

製品コード RC383A

研究用

TAKARA

**Intestinal pathogenic bacteria Detection
qPCR Kit for Wastewater**

説明書

本製品は研究用試薬です。下水調査に使用します。

v202401Da

本製品は、リアルタイム PCR 法により、下水検体由来の精製 DNA 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ためのキットです。

※ 本製品の製品化にあたっては、国立大学法人山梨大学国際流域環境研究センター 原本英司教授に監修いただきました。

【特長】

- ・ 高感度での検出が可能な qPCR 試薬を採用しているため、下水サンプル中の低コピーターゲットの検出に適しています。
- ・ 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。

【検出対象とプローブ標識】*1

検出対象菌種	検出対象遺伝子	プローブ標識
EHEC	VT1/2 (stx1a, 1c, 1d, stx2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2g)*2	FAM (レポーター) / ダーククエンチャー
サルモネラ属菌	<i>invA</i>	Cyanine5 (レポーター) / ダーククエンチャー
赤痢菌	<i>ipaH</i> *3	HEX (レポーター) / ダーククエンチャー

* 1 : 本製品では VT、*invA*、*ipaH* を別々の反応で検出することをお勧めします。マルチプレックスで検出する場合は、弊社ウェブサイトの本製品の技術情報をご参照ください。

* 2 : *J. Clin. Microbiol.* **50**(9): 2951-2963, 2012. 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。

* 3 : *ipaH* 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。

I. 内容 (各 100 回分)

● qPCR Mix w/UNG*1	2 ×	1.25 ml × 3
● VT Primer/Probe*2	25 ×	100 μl
● ipaH Primer/Probe*2	25 ×	100 μl
● invA Primer/Probe*2	25 ×	100 μl
○ RNase Free H ₂ O		1 ml × 4
● ROX Reference Dye II*3 EASY Dilution II (for Real Time PCR)	50 ×	150 μl 1 ml × 4
● Positive Control DNA (VT/ipaH/invA)	1 × 10 ⁶ copies/μl	300 μl

* 1 : 酵素、基質等を含みます。

* 2 : 蛍光標識プローブを含んでいるため、遮光に留意してください。

* 3 : 蛍光物質を含んでいるため、遮光に留意してください。

II. 保存

− 20℃

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【試薬】

- ・ DNA 抽出キット

【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）
- ・ リアルタイム PCR 用のチューブ等

【機器】

- ・ リアルタイム PCR 装置
 - Thermal Cycler Dice® Real Time System IV（製品コード TP1000/TP1010/TP1030）
 - Thermal Cycler Dice Real Time System III (Cy5) with PC（製品コード TP990）
 - ※ HEX オプションフィルターの追加が必要です。
 - Filter Unit Premium (HEX/VIC) for LED（製品コード TP704）
 - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - LightCycler 96 System/LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)
 - CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 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

本製品は細菌の遺伝子を検出する試薬であるため、感染性のない不活化された細菌を検出する可能性があります。また、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。
(反応結果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、サンプル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物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. qPCR Mix w/UNG 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. qPCR Mix w/UNG 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. 各 Primer/Probe 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. 万一、サンプルやプローブ、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場合がありますので、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. コンタミネーション防止のため、リアルタイム PCR 反応液の調製は操作毎にエリア分けをして、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」をご参照ください。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：反応液の調製を行います。
 - エリア 3：反応液と鋳型の混合を行います。
- 本製品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。
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、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

VI-1. サンプル DNA の調製

抽出キット等のプロトコールなどに従ってください。

[注意] DNA 抽出の操作にあたっては、手袋、マスク、防護眼鏡を使用し、安全キャビネット内で操作してください。

VI-2. 陽性コントロールの調製 (エリア 3 で実施)

【定量解析の場合】

● Positive Control DNA (VT/ipaH/invA) を EASY Dilution II (for Real Time PCR) で段階希釈し、検量線作成用のスタンダードとして用います。以下に段階希釈の例を示します。

1) 以下の通り、EASY Dilution II (for Real Time PCR) を 1.5 ml チューブに分注する。

[1] 20 μ l 分注 : 1 本

[2] 45 μ l 分注 : 5 本

2) ● Positive Control DNA (VT/ipaH/invA) 原液 5 μ l を [1] のチューブに添加し、 2×10^5 copies/ μ l の陽性コントロールを調製する。

