

製品コード RC165A

研究用

TAKARA

**Endogenous Control qPCR Kit
for stool**

説明書

v202311Da

本製品は、ヒト腸内で優勢な菌種を対象としてリアルタイム PCR 法により検出するキットであり、ヒト糞便検体用の内在性コントロール (Endogenous Control: EC) として使用できます。

内在性コントロールは、検体中に存在する遺伝子を利用したコントロールであり、PCR 検査においては、PCR 反応液への検体の添加の有無を客観的に判別するために用いられます。

本製品では、ヒト糞便検体用の内在性コントロールとして、ヒト腸内で優勢な菌種である *Bacteroides* 属の 16S rRNA 領域を検出対象に採用しました。検体によらず安定した結果が得られ、環境細菌由来の非特異的増幅が生じにくいよう設計されています。

【特長】

- ・ 内在性コントロールの検出対象として、ヒト腸管内で優勢な *Bacteroides* 属の 16S rRNA 領域を採用しています。
- ・ 対象病原体のリアルタイム PCR 反応と並行して本系による反応を実施することで、核酸抽出からリアルタイム PCR までの操作が適切に行われたかを確認することができます。
- ・ リアルタイム PCR の所要時間は約 50 分で、迅速に結果が得られます。
- ・ Uracil-N-glycosylase (UNG) を採用しており、PCR 産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。

【検出対象遺伝子とプローブ標識】

検出対象遺伝子	プローブ標識
内在性コントロール (EC)	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー

I. 内容 (100 反応分)

● Probe qPCR Mix EC*1	2 ×	625 μl × 2
● Primer/Probe Mix EC*2	10 ×	250 μl
● ROX Reference Dye II*2	50 ×	50 μl
○ H ₂ O		1 ml

* 1 : 反応に必要な酵素、基質等を含みます。

* 2 : 遮光に留意してください。

※ 本製品には、逆転写反应用試薬および対象病原体検出用リアルタイム PCR 試薬は含まれません。別途ご用意ください。

II. 保存

− 20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【試薬】

- RNA 抽出試薬
- 逆転写反応用試薬
- 対象病原体検出用リアルタイム PCR 試薬
- Endogenous Control DNA for stool (製品コード RC166A)

【器具】

- 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）

【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)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC (製品コード TP970)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960：終売)
 - 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)
 - LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)
 - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

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： 本製品は研究用試薬です。
2. 測定結果： 検出対象である *Bacteroides* 属菌が腸内で優勢になる以前の乳児由来の試料では、内在性コントロールの検出が不安定になる場合があります。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、検出できない可能性があります。
(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、試料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。

