

製品コード RR114A

食品・環境分析用

TAKARA

Bacteria Screening PCR Kit

説明書

v202008Da

食品の安全性に対する消費者の信頼感を確保するため、食品供給の各段階における品質保証が重要視されています。そのためにさまざまな検査手法が活用されていますが、PCR法は有用な手法の一つです。PCR法は、ごく微量のDNAを鋳型として用いて、目的遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNAの熱変性、プライマーのアニーリング、DNAポリメラーゼによる伸長反応の3ステップからなる工程を1サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子を100万倍にまで増幅させることができます。

本キットは、ENTプライマーにより大腸菌とサルモネラ菌を含む腸内細菌科の菌群を、またBSプライマーによりセレウス菌を含むバチルス属、黄色ブドウ球菌を含むスタフィロコッカス属の菌群を、16S rRNA遺伝子をターゲットとして検出するキットです（各種菌群との反応性は表1参照）。

また、増菌培養と組み合わせることにより、検体に含まれるわずかな数の生菌も短時間で検出することができます。

I. 内容 (ENT, BS 各 50 μ l \times 50 回分)

1. 2 \times Premix Solution*	2 \times conc.	250 μ l \times 10 tubes	(100 反応分)
2. Primer Mix ENT	5 μ M each	125 μ l	(50 反応分)
3. Primer Mix BS	5 μ M each	125 μ l	(50 反応分)
4. Positive Control ENT		25 μ l	(10 反応分)
5. Positive Control BS		25 μ l	(10 反応分)
6. dH ₂ O		1 ml \times 3 tubes	
7. 10% Chelex Solution (キレックス液)		12 ml \times 2 vials	

* : 2 \times Premix Solution に含有されているもの

- TaKaRa Ex Taq[®] HS : 0.1 units/ μ l
- Optimized Buffer : 2 \times conc.
- (Mg²⁺ Concentration : 4 mM)
- dNTP Mixture : 0.4 mM each

II. 保存

10%キレックス液：4℃

その他のコンポーネント：- 20℃

III. 使用上の注意

- 2 \times Premix Solution には酵素が含まれていますので激しい攪拌操作は避けてください。また凍結融解の繰り返しにより活性が低下する恐れがありますので、使用するチューブのみを融解し、融解後はPCR用のチューブに25 μ l ずつ分注して- 20℃保存してください。
- 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。
(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。)
- 判定の確定には遺伝子検査だけではなく、培養検査などの結果も併用の上、ご判断ください。

IV. キット以外に必要な試薬・機器（主なもの）

本キットを用いた検出過程では、さらに次のような試薬、機器が必要です。

【試薬】

1. アガロースゲル
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)
または PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
2. 電気泳動用 buffer
TBE (Tris-borate-EDTA) powder (製品コード T905) など
3. DNA 分子量マーカー
φ X174-*Hae* III digest (製品コード 3405A/B)
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B) など
4. Loading buffer (6 × :36%グリセロール、0.05% bromophenol blue、30 mM EDTA、0.035% xylene cyanol) (注：3. DNA 分子量マーカーに添付されている)
5. DNA 染色剤
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
またはエチジウムブロマイド

【機器】

1. サーマルサイクラー
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (製品コード TP600)
2. 電気泳動装置
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1) など
3. UV トランスイルミネーター (300 nm 前後のもの)
4. 電気泳動ゲル撮影装置 (SYBR Green I を使用する場合は専用のフィルターが必要です。)
5. ヒートブロック (100°Cまで温度を上げられるもの)
6. 1.5 ml チューブ対応型冷却遠心機

【その他】

1. 0.2 ml PCR tube
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)
2. マイクロピペット
3. マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付き)
4. アガロースゲル染色用トレイ (SYBR Green I を使用する場合はポリプロピレン製容器を使用してください。)

V. 操作上の注意

1. 万一、プライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。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、操作は細心の注意を払ってください (手袋・マスク着用等)。
2. 反応液の調製から検出まで、次の4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)。コンタミネーション発生の原因となりますので、エリア4以外では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：PCR 反応液の調製、分注を行います。
 - エリア2：検体の調製 (DNA 抽出等) を行います。
 - エリア3：PCR 反応液へ鋳型 DNA の添加を行います。
 - エリア4：電気泳動等で PCR 増幅産物の解析を行います。

