

製品コード RR191A

検便検査用

TaKaRa

TaKaRa カンピロバクター /
腸炎ビブリオ遺伝子検出キット

説明書

v202309Da

本製品はプローブを用いるリアルタイム PCR により、検便検体からカンピロバクター (*Campylobacter jejuni*、*Campylobacter coli*) と腸炎ビブリオの遺伝子を検出するキットです。検出対象遺伝子は、*cdtB* 遺伝子 (カンピロバクター) と *toxR* 遺伝子 (腸炎ビブリオ) で、PCR 阻害の有無を確認するためのインターナルコントロールも同時に検出します。

【特長】

- ・高速 PCR 試薬の採用により、約 40 分 (Thermal Cycler Dice® Real Time System III 使用の場合) で結果が得られます。
- ・カンピロバクターと腸炎ビブリオをマルチプレックス PCR により 1 反応で検出します。
- ・プローブ検出法を採用しており、カンピロバクターと腸炎ビブリオを明確に区別し、それぞれを異なる蛍光で検出可能です。
- ・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】

検出対象菌種	検出対象遺伝子	プローブ標識
<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter coli</i>	<i>cdtB</i> 遺伝子	Cyanine5 / Dark Quencher
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i> 遺伝子	ROX / Dark Quencher
(PCR 阻害の有無の確認)	インターナルコントロール	FAM / Dark Quencher

※ 本製品は、大阪公立大学獣医国際防疫学教室とタカラバイオ株式会社の共同研究によって開発されました。

I. 内容 (100 回分)

● Probe qPCR Mix-UNG 2* ¹	2 ×	1.25 ml
● Primer/Probe Mix (<i>cdt/toxR</i>)* ²	5 ×	500 μl
○ H ₂ O		1 ml
● Positive Control Mix (<i>cdt/toxR</i>)* ³		30 μl

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

* 2：遮光に留意してください。

* 3：他の試薬へのコンタミネーションに留意してください。

II. 保存 -20℃

III. 本製品以外に必要な器具、機器（主なもの）

【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】

- ・ 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（製品コード TP1000/TP1010/TP1030）

Thermal Cycler Dice Real Time System III (Cy5) with PC（製品コード TP990）

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）

※ TP900/TP960/TP700/TP760 は、Cy5 オプションフィルターの追加が必要です。

Filter Unit (Cy5) for Thermal Cycler Dice Real Time System（製品コード TP803）*

Filter Unit(Cy5) for LED（製品コード TP703）

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）

*：詳細は弊社までお問い合わせください。

IV. 使用に関して

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 および 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。
(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、または適切な濃度の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-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. Probe qPCR Mix-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. Primer/Probe Mix (cdt/toxR) 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でない場合、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、解析パラメーターの Manual 設定を行ってください。

VI. 操作

1. 検便懸濁液の調製例 (エリア 2 で実施)

便検体を生理食塩水や PBS、蒸留水等に 5 ~ 10% 濃度となるように懸濁する。

2. 前処理例 (エリア 2 で実施)

- 1) 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℃、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℃、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 の鑄型として使用する (3. リアルタイム PCR 反応のステップ 2)。

[注意]

- ・ 前処理後のサンプルの保存はお勧めしません。
- ・ 上記の方法は参考情報です。リアルタイム PCR の鑄型調製方法については必ず各施設において確認および検証を行ってください。

3. リアルタイム PCR 反応

【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 を鑄型とした反応を「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 Positive Control Mix (cdt/toxR) を鑄型とした反応を「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 23 μ l 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。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix-UNG 2	12.5 μ l
● Primer/Probe Mix (cdt/toxR)	5.0 μ l
○ H ₂ O	5.5 μ l
Total	23.0 μ l

※ 反応液の調製は室温で実施可能です。

※ 調製済の反応液を保存する際には、4℃での保存をお勧めします。

- 2) サンプル (または ● Positive Control Mix (cdt/toxR) または ○ H₂O) 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。

◆ Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの場合

< Hold >

(25°C 10分)*

95°C 30秒

< PCR：5 サイクル >

95°C 5秒

60°C 21秒

< PCR：40 サイクル >

90°C 1秒

60°C 21秒 (蛍光検出：FAM/ROX/Cy5)

※ 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>)。

◆ CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System、LightCycler 96 システム、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System の場合

< Hold >

(25°C 10分)*

95°C 30秒

< PCR：5 サイクル >

95°C 5秒

60°C 20秒

< PCR：40 サイクル >

90°C 1秒

60°C 20秒 (蛍光検出：FAM/ROX(Red610)/Cy5)

*：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。

4. 判定

【検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター】

検出対象菌種	検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter coli</i>	<i>cdtB</i> 遺伝子	Cy5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i> 遺伝子	ROX (Red610)
(PCR 阻害の有無の確認)	インターナルコントロール	FAM

【コントロール反応の確認】

	PCR の鑄型	IC	<i>cdtB</i>	<i>toxR</i>
陽性コントロール	Positive Control Mix (<i>cdt/toxR</i>)	+/-	+	+
陰性コントロール	H ₂ O	+	-	-

- ・ 陽性コントロールで *cdtB* 遺伝子、*toxR* 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 *cdtB* 遺伝子、*toxR* 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	<i>cdtB</i>	<i>toxR</i>	判定
+/-	+	-	<i>Campylobacter jejuni</i> または <i>Campylobacter coli</i> 陽性
+/-	-	+	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 陽性

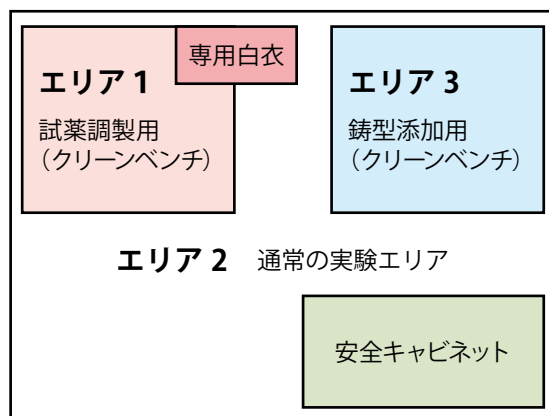
- ・ *cdtB* 遺伝子、*toxR* 遺伝子が検出された場合は、IC の検出の有無に関わらず、陽性判定となる。

<陰性検体の例>

IC	<i>cdtB</i>	<i>toxR</i>	判定
+	-	-	陰性
-	-	-	判定不能

- ・ *cdtB* 遺伝子、*toxR* 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、陰性判定となる。
- ・ 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。

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。
(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：高濃度核酸を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型の添加を行う。

VIII. 関連製品

TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット Ver.4 (製品コード RR177A)
TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット (4 波長) (製品コード RC140A)
TaKaRa 腸管系病原細菌遺伝子検出キット (3 波長) (製品コード RC144A)
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)

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。
- ・ 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