

検便検査用

TaKaRa

**TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット
(4 波長)**

説明書

2022年7月6日に Lysis Buffer for stool test の保存について、注意事項を追記いたしました。
詳細は II. 保存の章をご確認ください。製品の性能や操作方法には変更はございませんので、これまで通りご使用いただけます。

本製品はプローブを用いるリアルタイム PCR により、検便検体から腸管出血性大腸菌 (EHEC)、サルモネラ属菌、赤痢菌の遺伝子を検出するキットです。検出対象遺伝子は、VT 遺伝子 (EHEC)、*invA* 遺伝子 (サルモネラ属菌)、*ipaH* 遺伝子 (赤痢菌) で、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】

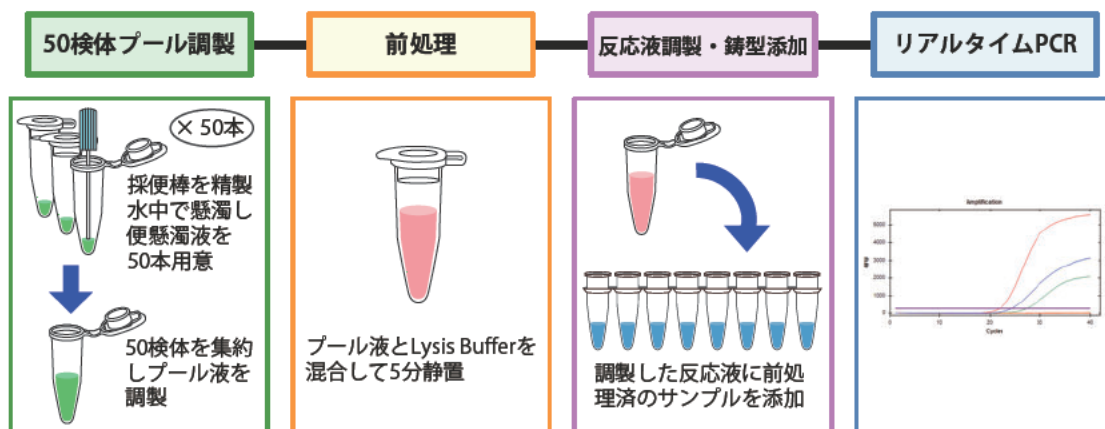
検出対象菌種	検出対象遺伝子	プローブ標識
EHEC	VT1/2 遺伝子 (<i>stx1a</i> , <i>1c</i> , <i>1d</i> , <i>stx2a</i> , <i>2b</i> , <i>2c</i> , <i>2d</i> , <i>2e</i> , <i>2g</i>) *1	Cyanine5 / Dark Quencher
サルモネラ属菌	<i>invA</i> 遺伝子	ROX / Dark Quencher
赤痢菌	<i>ipaH</i> 遺伝子*2	FAM / Dark Quencher
(PCR 阻害の有無の確認)	インターナルコントロール	HEX / Dark Quencher

* 1 : *J Clin Microbiol.* 2012 Sep; **50**(9): 2951-2963. で報告された配列のうち、*stx2f* を除く配列を網羅できるよう設計されています。

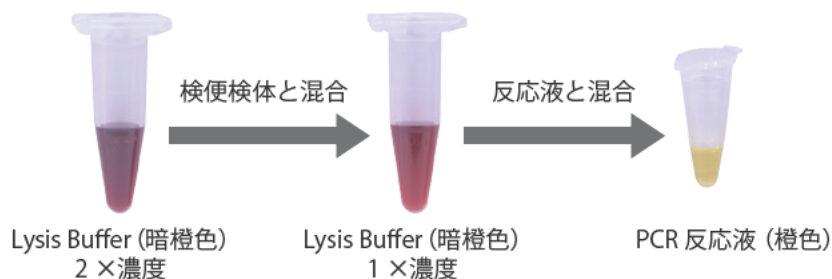
* 2 : *ipaH* 遺伝子を保有する腸管侵入性大腸菌 (EIEC) を検出する場合があります。

【特長】

- EHEC、サルモネラ属菌、赤痢菌の 3 菌種をマルチプレックス PCR により 1 反応で検出します。
- プローブによる検出法を採用しており、3 菌種を明確に区別し、それぞれを異なる蛍光で検出可能です。
- 前処理は付属の Lysis Buffer と検便検体を混合し 5 分間静置で完了します。



- 検便検体は、Lysis Buffer と混合することで着色されるため、反応液への鑄型添加の有無を視覚的に確認でき、作業ミスの防止に役立ちます。



- ウラシル-N- グリコシラーゼ (UNG) を反応系に添加しており、PCR 増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。

I. 内容 (200 回分)

TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出 qPCR 試薬 (4 波長) (製品コード RC141A)

● Probe qPCR Mix-UNG 2* ¹	2 ×	1 ml × 3
● Primer/Probe Mix 3 (VT/ipaH/invA)* ²	5 ×	600 μl × 2
○ H ₂ O		1 ml × 2
● Positive Control Mix 2* ³		75 μl