VI. 操作

1. PCR 用試料液の調製 (エリア 2 で実施)

A. DNA 抽出 (培養液等で菌体が多量にある場合)

- (1) BHI 培地*¹ や SCD 培地*² もしくは他の適当な培地中で一晩培養した 20 ~ 100 μ l の菌体培養液を、遠心機を用いて 12,000 rpm (13,000 \times g)、3 ~ 5 分で集菌する。(スクリーキャップ式の 1.5 ml マイクロチューブの使用を推奨。)高い感度が必要な場合は、集菌した菌体を 1 ml の精製水もしくは TE buffer (10 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0) で懸濁、洗浄し、遠心機で再度集菌する。
- (2) 集菌した菌体量 (集菌に用いた培養液量) に対して、2 ~ 10 倍容量の攪拌状態のキレックス液 (通常 50 ~ 200 μ l) を先太チップ (先を切った滅菌済みチップ) で添加、懸濁する。
- (3) 99°C で 5 分間加熱処理後、氷上で急冷し、さらに 1 分間以上冷やす。
- (4) 12,000 rpm (約 13,000 \times g) で 1 分間遠心する。
- (5) 遠心上清を PCR 用 DNA 試料液とする。

B. 菌体を直接 PCR にかける場合

- (1) コロニーから極微量の菌体を取り 50 ~ 200 μ l のキレックス液に懸濁する (スクリーキャップ式の 1.5 ml マイクロチューブの使用を推奨)。
- (2) 99°C で 5 分間加熱処理後、氷上で急冷し、さらに 1 分間以上冷やす。
- (3) 12,000 rpm (約 13,000 \times g) で 1 分間遠心する。
- (4) 遠心上清を PCR 用 DNA 試料液とする。

C. 培養法を組み合わせ、食品等から菌を回収して PCR を行う場合

- (1) 被験試料を BHI 培地*¹ や SCD 培地*² もしくは他の適当な培地で 5 ~ 20 倍に希釈し、細菌検査用ホモジナイザ (ストマッカー等) で破碎混合後、4 ~ 7 時間静置もしくは振盪培養する。
- (2) 培養液 1.3 ml を 1,000 rpm (約 100 \times g) で 1 分間遠心後、その遠心上清の 1.0 ~ 1.2 ml を 12,000 rpm (約 13,000 \times g) で 3 分間遠心する。
- (3) 沈殿に 200 μ l のキレックス液を加えて 99°C で 5 分間加熱処理後、氷上で急冷し、さらに 1 分間以上冷やす。
- (4) 12,000 rpm (約 13,000 \times g) で 1 分間遠心する。
- (5) 遠心上清を PCR 用 DNA 試料液とする。

検出感度を上げたい場合は、以下の [オプション 1][オプション 2] の手法を試してください。

菌体 DNA 調製に関するオプション

[オプション 1]

(スクリーキャップ式の 1.5 ml マイクロチューブの使用を推奨。)

- (1) 遠心分離した菌体を含む沈殿 (前述 C-(2)) を滅菌水や TE buffer (10 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0) で一度洗浄し、200 μ l のキレックス液に懸濁する。
- (2) 99°C で 5 分間加熱処理後、氷上で急冷し、さらに 1 分間以上冷やす。
- (3) 12,000 rpm (約 13,000 \times g) で 1 分間遠心する。
- (4) 遠心上清を PCR 用 DNA 試料液とする。

[オプション2]

(スクリュウキャップ式の 1.5 ml マイクロチューブの使用を推奨。)

- (1) 遠心分離した菌体を含む沈殿 (前述 C-(2)) を 100 μ l のアクロモペプチターゼ液*3 (250 U/ml, in TE buffer) に懸濁し 37~55°C で 10~15 分間インキュベートする。(黄色ブドウ球菌等のグラム陽性菌の細胞壁が酵素分解されて、DNA の回収量が増加する。この工程は、腸内細菌科やビブリオ科の細菌群の場合には必要ないが、実施による検出感度の低下は見られない。)
- (2) 100 μ l のキレックス液を加えて 99°C で 5 分間加熱処理後、氷上で急冷し、さらに 1 分以上冷やす。
- (3) 12,000 rpm (約 13,000 \times g) で 1 分間遠心する。
- (4) 遠心上清を PCR 用 DNA 試料液とする。