3) 2) で調製した 2×10^5 copies/ μ l の溶液 5 μ l を [2] のチューブに添加し、 2×10^4 copies/ μ l の陽性コントロールを調製する。

4) 希釈操作を繰り返し、 2×10^0 copies/ μ l までの段階希釈液を調製する。

- | |
|--|
| 1. 2×10^5 copies/ μ l (Positive Control DNA 原液 5 μ l + EASY Dilution II 20 μ l) |
| 2. 2×10^4 copies/ μ l (1. の 2×10^5 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution II 45 μ l) |
| 3. 2×10^3 copies/ μ l (2. の 2×10^4 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution II 45 μ l) |
| 4. 2×10^2 copies/ μ l (3. の 2×10^3 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution II 45 μ l) |
| 5. 2×10^1 copies/ μ l (4. の 2×10^2 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution II 45 μ l) |
| 6. 2×10^0 copies/ μ l (5. の 2×10^1 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution II 45 μ l) |

上記の 6 段階の陽性コントロールを鋳型として反応を実施する (1 反応にはそれぞれ 5 μ l を使用)。

【定性解析の場合】

● Positive Control DNA (VT/ipaH/invA) を希釈せずに、原液のまま陽性コントロールとして反応を実施する (1 反応には 5 μ l を使用)。

VI-3. リアルタイム PCR 反応

結果の判定を正しく行うため、サンプル DNA の測定に加えて、陽性コントロール反応と本製品添付の○RNase Free H₂O を用いた陰性コントロール反応を同時に行います。

[注意] 以下の操作のうち、1)のみ氷上で実施してください。以降の2)、3)の分注操作は室温で行ってください。分注操作を氷上で行うと、リアルタイム PCR 反応実施時の温度変化により蛍光検出に影響を及ぼす場合があります。調製後は速やかに反応を開始してください。

- 1) リアルタイム PCR 反応液のマスターミックスの調製 (エリア 1)
以下の組成で、必要数 + α 分のマスターミックスを氷上で調製する。

【ROX Reference Dye II を使用しない場合*1】

◆ EHEC 検出用

[1 反応分のマスターミックス]

試薬		使用量
● qPCR Mix w/UNG	2×	12.5 μ l
● VT Primer/Probe	25×	1.0 μ l
○ RNase Free H ₂ O		6.5 μ l
Total		20.0 μ l

◆ サルモネラ属菌検出用

[1 反応分のマスターミックス]

試薬		使用量
● qPCR Mix w/UNG	2×	12.5 μ l
● invA Primer/Probe	25×	1.0 μ l
○ RNase Free H ₂ O		6.5 μ l
Total		20.0 μ l

◆ 赤痢菌検出用

[1 反応分のマスターミックス]

試薬		使用量
● qPCR Mix w/UNG	2×	12.5 μ l
● ipaH Primer/Probe	25×	1.0 μ l
○ RNase Free H ₂ O		6.5 μ l
Total		20.0 μ l

* 1 : 対象機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System IV (製品コード TP1000/TP1010/TP1030)
- Thermal Cycler Dice Real Time System III (Cy5) with PC (製品コード TP990)
- LightCycler 96 System/LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics 社)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)

【ROX Reference Dye II を使用する場合* 2】

◆ EHEC 検出用

[1 反応分のマスターミックス]

試薬		使用量
● qPCR Mix w/UNG	2×	12.5 μ l
● VT Primer/Probe	25×	1.0 μ l
● ROX Reference Dye II	50×	0.5 μ l
○ RNase Free H ₂ O		6.0 μ l
Total		20.0 μ l

◆ サルモネラ属菌検出用

[1 反応分のマスターミックス]

試薬		使用量
● qPCR Mix w/UNG	2×	12.5 μ l
● invA Primer/Probe	25×	1.0 μ l
● ROX Reference Dye II	50×	0.5 μ l
○ RNase Free H ₂ O		6.0 μ l
Total		20.0 μ l

◆ 赤痢菌検出用

[1 反応分のマスターミックス]

