

製品コード RR134A

食品・環境分析用

Takara

Campylobacter (cdt gene)
PCR Detection and Typing Kit

説明書

v201901Da

カンピロバクターによる食中毒の発生件数は近年増加の傾向にあり、主要な食中毒原因菌のひとつとして注目されています。カンピロバクター属菌は酸素が3～10%の微好気条件下で増殖する螺旋状グラム陰性細菌です。カンピロバクターが引き起こす主たる症状は腸炎ですが、その原因菌の約90%が *Campylobacter jejuni* (以下 *C. jejuni*) であり、数%が *Campylobacter coli* (以下 *C. coli*) と言われています。また、*Campylobacter fetus* (以下 *C. fetus*) は、敗血症や髄膜炎などの検査材料からも分離されており、これらの病態の原因菌の一つと考えられています。このように菌種によって症状が異なることから、菌の検出と合わせて菌種の同定も非常に重要とされています。現在、カンピロバクターの検出・同定は培養法によって行われていますが、菌の増殖が遅いため前培養で最低2日かかり、さらに数日間の菌種同定培養試験が必要なため、カンピロバクターの確実な菌種同定には1週間程度を要します。そのため、PCR法等の遺伝子検出技術を応用した迅速な検出・同定法が待ち望まれていました。

本キットは、カンピロバクター属菌が保有する Cytolethal distending toxin 遺伝子 (*cdt* genes) の B サブユニット遺伝子 (*cdtB* gene) または C サブユニット遺伝子 (*cdtC* gene) をターゲットとして、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の3菌種を特異的かつ迅速にPCRで検出・同定できます。カンピロバクター属菌の中には、まれに *cdtB* gene や *cdtC* gene に欠損や変異を持つ菌株が存在するので、検出精度を高める目的で、*cdtB* gene と *cdtC* gene の2つの遺伝子の増幅検出を行います。本キットの増幅には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version を使用しており、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能です。

本キットの製品化にあたりましては、大阪府立大学および扶桑薬品工業株式会社のご協力をいただきました。

I. 内容 (50 µl 反応系、100 回用*1)

1. <i>Premix Ex Taq</i> ™ HS*2 (2 × conc.)	500 µl × 5
2. <i>cdtB</i> Primer Mix	250 µl
3. <i>cdtC</i> Primer Mix	250 µl
4. dH ₂ O	1 ml × 3
5. <i>C. jejuni</i> Positive Control	150 µl
6. <i>C. coli</i> Positive Control	150 µl
7. <i>C. fetus</i> Positive Control	150 µl

*1 : *cdtB* 遺伝子検出 50 反応、*cdtC* 遺伝子検出 50 反応用

*2 : *TaKaRa Ex Taq* HS、反応 Buffer、dNTP mixture を含む 2 倍濃度の PCR 反応試薬です。凍結融解の繰り返しにより活性が低下する恐れがあるため、融解後は PCR 用のチューブに 25 µl ずつ小分けして -20℃ で保存してください。

II. 保存 - 20℃

III. 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. 滅菌精製水
2. アガロースゲル
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve（製品コード 5810A）
3. 電気泳動用 buffer
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3（製品コード T9131）
または TBE (Tris-borate-EDTA) powder（製品コード T905）
4. DNA マーカー
100 bp DNA Ladder（製品コード 3407A/B）
5. Loading buffer (6 × :36% glycerol, 0.05% bromophenol blue, 0.035% xylene cyanol, 30 mM EDTA) (4. に記載の DNA マーカーには添付されている。)
6. 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. ヒートブロック (95℃まで温度を上げられるもの)
2. 1.5 ml チューブ対応型冷却遠心機
3. 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）
4. 電気泳動装置
Mupid-2plus（製品コード M-2P）
Mupid-exU（製品コード EXU-1）
5. 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。)

【その他】

1. 0.2 ml PCR チューブ
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap（製品コード NJ200）など
2. 200 μ l、20 μ l、10 μ l 各マイクロピペット
3. マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