注 1) 加工食品によっては、(特に香辛料を多く含む食品では) PCR 阻害を生じる場合があります。この場合、より厳密な菌体からの DNA 抽出法を使用する必要があります。

(QIAGEN 社: Generation Capture Column Kit、DNeasy Plant Mini Kit など)

注 2) 死菌数が多すぎる食品では、培養法を組み入れても死菌が検出される場合があります。

注 3) 発酵食品では、BS プライマーが納豆菌等のバチルス属と反応することが予測されます。

注 4) ビブリオ科細菌の中で好塩性のものは、BHI 培地*1 や SCD 培地*2 で良好な増殖性を示さない可能性があります。

* 1: BHI 培地: プレインハートインフュージョンブイヨン、日水製薬 (株)

* 2: SCD 培地: トリプトソーヤブイヨン、日水製薬 (株)

* 3: アクロモペプチターゼ: アクロモペプチターゼ (TBL-1)、粗製品、和光純薬工業 (株)

2. PCR 反応液の調製

1 反応あたり以下の反応液を氷上で調製する (エリア 1 で実施)。

試薬	使用量	終濃度
2 \times Premix Solution	25.0 μ l	1 \times
Primer Mix ENT または BS (5 μ M each)	2.5 μ l	0.25 μ M each
PCR 用 DNA 試料液*1	2.5 μ l*2	
滅菌精製水	up to 50.0 μ l	

* 1: PCR 用 DNA 試料液のかわりに滅菌精製水を加えたものをネガティブコントロールとし、ポジティブコントロールには Positive Control ENT または BS を 2.5 μ l 添加してください。

* 2: PCR 用 DNA 試料液は 5 μ l まで添加可能です。それより多く添加すると反応阻害を起こすことがあります。

3. PCR 反応条件

反応チューブのキャップをしっかりと閉め、サーマルサイクラーにセットして以下の条件で反応を開始する。

95°C	60 sec.	
↓		
95°C	30 sec.	} 30 cycles*
59°C	30 sec.	
72°C	30 sec.	
↓		
72°C	60 sec.	
4°C		

*：過剰なサイクル数で反応を行った場合、*Taq* ポリメラーゼに由来する増幅産物が生じる場合があります。

4. アガロースゲルの作製

- (1) 三角フラスコに電気泳動用 buffer を入れ、Agarose L03「TAKARA」を 1.8% (W/V) あるいは PrimeGel Agarose PCR-Sieve を 3% になるように攪拌しながらゆっくり加える。
- (2) 電子レンジで 2～3 分加熱する。取り出してよく攪拌し、溶液が均一に溶解していることを確認する。溶解が不十分な場合は再び加熱する。
- (3) ゲル板の準備をする。
- (4) アガロースゲルが 50～60°C に冷めたらゲル板にアガロースを注ぎ、サンプルを注入するスロットを作製するためにコームを差し込み、30 分～1 時間室温で放置して、ゲルを固める。
(エチジウムブロマイド先染めの場合)
ゲル溶液が 50～60°C に冷めたら終濃度 0.5 μg/ml になるようにエチジウムブロマイド水溶液を加え、均一になるよう穏やかに攪拌した後、ゲル板に注ぐ。30 分～1 時間室温で放置して、ゲルを固める。
- (5) 十分に固まったアガロースゲルを泳動槽にセットし、ゲルが充分浸かるまで電気泳動 buffer を泳動槽に加える。
- (6) ゲルが壊れないように注意しながらゆっくりとコームを抜き取る。

5. 電気泳動 (エリア 4 で実施)

- (1) 電極の+、-を間違えないように接続する。(PCR で増幅した核酸は負に電荷しており、- → + に泳動される。)
- (2) PCR 終了後の各反応液 2～5 μl に 1.0 μl の 6 × Loading buffer を加えて混合し、マイクロピペットを用いてゆっくりとゲルのスロットに注入する。(両端のスロットには DNA マーカーを適量注入する。)
- (3) 50～150 V の定電圧をかけ、電気泳動する。

