抽出に使用）
- ・ リアルタイム PCR 装置
Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 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：本キットは食品・環境分析用の製品です。
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 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 を使用する際には、泡立てないように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。必ず均一に混合してからご使用ください。
2. 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。
3. 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。
4. 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、増幅産物が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。
5. 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

VI-1. サンプルの調製（エリア 2 で実施）

食品培養液からの毒素原性大腸菌の 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 を 85 μ l 添加し、100°C で 10 分間加熱処理する。
 - ← ○ 1 M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μ l 加えて中和する。
 - ← 2,000 ~ 10,000 \times g で 10 分間遠心する。

上清を検体とする。

リアルタイム PCR 反応の鋳型として 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お使いください。

VI-2. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

1. 以下の反応液を調製する（エリア 1 で実施）

必要数+ α 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 20 μ 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 反応あたり >

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix	12.5 μ l
● Primer/Probe Mix (LT/STh) -2	5 μ l
● ROX Reference Dye or ● Dye II*	0.5 μ l
⊕ H ₂ O	2.0 μ l
Total	20 μ l

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix	12.5 μ l
● Primer/Probe Mix (STp/IC) -2	5 μ l
● ROX Reference Dye or ● Dye II*	0.5 μ l
⊕ H ₂ O	2.0 μ l
Total	20 μ l

* : Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System では、● ROX Reference Dye II を使用します。
StepOnePlus Real-Time PCR System では、● ROX Reference Dye を使用します。

2. サンプル（鋳型）を添加する（エリア 3 で実施）

1. で分注した反応液に以下のサンプル（鋳型）5 μ l を添加し、しっかりふたをする。

陰性コントロール	⊕ H ₂ O
陽性コントロール	● ETEC Positive Control Mix
サンプル	アルカリ熱抽出液の溶液

反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心し、リアルタイム PCR 装置にセットする。

3. 以下の条件で反応を実施する

[Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System の場合]

< Hold >

95°C 30 秒

< PCR: 45 サイクル >

95°C 5 秒

60°C 30 秒（蛍光検出：FAM, HEX(VIC), ROX）

* : Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合は、モードは Standard mode を選択してください。

VI-3. 判定

【検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター】

Primer/Probe Mix (LT/STh) 使用の場合

検出対象菌種	検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
ETEC	LT	HEX (VIC)
	STh	FAM

Primer/Probe Mix (STp/IC) 使用の場合

検出対象菌種	検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
ETEC	STp	FAM
(PCR 阻害の有無の確認)	インターナルコントロール (IC)	HEX (VIC)

【コントロール反応の確認】

	PCR の鑄型	LT	STh	STp	IC
陽性コントロール	ETEC Positive Control Mix	+	+	+	+/-
陰性コントロール	H ₂ O	-	-	-	+

- ・ 陽性コントロールで LT、STh、STp 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 LT、STh、STp 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>

LT	STh	STp	IC	判定
+	-	-	+/-	LT 遺伝子陽性
-	+	-	+/-	STh 遺伝子陽性
-	-	+	+/-	STp 遺伝子陽性

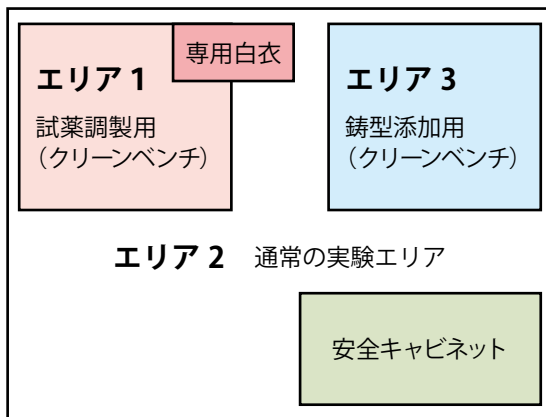
- ・ LT、STh、STp 遺伝子が検出された場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

<陰性判定の例>

LT	STh	STp	IC	判定
-	-	-	+	検出限界以下
-	-	-	-	判定不能

- ・ LT、STh、STp 遺伝子がいずれも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

ETEC (LT/STp/STh) qPCR Screening Kit (with ROX Reference Dye) (製品コード RC110A)
CycleavePCR™ O-157(VT gene) Screening Kit Ver.2.0 (製品コード CY217A/B)
毒素原性大腸菌 (STp gene) One Shot PCR Kit (製品コード RR108A)

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。
- ・ 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