IV. 使用に際して

- 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。

V. 操作上の注意

- 1) サーマルサイクラーの取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
- 2) 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。
- 3) 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 (IX. 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. 食品、便、土壌や水などの環境由来検体の調製 (エリア2で実施)

増菌培養後、分離培養法を組み合わせ、菌を回収した後、PCR を行う場合

- (1) 検体を培地等に直接懸濁する、もしくはストマッカー等を用いて等量揉み出し液を作製する。
- (2) 得られた処理液を10倍量のボルトン培地もしくはプレストン培地に加え、37℃、24～48時間、微好気条件下 (5% O₂、10% CO₂、85% N₂) で増菌培養を行う。
- (3) 増菌培養液 100 μl をスキロー寒天培地等の選択培地、もしくはフィルター法 [血液寒天上に滅菌用メンブレンフィルター (孔径 0.45 μm) を置き、その上に増菌培養液を広げる。30分間室温で静置した後、フィルターを取り除き、培養する] にて 37℃、48時間、微好気条件下 (5% O₂、10% CO₂、85% N₂) で分離培養を行う。
- (4) プレート (スキロー寒天培地など) 上のコロニーから、滅菌済み白金耳などで微量の菌体を取り、TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0) に懸濁する。このときの菌濃度は濁度 (600 nm) で約 0.1 を目安に調製する。
- (5) 95℃で10分間、熱処理する。
- (6) 15,000 rpm、10分間遠心して得られた上清を熱抽出サンプルとする。

増菌培養液もしくは検体から PCR を行う場合

- (1) 増菌培養液もしくは検体の懸濁液を軽く遠心 (1,200 rpm、5分間) し、残渣を取り除いた後、15,000 rpm、10分間遠心する。
- (2) 得られた沈殿に適量の TE buffer を加え、95℃で10分間熱処理する。
- (3) 15,000 rpm、10分間遠心して得られた上清を熱処理サンプルとする。もしくは NucleoSpin Tissue を用いて DNA を抽出し、PCR テンプレートとする。

VII. PCR 反応液調製と反応

(1) 反応液調製・反応条件

正しい検出結果を得るために Negative control 反応と Positive control 反応を一緒に行ってください。

- 1) 必要本数分 (サンプル数 + Negative control + Positive control + α) の下記のマスターミックスを氷上にて調製する (エリア 1 で実施)。
マスターミックスを 45 μ l ずつ分注し、その内の 1 本に Negative control として 5 μ l の滅菌精製水を加え、しっかりふたをする。

試薬	1 反応分
Premix Ex Taq HS	25 μ l
<i>cdtB</i> Primer Mix or <i>cdtC</i> Primer Mix	5 μ l
滅菌精製水	15 μ l
Total	45 μ l

- 2) Positive control 反応として各 Positive control を 5 μ l 添加したものを準備する。Negative control 以外の各チューブに調製した抽出サンプルを 5 μ l 添加し、しっかりふたをする (エリア 3 で実施)。

【PCR 条件】

94°C	30 sec.	} 30 ~ 40 cycles
55°C	30 sec.	
72°C	30 sec.	

- ※ 反応は約 2 時間で終了する。反応後のサンプルは 4°C、または -20°C で保存可能です。

(2) 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、PrimeGel Agarose PCR-Sieve を 3% (w/v) 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、アガロース溶液が均一に溶解していることを確認する。均一に溶解するまで加熱・攪拌を繰り返す。
- 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溶液を注ぎ、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 に冷めたら最終濃度 0.5 μ g/ml になるようにエチジウムブロマイド水溶液を加え、均一になるように穏やかに攪拌した後、ゲル板に注ぎ、サンプルを注入するためのスロットを作製するためにコームを差し込み、30 分 ~ 1 時間室温放置してゲルを充分に固める。