6. 染色バンドの確認（エチジウムブロマイド先染めの場合は（3）のみでよい。）

- (1) ゲルが充分浸せる量の 1 $\mu\text{g/ml}$ のエチジウムブロマイド水溶液、もしくは SYBR Green I 溶液（TBE buffer または電気泳動 buffer で 10,000 倍希釈したもの）を調製し、アガロースゲル染色用トレイに入れておく。
- (2) 電気泳動したゲルをトレイに入れ 20 ～ 30 分静置する。
- (3) UV トランスイルミネーターにゲルをセットして写真を撮影し*、DNA マーカーと照らし合わせ、核酸のバンドの有無とサイズを確認する。

*：SYBR Green I を使用する場合は、専用フィルターを用いてください。

操作上の注意

エチジウムブロマイド、SYBR Green I を扱う場合、およびこれら DNA 染色剤で染色したゲルを取り扱う場合は、必ず手袋を着用し、直接手が触れないよう注意してください。

7. 判定

PCR サンプル中に大腸菌やサルモネラ菌を含む腸内細菌科菌群が存在すれば、ENT Primer により、約 420 bp (419 ～ 425 bp：大腸菌の場合は、424 bp) のバンドが検出される。また、セレウス菌を含むバチルス属、黄色ブドウ球菌を含むスタフィロコッカス属の菌群が存在すれば、BS Primer により、約 380 bp (380 ～ 382 bp：バチルスセレウス菌の場合は 381 bp) のバンドが検出される。（ENT Primer および BS Primer で検出される菌類については、VII. 応用例をご参照ください。）

Positive Control ENT では、ENT Primer により 424 bp のバンドが検出される。

Positive Control BS では、BS Primer により 381 bp のバンドが検出される。

サンプルの電気泳動結果	判定
(1) ENT Primer により、約 420 bp のバンドが検出された。	PCR サンプル中に、大腸菌やサルモネラ菌を含む腸内細菌科菌群が存在する。
(2) BS Primer により、約 380 bp のバンドが検出された。	PCR サンプル中に、セレウス菌を含むバチルス属、黄色ブドウ球菌を含むスタフィロコッカス属の菌群が存在する。
(3) ENT Primer により、何もバンドが検出されない。	Positive Control ENT のレーンに、424 bp のバンドが検出されていれば、サンプル中の大腸菌やサルモネラ菌を含む腸内細菌科菌群は検出限界以下である。* Positive Control ENT のレーンに 424 bp のバンドがなければ、何らかの原因で PCR が正常に行われていない可能性があるので、再度 PCR を行う。
(4) BS Primer により、何もバンドが検出されない。	Positive Control BS のレーンに、381 bp のバンドが検出されていれば、サンプル中のセレウス菌を含むバチルス属、黄色ブドウ球菌を含むスタフィロコッカス属の菌群は検出限界以下である。* Positive Control BS のレーンに 381 bp のバンドがなければ、何らかの原因で PCR が正常に行われていない可能性があるので、再度 PCR を行う。
Negative Control のレーンに、何もバンドが検出されない。	コンタミネーションはない。
Negative Control のレーンに、420 bp もしくは 380 bp のバンドが検出された。	コンタミネーションを起こしていると考えられるので、反応液調製場所および使用した機器を除染した上で、再度検出を行う。