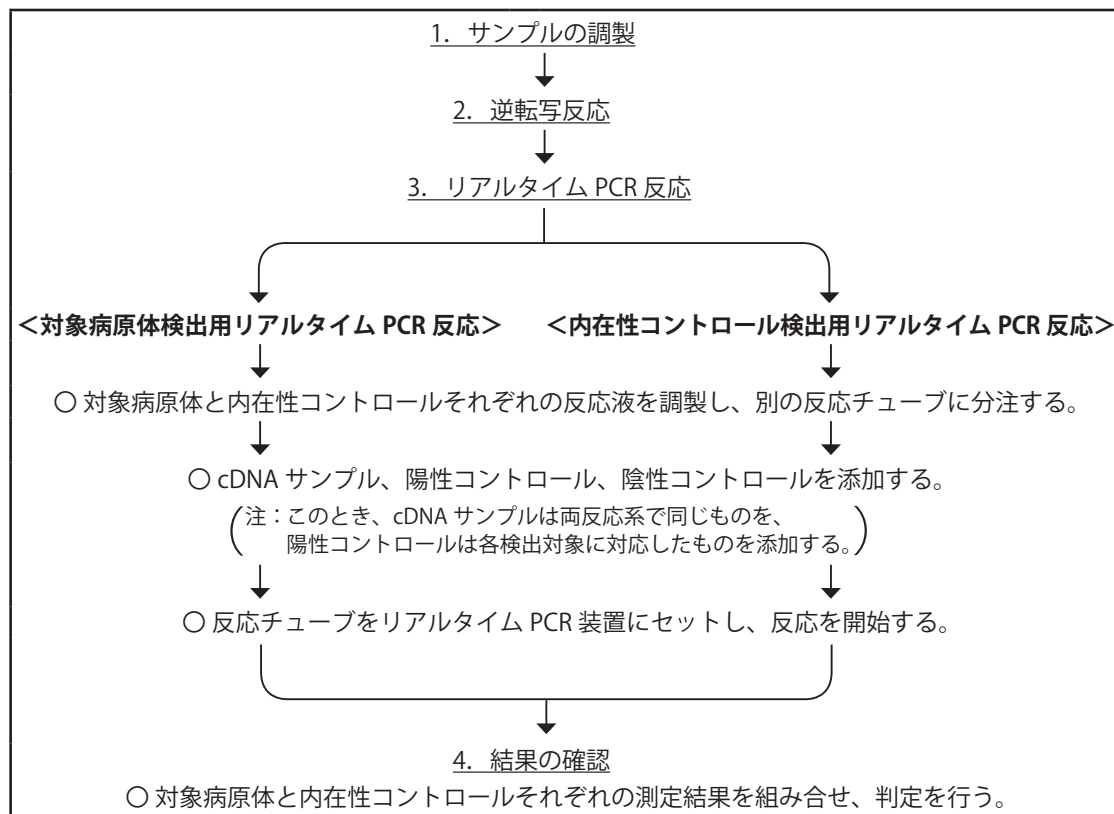
V. 操作上の注意

1. Probe qPCR Mix EC は、使用前に泡立てないよう穏やかに転倒混合して均一に混合した後、軽くスピンドウンしてからご使用ください。試薬が完全に混合されていない場合、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、保存中に沈殿が生じた場合には、軽く手で暖めるか室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。
2. 上記以外の各試薬は、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 EC および ROX Reference Dye II 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. サンプルやプローブ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 (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：検体サンプルの調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ検体サンプルの添加を行います。

本製品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。
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に設定されていない場合、誤判定の原因になります。装置の取扱説明書に従い、必要に応じて解析パラメーターの設定を確認してください。

VI. 操作

操作の概要



1. サンプルの調製 (エリア 2 で実施)

市販の RNA 抽出試薬等を使用し、試料からサンプル RNA を調製してください。

【注意】

- ・ 感染性を有する試料を取り扱う時には安全キャビネット内で行い、感染防止にご注意ください。
- ・ 核酸調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれるヌクレアーゼの混入を防ぐため作業中は可能であればマスクを着用し、清潔なディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。
- ・ 実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用するようにし、実験台、実験器具、チューブなどの RNase 除去には RNase-OFF® (製品コード 9037) の使用をお勧めします。また、RNA 実験に用いる器具 (プラスチックおよびガラス) は、他の器具と区別して RNA 専用として使用してください。

2. 逆転写反応

サンプル RNA から cDNA を合成します。

例として、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A/B) を使用する際の手順を示します。

- 1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
5 × PrimeScript RT Master Mix	2.0 μ l
サンプル RNA *1	
RNase Free dH ₂ O	up to 10.0 μ l

* 1 : 逆転写反応は、必要に応じてスケールアップすることも可能です。10 μ l の反応液で逆転写できるのは、およそ 500 ng までの RNA です。

- 2) サンプル RNA 溶液を添加する。(エリア 3 で実施)

- 3) 反応液を軽く攪拌して均一にした後、以下の条件で逆転写反応を行う。

37°C 15 分 (逆転写反応)
85°C 5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)
4°C

反応終了後、反応液は - 20°C で保存できる。

3. リアルタイム PCR 反応

※ 以下では、本製品を用いた「EC 検出用リアルタイム PCR 反応」の操作手順を示します。並行して実施する「対象病原体検出用リアルタイム PCR 反応」の手順については、各製品の取扱説明書をご参照ください。

【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行ってください。それぞれ、以下の溶液をリアルタイム PCR 反応の鋳型として添加します。

陰性コントロール (NC)

本製品の○H₂Oを「陰性コントロール」として使用します。

陽性コントロール (PC)

Endogenous Control DNA for stool (製品コード RC166A) の●Endogenous Control DNA 1を「陽性コントロール」として使用します。

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 用チューブまたはプレートに23 μl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。

【ROX Reference Dye を使用しない場合*2】

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix EC	12.5 μl
● Primer/Probe Mix EC	2.5 μl
○ H ₂ O	8.0 μl
Total	23.0 μl

* 2 : 対象機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ (製品コード TP1010/TP970 等)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)

【ROX Reference Dye を使用する場合*3】

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix EC	12.5 μl
● Primer/Probe Mix EC	2.5 μl
● ROX Reference Dye II	0.5 μl
○ H ₂ O	7.5 μl
Total	23.0 μl

* 3 : 対象機種

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System
(ともに Thermo Fisher Scientific 社)

-
- 2) 対象病原体検出用リアルタイム PCR 試薬に添加するものと同じ cDNA サンプル、「陽性コントロール」および「陰性コントロール」のいずれかを 2 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。

<初期変性>

(25°C 10分)*4

95°C 10秒

< PCR : 45 サイクル >

95°C 5秒

56°C 30秒 (蛍光検出 : FAM/(ROX))