- 5) ゲルが破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。
- 6) アガロースゲルを泳動槽にセットし、ゲルが充分つかるまで電気泳動 buffer を泳動槽に加える。

(3) 電気泳動 (エリア 4 で実施)

- 1) 電極を +、- を間違えないように接続する。(PCR で増幅した核酸は負に荷電しており、- → + に泳動される。)
- 2) PCR 反応終了後の各反応液 5 μ l に 1 μ l の 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 マーカーを適当量注入する。)
- 3) 50 ~ 150 V の定電圧をかけ、bromophenol blue (速く泳動する色素) がコームから 3 ~ 4 cm に移動するまで電気泳動する。

(4) 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) のみで良い)

- 1) ゲルが充分浸せる量の 1 μ g/ml のエチジウムブロマイド水溶液、または SYBR Green I 溶液 (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、増幅産物のバンドの有無とサイズを確認する。
* : SYBR Green I 溶液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 溶液を扱う場合、およびこれら DNA 染色剤で染色したゲルを扱う場合は、必ず手袋を着用し、直接液が触れないようにご注意ください。

(5) 使用上の注意

本製品にはインターナルコントロールが含まれておりません。
そのため、サンプルの調製法によっては、PCR 反応阻害により検出できない場合があります。(偽陰性判定)
このような判定を避けるため、ネガティブコントロールとして、あらかじめカンピロバクター属菌陰性とわかっているサンプルより、採用したサンプル調製法と同じ方法で陰性熱抽出サンプルを調製し、そのサンプルが PCR 反応阻害を起こさないことを事前に確認しておくことをお勧めします。
(操作例：陰性熱抽出サンプル 5 μ l と Positive Control 5 μ l を加えて Positive Control 由来増幅産物サイズの増幅産物が得られることを確認する。)
サンプルが陰性と判定された場合は、サンプル他の微生物検出方法の結果とも照らし合わせて判定してください。

VIII. 判定

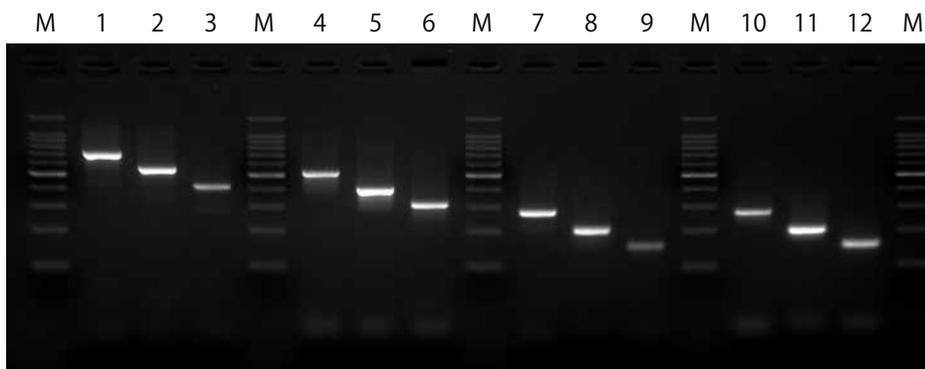
PCR 反応による各増幅産物の大きさは、以下の通りです。

cdtB Primer Mix による PCR 反応による各増幅産物の大きさ (*cdtB* 遺伝子)

菌種	サンプル (各ゲノム DNA) 由来増幅産物	各 Positive Control 由来 増幅産物
<i>C. jejuni</i>	714 bp	274 bp
<i>C. fetus</i>	553 bp	203 bp
<i>C. coli</i>	413 bp	153 bp

cdtC Primer Mix による PCR 反応による各増幅産物の大きさ (*cdtC* 遺伝子)

菌種	サンプル (各ゲノム DNA) 由来増幅産物	各 Positive Control 由来 増幅産物
<i>C. jejuni</i>	524 bp	274 bp
<i>C. fetus</i>	397 bp	202 bp
<i>C. coli</i>	313 bp	154 bp