*：必要があれば、感度をあげるために、1. PCR 用試料液の調製の [オプション 1] [オプション 2] などの手法を試してください。

VII. 応用例：ENT および BS プライマーの各種細菌に対する反応特異性の検討

<実験> 各種細菌のゲノム DNA 50 pg (10⁴ コピー前後に相当) を鋳型とし、ENT プライマーおよび BS プライマーで PCR を行った。

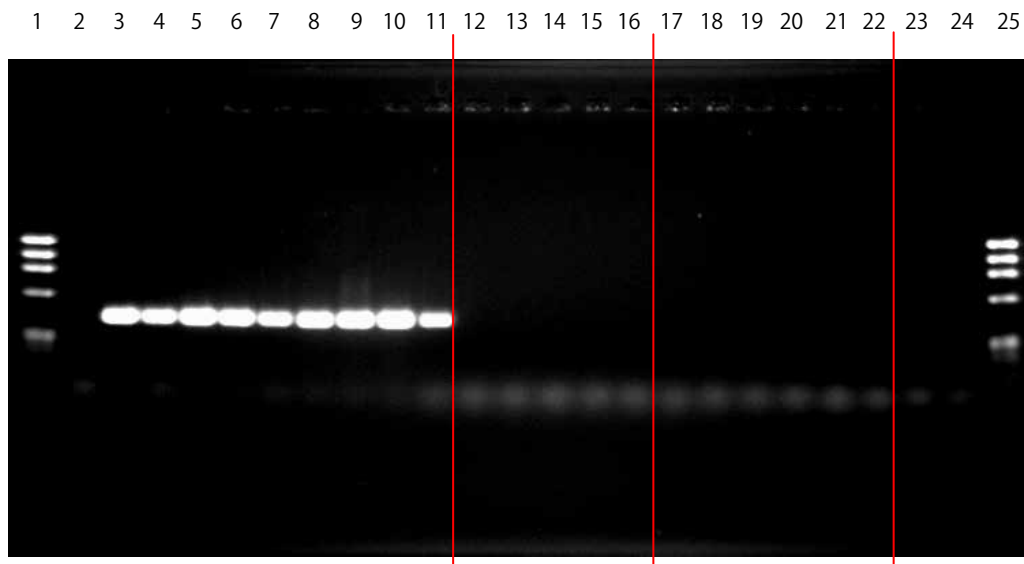
PCR 条件： 95℃ 60 sec.
↓
95℃ 30 sec. }
59℃ 30 sec. } 30 cycles
72℃ 30 sec. }
↓
72℃ 60 sec.
4℃

PCR 反応後、2 μl の反応液をアガロースゲル電気泳動にて解析した。

<結果> アガロースゲル電気泳動による解析結果の一例を図 1. に、反応特異性 (+ で表示) を表 1. にそれぞれ示す。ENT プライマーは、腸内細菌科 (*Proteus mirabilis* を除く) およびビブリオ科に属する細菌と反応する。BS プライマーは、バチルス属、スタフィロコッカス属およびエアロコッカス属に属する細菌と反応する。

Lane 1 : <i>φ</i> X174- <i>Hae</i> III digest	Lane 14 : <i>Campylobacter coli</i> DNA
Lane 2 : Negative Control (No Template DNA)	Lane 15 : <i>Flavobacterium johnsoniae</i> DNA
Lane 3 : <i>Serratia ficaria</i> DNA	Lane 16 : <i>Streptococcus mutans</i> DNA
Lane 4 : <i>Klebsiella pneumoniae</i> DNA	Lane 17 : <i>Staphylococcus epidermidis</i> DNA
Lane 5 : <i>Salmonella enteritidis</i> DNA	Lane 18 : <i>Staphylococcus aureus</i> DNA
Lane 6 : <i>Escherichia coli</i> DNA	Lane 19 : <i>Bacillus subtilis</i> DNA
Lane 7 : <i>Citrobacter freundii</i> DNA	Lane 20 : <i>Bacillus megaterium</i> DNA
Lane 8 : <i>Yersinia enterocolitica</i> DNA	Lane 21 : <i>Bacillus cereus</i> DNA
Lane 9 : <i>Vibrio vulnificus</i> DNA	Lane 22 : <i>Aerococcus viridans</i> DNA
Lane 10 : <i>Photobacterium leiognathi</i> DNA	Lane 23 : <i>Enterococcus faecalis</i> DNA
Lane 11 : <i>Aeromonas hydrophila</i> DNA	Lane 24 : <i>Lactobacillus casei</i> DNA
Lane 12 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA	Lane 25 : <i>φ</i> X174- <i>Hae</i> III digest
Lane 13 : <i>Alcaligenes faecalis</i> DNA	