Lysis Buffer for stool test (製品コード 9187)*⁴

Lysis Buffer for stool test	2 ×	90 ml
-----------------------------	-----	-------

* 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。

* 4：大容量品 (Lysis Buffer for stool test (製品コード 9188)) も使用可能です。

※それぞれの構成商品は単品でも販売しています。

II. 保存 - 20℃

※ Lysis Buffer for stool test は、4℃での保存でも問題ありません。4℃保存の場合は遮光して保存し、6ヵ月以内に使用してください。

※ Lysis Buffer for stool test は、保存条件 (小分け分注状態での保存など) により、暗橙色から黄色または橙色に変色する場合があります。

保存中に黄色または橙色に変色した試薬は、溶解性能が低下している可能性があるため使用しないでください。

III. 使用上の注意

Lysis Buffer for stool test (製品コード 9187/9188) は皮膚に接触するとただれ等を起こすことがあります。手袋および防護眼鏡の着用をお勧めします。

万が一、手や粘膜についた場合はただちに大量の水で洗い流し、異常が残る場合は医師の指示に従ってください。目に入った時は、こすらずただちに流水で15分以上洗い流し、必ず眼科医を受診してください。

IV. 本製品以外に必要な器具、機器 (主なもの)

【器具】

- ・ 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)

【機器】

- ・ リアルタイム PCR 装置
 - Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (製品コード TP1010)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD 社)
 - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - QuantStudio5 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific 社)
 - LightCycler 96 システム (Roche Diagnostics 社)
 - Rotor-Gene Q (QIAGEN 社) 等

注：本製品は以下のリアルタイム PCR 装置には対応していません。

Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)

Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

V. 使用に際して

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。

1. 使用目的： 本製品は検便検査に使用する製品です。
2. 測定結果： 本製品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 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。本製品を用いた遺伝子検出法と培養法との相関性および夾雑物の影響につきましては、使用施設において十分に検証試験を実施してください。（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。）
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。

VI. 操作上の注意

1. Probe qPCR Mix-UNG 2 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、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
2. Probe qPCR Mix-UNG 2 以外の各試薬は、溶解後よく混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
3. Primer/Probe Mix 3 (VT/ipaH/invA) は、遮光に留意してください。
4. 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。
5. 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着脱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。
6. 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。

本製品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。

7. 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。

VII. 操作

1. 便検体懸濁液 (50 検体プール) の調製 (エリア 2 で実施)

検便は 50 検体を 1 つのバッチとし、下記のいずれかの方法で 50 検体を混合した便検体懸濁液を調製する。

<プロトコール A >

- 1) 1.5 ml チューブ 50 本に、精製水を 50 μ l ずつ分注する。
- 2) 採便棒を精製水中で懸濁する (1 検体 / 1 チューブ、各 5 ~ 10% 懸濁液)。
- 3) 各懸濁液を 10 μ l ずつ 50 本分プールする (合計 500 μ l)。

<プロトコール B >

- 1) 10 ~ 15 ml 容量のチューブ (高さ 5 cm 程度のチューブ) に精製水*1 を 2.5 ml 入れる。
- 2) 精製水に 1 検体ずつ竹串で掻き採った便を懸濁する。
- 3) 同様に、1 つのチューブに 50 検体分の懸濁を繰り返す (5 ~ 10% 懸濁液)。

* 1 : 精製水の代わりに、精製水で 1 × 濃度に希釈した Lysis Buffer for stool test を使用することも可能です。
その場合、「2. 前処理」の 1) の操作は不要です。

※ 上記に記載されたプロトコールに沿ってご利用ください。

2. 前処理 (エリア 2 で実施)

- 1) 便検体懸濁液 (50 検体プール) と Lysis Buffer for stool test を混合する。
便検体懸濁液と Lysis Buffer for stool test を 1 : 1 の割合で混合する。

[混合例]

便検体懸濁液	500 μ l
Lysis Buffer for stool test	500 μ l

- 2) よく混合し、室温で 5 分間静置する。

※ 静置時間は 5 分間より長くなっても問題ありません。前処理の翌日までは PCR 結果への影響がないことを確認済です。

3. リアルタイム PCR 反応

【コントロール反応について】

結果の判定を正しく行うため、以下のコントロール反応を同時に行ってください。

陰性コントロール： PCR 反応の際に、本製品の ○ H₂O と Lysis Buffer for stool test を等量混合したものを鋳型とします。

陽性コントロール： PCR 反応の際に、本製品の ● Positive Control Mix 2 と Lysis Buffer for stool test を等量混合したものを鋳型とします。

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 25 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 反応分の混合液]	使用量
● Probe qPCR Mix-UNG 2	15 μ l
● Primer/Probe Mix 3 (VT/ipaH/invA)	6 μ l
○ H ₂ O	4 μ l
Total	25 μ l

※ 反応液の調製は (氷上ではなく) 室温で行ってください。

※ 調製済の反応液を保存する際には、4℃ 保存 (48 時間まで) をお勧めします。

2) 前処理済のサンプル (または陽性コントロールまたは陰性コントロール) を 5 μ l 添加する。(エリア 3 で実施)