* 4 : 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。

※ Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズでは、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>)。

※ Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System および QuantStudio 5 Real-Time PCR System では、Run mode/Ramp speed を Fast に設定してください。

※ 対象病原体検出用リアルタイム PCR 試薬の推奨 PCR 条件が上記と同じ場合、同一 Run で反応可能です (例: TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit Ver.2 (製品コード RR265A))。上記条件以外の場合は、異なる Run で反応を実施してください。

VII. 判定

陽性コントロールおよび陰性コントロールが正しく反応していることを確認した上で、測定対象サンプルの判定を行ってください。

【検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター】

検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
対象病原体	(使用する試薬による)
内在性コントロール (EC)	FAM

【コントロール反応の正しい結果】

	対象病原体	EC (FAM)
陽性コントロール	+	+
陰性コントロール	-	-

- ・ 陽性コントロールで対象病原体および EC 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対象病原体および EC 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上で再試験を行う。

【測定対象サンプルの判定】

<陽性判定の例>

対象病原体	EC (FAM)	判定
+	+/-	対象病原体陽性

- ・ 対象病原体が検出された場合は、EC の検出に関わらず、陽性判定となる。

<陰性判定の例>

対象病原体	EC (FAM)	判定
-	+	検出限界以下
-	-	判定不能

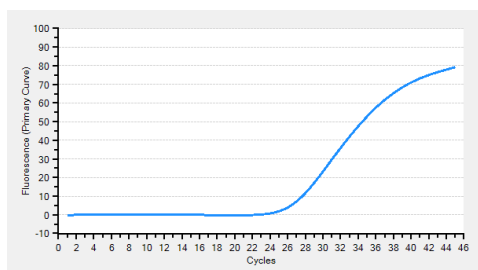
- ・ 対象病原体が検出されなかった場合には、EC の結果を確認する。
- ・ EC が検出されていれば、検出限界以下となる。
- ・ EC が不検出の場合は以下の可能性が考えられる。
 - (1) 試料からの核酸抽出操作が不適切であった。*
 - (2) cDNA 合成がうまくいかなかった。*
 - (3) 検体サンプルの添加量が不十分または添加操作に不備があった。
 - (4) 阻害物質により PCR 反応が阻害された。*
 - (5) *Bacteroides* 属菌の存在比が低い乳児由来の試料であった。等

*：検体サンプルの再調製を行ってください。

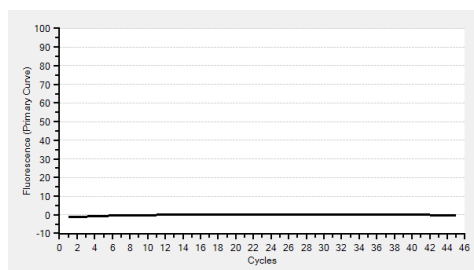
VIII. コントロール反応の例

Endogenous Control DNA 1 を鋳型として使用した場合の反応例を以下に示す。
(qPCR 装置は Thermal Cycler Dice Real Time System IV を使用)

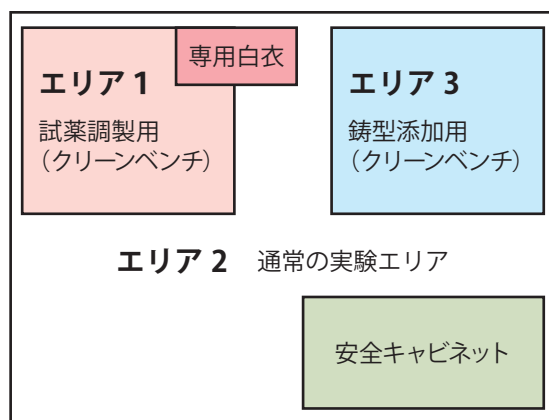
陽性コントロール (FAM)



陰性コントロール (FAM)



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。
(鋳型となる核酸は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体サンプルの調製を行う。
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の添加を行う。

X. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC (製品コード TP1010)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)
0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set (製品コード NJ907)
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)
Norovirus (GI/GII) Typing Kit (Endogenous Control) (製品コード RC160A)
Endogenous Control DNA for stool (製品コード RC166A)
RNase-OFF® (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)

[食品環境検査用]

TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit Ver.2 (製品コード RR265A/B)
TaKaRa qPCR *Norovirus* (GI/GII) Typing Kit (1 Step) Ver.2 (製品コード RR266A)
Norovirus (GI/GII) Positive Control DNA (製品コード RR251A)

XI. 注意

- 本製品は研究用試薬です。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。
- 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、RNase-OFF は PureBiotech, LLC 社の登録商標です。PrimeScript 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