

製品コード RC148A

検便検査用

TaKaRa

TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子 検出キット Ver.5

説明書

v202603w

本製品は、検便検体から PCR により、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に、インターナルコントロール反応も同時に行います。リアルタイム PCR 装置を使用して PCR 増幅後、融解曲線分析を行うことで検出された遺伝子を判定します。

特長

- 高速 PCR 試薬の採用により、約 1 時間で結果が得られます。
- 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。
- PCR 増幅産物は TB Green® を用いた融解曲線分析で検出します。Tm 値の違いにより増幅した菌種を推定します。
- 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 増幅産物のキャリアオーバーによる偽陽性を防止できます。

【検出対象遺伝子】

検出対象菌種	検出対象遺伝子	Tm 値*3
EHEC	VT (stx1a, 1c, 1d, stx2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g) *1	82.1°C
サルモネラ属菌	<i>invA</i> 遺伝子	79.4°C
赤痢菌	<i>ipaH</i> 遺伝子*2	84.9°C
(PCR 阻害の有無の確認)	インターナルコントロール	73.5°C

* 1 : *J Clin Microbiol.* 2012 Sep; 50(9): 2951-2963. で報告された配列の内、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。赤痢菌以外の細菌が保有する *ipaH* 遺伝子に類似した配列を検出する場合があります。

* 3 : Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950) で測定した場合の参考値です。リアルタイム PCR 装置の機種や PCR 産物の増幅量等により、Tm 値が前後する場合があります。

I. 内容 (200 回分)

● Reaction Mix Fast (UNG) 2*1	2 ×	1 ml × 3
● 100X TB Green 2*2		60 μl
● Primer Mix 6 (VT/ipaH/invA)	5 ×	600 μl × 2
● H ₂ O		1 ml × 2
● VT Positive Control 3*3		50 μl
● ipaH Positive Control 4*3		50 μl
● invA Positive Control 3*3		50 μl

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

* 2 : 遮光にご留意ください。

* 3 : 他の試薬へのコンタミネーションにご留意ください。

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
- ・ ヒートブロック等（95℃ 5分の熱処理に使用）
- ・ リアルタイム PCR 装置
 - Thermal Cycler Dice Real Time System IV with PC（製品コード TP1010）
 - Thermal Cycler Dice Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980/TP990）
 - Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760：終売）
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System（BIO-RAD 社）
 - Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）
 - LightCycler 96/480 System（Roche Diagnostics 社） 等

IV. 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 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。

V. 操作上の注意

1. Reaction Mix Fast (UNG) 2 を使用する際には、泡立てないよう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. Reaction Mix Fast (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. 100X TB Green 2 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（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。
- 本製品では増幅反応後に融解曲線分析で検出を行うため、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。
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。
 8. 本製品はリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行うのが便利です。リアルタイム PCR 装置の補正機能などが適正に作動しない場合、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、Manual 設定を行ってください。

VI. 操作

1. 便検体懸濁液 (50 検体プール) の調製

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) に精製水を 2.5 ml 入れる。
- 2) 1 検体ずつ竹串で掻き採った便を精製水に懸濁する。
- 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)。

※ 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) プールした便検体懸濁液 (5 ~ 10%) を 1.5 ml チューブに 100 μ l 分取する。
※ 95°C 5 分の熱処理が可能であれば、他の容器・容量でも問題ありません。
- 2) 95°C 5 分の熱処理を行う。
- 3) 8,000 ~ 15,000 rpm で 5 分間遠心する。

遠心後、上清を PCR の鋳型として使用する (3. PCR 増幅のステップ 2)。

[注意] 前処理後のサンプルは保存できません。

3. PCR 増幅

【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 を鋳型とした反応を「陰性コントロール」として実施します。

陽性コントロール：PCR 反応の際に、本製品の VT Positive Control 3、ipaH Positive Control 4、invA Positive Control 3 を鋳型とした 3 反応を「陽性コントロール」として実施します。

- 1) 以下の反応液を氷上で調製する。(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 27.5 μ l ずつ分注する。必要本数は、サンプル数 + 4 本 (陽性コントロールとして 3 種類、陰性コントロールとして H₂O を加えたもの) と設定する。

[1 反応分の反応液]

● Reaction Mix Fast (UNG) 2	15.0 μ l
● 100X TB Green 2	0.3 μ l
● Primer Mix 6 (VT/ipaH/invA)	6.0 μ l
⊕ H ₂ O	6.2 μ l
Total	27.5 μ l

- 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 2.5 μ l 添加する。(エリア 3 で実施)

3) 以下の条件で反応を実施する。

[注意] 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 の場合

※ Speed は Fast で設定

< Hold >
(25℃ 10分)
94℃ 30秒
< PCR: 45 サイクル >
90℃ 1秒
63℃ 30秒 (蛍光検出: FAM)
< 融解曲線分析: 68 ~ 90℃ >

◆ Thermal Cycler Dice Real Time System III / Lite の場合

※ いずれも Speed は Fast で設定

< Hold >
(25℃ 10分)
94℃ 30秒
< PCR: 45 サイクル >
90℃ 1秒
63℃ 10秒 (蛍光検出: FAM)
< 融解曲線分析: 68 ~ 90℃ >

◆ CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System および Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System の場合