※ 本操作は室温で行ってください。

※ PCR 反応液量は 30 μ l になります。

3) 以下の条件で反応を実施する。

◆ Thermal Cycler Dice Real Time System IV の場合

< Hold >

(25℃ 10 分) *2

95℃ 30 秒

< PCR : 5 サイクル >

95℃ 5 秒

60℃ 20 秒

< PCR : 40 サイクル >

95℃ 1 秒

60℃ 24 秒 (蛍光検出 : FAM/HEX/ROX/Cy5)

* 2 : PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、25℃ 10 分のステップを実施してください。UNG の作用により PCR 産物が分解されます。

※ Thermal Cycler Dice Real Time System IV では、Speed は Fast を選択し、解析する際に正規化補正を OFF にしてください。正規化補正の設定変更方法は、弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

◆ CFX96 Deep Well Real-Time PCR Detection System の場合

< Hold >

(25°C 10分)*2

95°C 30秒

< PCR : 5 サイクル >

95°C 5秒

60°C 20秒

< PCR : 40 サイクル >

95°C 1秒

60°C 20秒 (蛍光検出 : FAM/HEX/ROX/Cy5)

◆ LightCycler 96 システムの場合

< Hold >

(25°C 10分)*2

95°C 30秒

< PCR : 5 サイクル >

95°C 5秒

60°C 20秒

< PCR : 40 サイクル >

92°C 1秒

60°C 20秒 (蛍光検出 : FAM/HEX/Red610/Cy5)

◆ Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合

注 : モードは Fast mode を選択し、Expert Mode で Filter-1, 2, 4, 5 を選択してください。

< Hold >

(25°C 10分)*2

95°C 30秒

< PCR : 5 サイクル >

95°C 5秒

60°C 20秒

< PCR : 40 サイクル >

95°C 1秒

60°C 20秒 (蛍光検出 : FAM/VIC/ROX/Cy5)

◆ QuantStudio5 リアルタイム PCR システムの場合

注 : モードは Fast mode を選択してください。

< Hold >

(25°C 10分)*2

95°C 30秒

< PCR : 5 サイクル >

95°C 5秒

60°C 20秒

< PCR : 40 サイクル >

95°C 1秒

60°C 20秒 (蛍光検出 : FAM/VIC/ROX/Cy5)

* 2 : PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、25°C 10分のステップを実施してください。UNG の作用により PCR 産物が分解されます。

◆ Rotor Gene Q の場合

< Hold >

(25°C 10分)*2

95°C 30秒

< PCR：5 サイクル >

95°C 5秒

60°C 20秒

< PCR：40 サイクル >

92°C 1秒

60°C 20秒 (蛍光検出：Green/Yellow/Orange/Red)

* 2：PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、25°C 10分のステップを実施してください。UNG の作用により PCR 産物が分解されます。

4. 判定

【検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター】

検出対象菌種	検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
EHEC	VT1/2 遺伝子	Cy5
サルモネラ属菌	<i>invA</i> 遺伝子	ROX (Red610)
赤痢菌	<i>ipaH</i> 遺伝子	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	IC	VT	<i>invA</i>	<i>ipaH</i>
陽性コントロール	Positive Control Mix 2	+/-	+	+	+
陰性コントロール	H ₂ O	+	-	-	-

- ・陽性コントロールで VT、*invA*、*ipaH* 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 VT、*invA*、*ipaH* 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>

IC	VT	<i>invA</i>	<i>ipaH</i>	判定
+/-	+	-	-	EHEC 陽性
+/-	-	+	-	サルモネラ属菌陽性
+/-	-	-	+	赤痢菌陽性

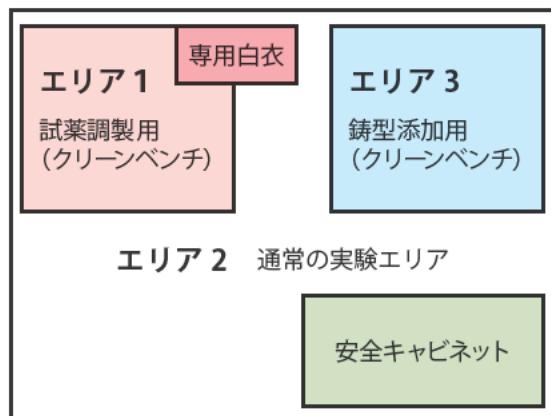
- ・VT、*invA*、*ipaH* 遺伝子が検出された場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

<陰性検体の例>

IC	VT	<i>invA</i>	<i>ipaH</i>	判定
+	-	-	-	検出限界以下
-	-	-	-	判定不能

- ・VT、*invA*、*ipaH* 遺伝子が共に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。

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
検体の取扱いや前処理を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア3：高濃度鋳型を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型の添加を行う。

IX. 関連製品

TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット (4 波長) 1 液タイプ (製品コード RC150A)
TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット (3 波長) (製品コード RC144A)
TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット Ver.4 (製品コード RR177A)
Lysis Buffer for stool test (製品コード 9188)
Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (製品コード TP1010)

X. 注意

- ・ 本製品は検便検査用試薬です。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。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