(1) ENT プライマー



(2) BS プライマー

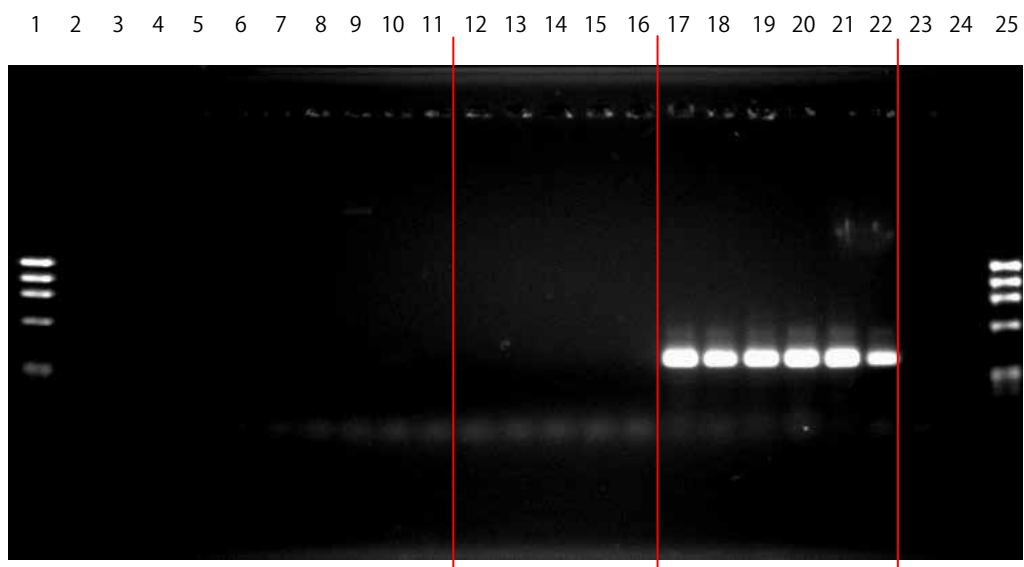


図 1. ENT および BS プライマーでの PCR 結果 (電気泳動)

表 1. 検定した細菌とその反応特異性

科 (family)	属 (Genus)、種 (Species)	菌株起源	ENT	BS
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium radiobacte</i>	ATCC 19358 ^T	—	—
<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	JCM 1474 ^T	—	—
<i>Neisseriaceae</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	JCM 1249 ^T	—	—
	<i>Neisseria meningitides</i>	ATCC 13077 ^T	—	—
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	JCM 1975 ^T	—	—
<i>Legionellaceae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	JCM 7571 ^T	—	—
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27843 ^T	—	—
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	JCM 5963 ^T	—	—
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Moraxella antipestifer</i>	JCM 9532 ^T	—	—
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	JCM 6841 ^T	—	—
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	JCM 3725 ^T	+	—
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802 ^T	+	—
	<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25521 ^T	+	—
	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	ATCC 7966 ^T	+	—
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	JCM 1236 ^T	+	—
	<i>Enterobacter cloacae</i>	JCM 1232 ^T	+	—
	<i>Citrobacter freundii</i>	JCM 1657 ^T	+	—
	<i>Escherichia coli</i>	JCM 1649 ^T	+	—
	<i>Escherichia coli</i> JM109	(2)	+	—
	<i>Escherichia coli</i> HB101	(2)	+	—
	<i>Escherichia coli</i> 0157: H7	(3)	+	—
	<i>Hafnia alvei</i>	JCM 1666 ^T	+	—
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JCM 1662 ^T	+	—
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC 14029 ^T	+	—
	<i>Proteus mirabilis</i>	JCM 1669 ^T	—	—
	<i>Salmonella typhimurium</i>	IFO 13245	+	—
	<i>Salmonella typhimurium</i>	IFO 14211	+	—
	<i>Salmonella enteritidis</i>	IFO 3313	+	—
	<i>Serratia ficaria</i>	JCM 1241 ^T	+	—
	<i>Serratia marcescens</i>	JCM 1239 ^T	+	—
	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 29903 ^T	+	—
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610 ^T	+	—
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	IFO 15305 ^T	—	+
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11950	—	+
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792 ^T	—	+
	<i>Bacillus licheniformis</i>	JCM 2505 ^T	—	±
	<i>Bacillus megaterium</i>	JCM 2506 ^T	—	+
	<i>Bacillus pumilus</i>	JCM 2508 ^T	—	+
	<i>Bacillus subtilis</i>	IFO 13719 ^T	—	+
<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 19120 ^T	—	±
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	IFO 3060	—	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	JCM 2874	—	+
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	JCM 2414 ^T	—	+
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	JCM 1134 ^T	—	—
	<i>Lactobacillus gasserii</i>	JCM 1131 ^T	—	—
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	日乳 B - 1	—	—
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	JCM 1002 ^T	—	—