< Hold >
(25℃ 10分)
94℃ 30秒
< PCR: 45 サイクル >
94℃ 1秒
63℃ 10秒 (蛍光検出: FAM)
< 融解曲線分析: 65 ~ 95℃ >

◆ LightCycler 96 System の場合

< Hold >
(25℃ 10分)
94℃ 30秒
< PCR: 45 サイクル >
90℃ 1秒
63℃ 10秒 (蛍光検出: FAM)
< 融解曲線分析: 68 ~ 90℃ >

◆ LightCycler 480 System の場合

< Hold >
(25℃ 10分)
94℃ 30秒
< PCR: 45 サイクル >
90℃ 1秒 (Ramp Rate: 2.2℃/s)
63℃ 5秒 (Ramp Rate: 2.2℃/s) (蛍光検出: FAM)
< 融解曲線分析: 68 ~ 90℃ >

4. 判定

融解曲線分析で得られた Tm 値より判定を行います。融解曲線分析で求められる検出対象遺伝子の Tm 値は、リアルタイム PCR の機種等によって変動する可能性がありますので、同時に反応を行った陽性コントロールの Tm 値と比較して未知サンプルの判定を行ってください。

【検出対象遺伝子と Tm 値】

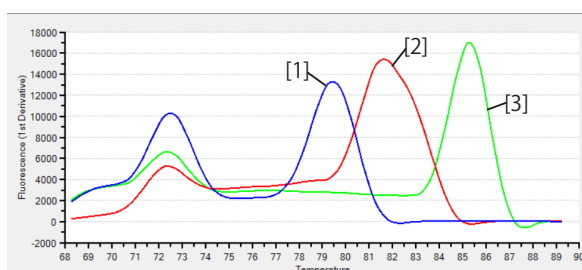
検出対象菌種	検出対象遺伝子	Tm 値*1
EHEC	VT*2 (stx1a, 1c, 1d, stx2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g)	82.1℃
サルモネラ属菌	<i>invA</i> 遺伝子	79.4℃
赤痢菌	<i>ipaH</i> 遺伝子	84.9℃
(PCR 阻害の有無の確認)	インターナルコントロール	73.5℃

* 1 : Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950) で測定した場合の参考値です。リアルタイム PCR 装置の機種や PCR 産物の増幅量等により、Tm 値が前後する場合があります。

* 2 : VT 遺伝子検出では stx1 と stx2 の Tm 値に差があるため、融解曲線がブロードな形状になる場合があります。下記の陽性コントロールの反応例もご参照ください。

【コントロール反応の確認】

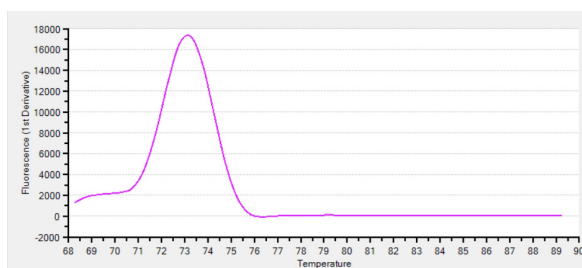
<陽性コントロールの反応例：融解曲線分析>



[1] (青) : *invA* Positive Control 3
[2] (赤) : VT Positive Control 3
[3] (緑) : *ipaH* Positive Control 4

- 78 ~ 86℃の範囲に各検出対象遺伝子の明確なピークがあることを確認します。
- 73.5℃付近のピークは、インターナルコントロールの増幅産物です。
- VT (赤) の融解曲線が若干ブロードな形状になる場合があります。

<陰性コントロールの反応例：融解曲線分析>



- 73.5℃付近にインターナルコントロールのピークがあることを確認します。
- 78 ~ 86℃の範囲にピークがないことを確認します。

<正しい反応結果とトラブルシューティング>

	PCRの鑄型	IC	VT	invA	ipaH
陽性コントロール	VT Positive Control 3	+/-	+	-	-
	invA Positive Control 3	+/-	-	+	-
	ipaH Positive Control 4	+/-	-	-	+
陰性コントロール	H ₂ O	+	-	-	-

- ・陽性コントロールで目的の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	invA	ipaH	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。

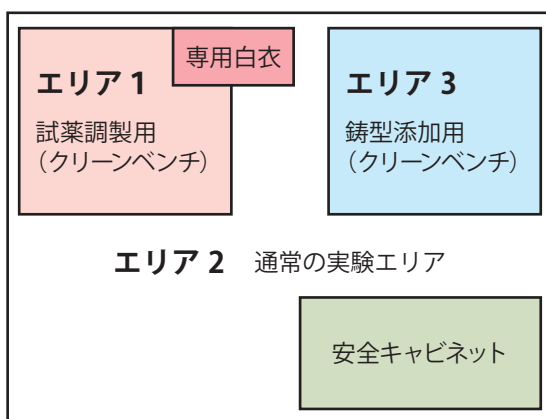
<陰性判定の例>

IC	VT	invA	ipaH	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。

※ 増幅配列内に変異が存在する場合、サンプルのT_m値と陽性コントロールのT_m値との間に少し差が生じることがあります。

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。
(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：高濃度鑄型を扱うエリア
分注済みの反応液への鑄型の添加を行う。

VIII. 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）1 液タイプ（製品コード RC154A）

Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC（製品コード TP1010）

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

IX. 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。
- ・ TB Green、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