試薬		使用量
● qPCR Mix w/UNG	2×	12.5 μ l
● ipaH Primer/Probe	25×	1.0 μ l
● ROX Reference Dye II	50×	0.5 μ l
○ RNase Free H ₂ O		6.0 μ l
Total		20.0 μ l

* 2：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) マスターミックスの分注 (エリア 1)

リアルタイム PCR 用のチューブにマスターミックスを 20 μ l ずつ分注する。

3) サンプル (鑄型) の添加 (エリア 3)

サンプル DNA、陰性コントロール (○ RNase Free H₂O)、陽性コントロールを 2) で分注したマスターミックスに 5 μ l 添加し、しっかりとふたをする。

4) リアルタイム PCR 反応の実施

以下の条件で反応を実施する。

[注意] 反応前に必ずチューブやプレートスピンドウンし、内壁への反応液の付着や気泡がないことを確認してください。気泡があると、蛍光検出に影響を及ぼす場合があります。

<反応条件>

Hold

(25℃ 10分)*3

95℃ 30秒

PCR : 45 サイクル

95℃ 5秒

56℃ 30秒 (蛍光検出 : FAM/Cy5/HEX(/ROX))

* 3 : 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 シリーズの場合、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、QuantStudio 5 Real-Time PCR System では Run mode/Ramp speed を Fast に設定してください。

VII. 判定

反応終了後、増幅曲線および解析パラメータが適切であることを確認し*、Ct値を算出する。

*：解析方法は、ご使用のリアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

【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
VT 1/2	FAM
<i>invA</i>	Cy5
<i>ipaH</i>	HEX

【コントロール反応の確認】

	FAM (VT)	Cy5 (<i>invA</i>)	HEX (<i>ipaH</i>)
陰性コントロール (RNase Free H ₂ O)	不検出	不検出	不検出
陽性コントロール (VT/ <i>invA</i> / <i>ipaH</i>)	+	+	+

- ・ 陰性コントロールが不検出であることを確認する。不適切な増幅が認められた場合は、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。
- ・ 陽性コントロールについて、各ターゲット遺伝子が検出されることを確認する。検出されない場合、何らかの原因でリアルタイム PCR が正常に行われていない。再反応を行う。

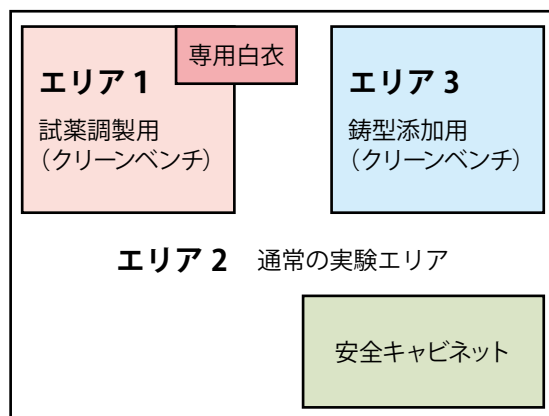
【サンプルの測定結果の判定 (定量解析の場合)】

スタンダード (陽性コントロール段階希釈液) の Ct 値を基に、VT、*invA*、*ipaH* の検量線をそれぞれ作成する。サンプル DNA を添加した各ウェルの Ct 値と、作成した検量線から定量値を算出する。さらに下水の濃縮率やリアルタイム PCR 反応に持ち込んだ DNA 量などを考慮し、初発試料中の細菌遺伝子コピー数へ換算する。

【サンプルの測定結果の判定例 (定性解析の場合)】

FAM (VT)	Cy5 (<i>invA</i>)	HEX (<i>ipaH</i>)	判定結果
+	-	-	EHEC 陽性
-	+	-	サルモネラ属菌陽性
-	-	+	赤痢菌陽性
-	-	-	検出限界以下

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
検体の取扱いや核酸抽出を行う。
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。
標準サンプルの希釈もここで行う。

IX. 関連製品

PMMoV Detection RT-qPCR Kit for Wastewater (製品コード RC380A)
Phi6 Detection RT-qPCR Kit for Wastewater (製品コード RC381A)
Thermal Cycler Dice® Real Time System IV (製品コード TP1000/TP1010/TP1030)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Cy5) with PC (製品コード TP990)
Filter Unit Premium (HEX/VIC) for LED (製品コード TP704)

X. 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