科 (family)	属 (Genus)、種 (Species)	菌株起源	ENT	BS
<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 33391 ^T	—	—
<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559 ^T	—	—
<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC 43504 ^T	—	—
<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 1290 ^T	—	—
<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium alactolyticum</i> (4)	JCM 6480 ^T	—	—
<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Veillonella alcalescens</i>	ATCC 27215	—	—
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus sp.</i>	MRA1 (5)	—	+
	<i>Aerococcus viridans</i>	IFO 12219 ^T	—	+
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	MRA2 (5)	—	—
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	日乳 510	—	—
	<i>Streptococcus mutans</i>	JCM 5705 ^T	—	—
	<i>Streptococcus salivarius</i>	JCM 5707 ^T	—	—
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	JCM 5671 ^T	—	—
<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Collinsella aerofaciens</i>	JCM 10188 ^T	—	—
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	JCM 8349 ^T	—	—
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	JCM 1464 ^T	—	—
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium lacticum</i>	JCM 1379	—	—
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium kutscheri</i>	JCM 9385 ^T	—	—
	<i>Corynebacterium xerosis</i>	JCM 1971 ^T	—	—
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	JCM 6425 ^T	—	—
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	JCM 1217 ^T	—	—
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	JCM 1275 ^T	—	—
<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>	JCM 5826 ^T	—	—
<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277 ^T	—	—
<i>Prevotellaceae</i>	<i>revotella intermedia</i>	ATCC 25611 ^T	—	—
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>lavobacterium johnsoniae</i>	JCM 8514 ^T	—	—
<i>Flexibacteraceae</i>	<i>Cytophaga arvensicola</i>	JCM 2836 ^T	—	—
<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586 ^T	—	—

判定結果

- + : PCR 増幅産物を検出
- ± : PCR 増幅産物を極々わずかに検出
- : PCR 増幅産物が検出されない

注 1) *Aeromonas* 属は *Vibrionaceae* 科に属するが、近年、新しい科 *Aeromonadaceae* 科への分類変更が提唱されている。

TAXONOMIC OUTLINE OF THE PROCARYOTE GENERA BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, SECOND EDITION Release 1.0, April 2001

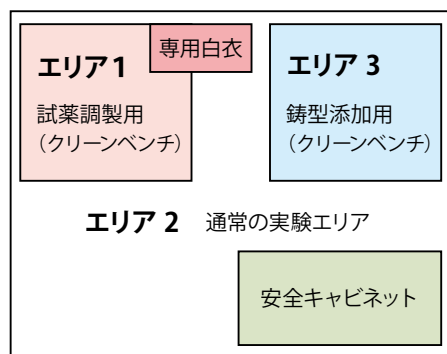
注 2) 研究用市販細菌株

注 3) DNA purchased from Nissui Co., Ltd. (Tokyo, Japan) (ATCC 43889 と ATCC 43890 の混合物)

注 4) *Pseudoramibacter alactolyticum* に再分類された。
Clin Infect Dis 1997 Sep; 25 Suppl 2: S78-87

注 5) MRA1 および MRA2 は日清食品 (株) 食品安全研究所分離同定株

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
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。
- エリア4：PCR 産物を取扱うエリア
PCR 後の増幅産物を電気泳動する場合は、エ
リア1、2、3 とは異なる別室で行う。

IX. 参考文献

- 1) 船曳健一、仲野茂ら 第22回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集(2001) pp 90.
- 2) 船曳健一、仲野茂ら 日本食品化学学会第8回総会学術大会講演要旨集(2002) pp 50.
- 3) 小林徹、仲野茂ら 日本食品化学学会第8回総会学術大会講演要旨集(2002) pp 51.
- 4) Kobayashi, K., Tagami, M., and Seko, K. *Kansenshogaku Zasshi*. (1994) **68**: 1203-1210.
- 5) Rupf, S., Merte, K., and Eschrich, K. *J Dent Res*. (1999) **78**: 850-856.
- 6) Wang, R.-F., Cao, W.-W., and Cerriglia, C. E. *J Appl Microbiol*. (1997) **83**: 727-736.
- 7) 山田敏広 食品と開発(2002) 37 (No.10), pp7-9.

参考資料

本製品の応用例をウェブカタログで公開していますのでご覧ください。ウェブカタログページ (<https://www.takara-bio.co.jp/>) より、製品コード RR114A で検索してください。

X. 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。
- ・本製品は日清食品株式会社のライセンスを受け、タカラバイオ株式会社が製造・販売しています。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。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、*Thermal Cycler Dice* はタカラバイオ株式会社の、*SYBR* は Life Technologies Corporation の登録商標です。*PrimeGel* 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