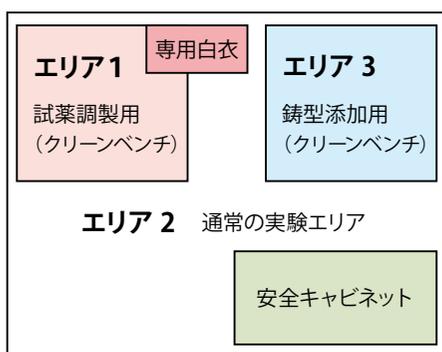
レーン	使用プライマー	使用鋳型	鋳型使用量	増幅サイズ
1	<i>cdtB</i> Primer Mix	<i>C. jejuni</i> ゲノム DNA	5 pg	714 bp
2		<i>C. fetus</i> ゲノム DNA		553 bp
3		<i>C. coli</i> ゲノム DNA		413 bp
4	<i>cdtC</i> Primer Mix	<i>C. jejuni</i> ゲノム DNA		524 bp
5		<i>C. fetus</i> ゲノム DNA		397 bp
6		<i>C. coli</i> ゲノム DNA		313 bp
7	<i>cdtB</i> Primer Mix	<i>C. jejuni</i> Positive Control	5 μ l	274 bp
8		<i>C. fetus</i> Positive Control		203 bp
9		<i>C. coli</i> Positive Control		153 bp
10	<i>cdtC</i> Primer Mix	<i>C. jejuni</i> Positive Control		274 bp
11		<i>C. fetus</i> Positive Control		202 bp
12		<i>C. coli</i> Positive Control		154 bp
M	100 bp DNA Ladder			

【判定について】

- Negative control 反応において増幅産物が得られていないことを確認してください。もし上記サイズの増幅産物が得られている場合、コンタミネーションを起していると考えられます。反応液調製場所および使用した機器を除染したうえですべてのサンプルで再度反応を行ってください。
- Positive control 反応において、各 Positive Control 由来増幅産物サイズの増幅産物が得られていることを確認してください。正しいサイズの増幅産物が得られなかった場合、何らかの理由で PCR 反応が進まなかったことが考えられます。理由としては、機器の不調、試薬調製の不備、試薬の劣化等が挙げられます。再度反応を行ってください。
- Negative control 反応、Positive Control 反応の結果が正しく得られた場合において、*cdtB* または *cdtC* 遺伝子のどちらか一方でもサンプル（各ゲノム DNA）由来増幅産物が得られた場合、サイズに該当する菌種を検出したこととなります。
- Negative control 反応、Positive Control 反応の結果が正しく得られた場合において、熱抽出サンプルを用いて反応した結果、該当サイズ増幅産物が得られなければ、陰性（検出限界以下）であると判定します。

注意：検出されるべき菌種が存在する検体から調製した熱抽出サンプルに PCR 阻害物質が含まれている場合も該当サイズ増幅産物が得られないことがあり、陰性と判定をしてしまうことがあります（偽陰性判定）。このような判定結果を免れるため、陰性と判断された場合、熱抽出サンプルに 3 種類のうちのいずれかの Positive Control (5 μ l) を加えて PCR を行い、Positive Control 由来増幅産物サイズの増幅産物が得られることを確認してください。目的サイズの増幅産物が得られない場合、サンプルに PCR 阻害物質が含まれていることが考えられます。その場合、再反応およびサンプルの再調製をお勧めします。

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
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。

X. 参考文献

- 1) Worada Samosornsuk, *et al. Microbiol Immunol.* (2007) **51**(9): 909-917.
- 2) Asakura, M., *et al. Microb Pathog.* (2007) **42**: 174-183.

XI. 関連製品

100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50X Powder, pH8.3 (製品コード T9131)
TBE (Tris-borate-EDTA) powder (製品コード T905)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)
NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)

XII. 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、扶桑薬品工業株式会社および公立大学法人大阪府立大学よりライセンスを受け、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。*Premix Ex Taq*、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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社