

製品コード RR241A

食品・環境分析用

---

**Takara**

**Enterobacteriaceae (*rpIP* gene)  
Quantitative PCR Kit**

---

説明書

v202203Da

本製品は、リアルタイム PCR により *rplP* (50S ribosomal protein L16) 遺伝子を検出対象として腸内細菌科菌群を検出および定量するためのキットです。4 日以上の日数を要する培養法に比べて迅速に結果を得ることができ、食品・環境分野の自主管理等に有用です。

### リアルタイム PCR 法について

リアルタイム PCR は、PCR 増幅の過程を蛍光物質によりリアルタイムでモニタリングする迅速性と定量性に優れた遺伝子検出法です。本製品に含まれる TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC は、インターカレーター法によるリアルタイム PCR 試薬で、GC 含量が高い配列でも良好に増幅できるため広範な細菌種の検出に適しています

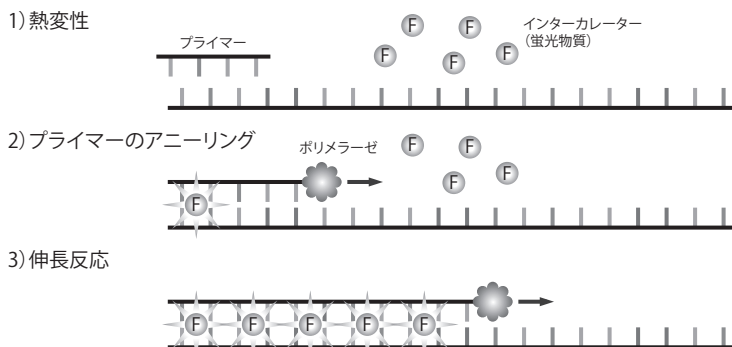


図 1. インターカレーター法の原理

二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬 (インターカレーター ; TB Green など) を反応液に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。PCR 反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。

※ 本キットの開発には、東京海洋大学 木村凡先生、高橋肇先生にご協力いただきました。

---

## I. 内容 (25 $\mu$ l 反応系、100 回分)

1. TB Green <i>Premix Ex Taq</i> GC* <sup>1</sup>	2 $\times$ conc.	625 $\mu$ l $\times$ 2
2. rplP Primer Mix	5 $\times$ conc.	250 $\mu$ l $\times$ 2
3. dH <sub>2</sub> O		1 ml
4. ROX Reference Dye* <sup>2</sup>	50 $\times$ conc.	50 $\mu$ l
5. ROX Reference Dye II* <sup>2</sup>	50 $\times$ conc.	50 $\mu$ l
6. rplP Positive Control	1 $\times$ 10 <sup>5</sup> copies/ $\mu$ l	100 $\mu$ l
7. EASY Dilution (for Real Time PCR)		1 ml $\times$ 2

\* 1 : *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS、dNTP Mixture、Mg<sup>2+</sup>および TB Green を含む。

\* 2 : Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

- ◆ ROX Reference Dye (50 $\times$ ) を添加する機種
  - StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- ◆ ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) を添加する機種
  - 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- ◆ 添加の必要がない機種
  - Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> 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)

## II. 保存

### TB Green *Premix Ex Taq* GC (Package1)

4 $^{\circ}$ C 保存 : 6 ヶ月安定 (長期保存は - 80 $^{\circ}$ C)

必ず遮光して保存してください。また、4 $^{\circ}$ C 保存する場合には、コンタミネーションに十分注意してください。

※ 長期保存する際は、- 80 $^{\circ}$ C で保存してください。(- 20 $^{\circ}$ C 保存は避けてください。) いったん融解したものは 4 $^{\circ}$ C で保存し、6 ヶ月を目処にご使用ください。

### その他のコンポーネント (Package2)

- 20 $^{\circ}$ C 保存

---

### III. キット以外に必要な機器、試薬（主なもの）

#### 【サンプル懸濁液調製に必要なもの】

BPW（ペプトン水）  
ストマッカーおよびストマッカー袋

#### 【DNA 抽出に必要なもの】

NucleoSpin Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）  
特級エタノール（> 99%）  
ヒートブロック（56℃および 70℃で使用可能なもの）  
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）  
微量高速遠心機

#### 【リアルタイム PCR に必要なもの】

リアルタイム PCR 装置および専用チューブ  
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）  
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）  
StepOnePlus Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）など  
卓上遠心器  
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）

---

## IV. 使用上の注意

本キット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。

### 【使用に際して】

1. 使用目的：本キットは食品・環境分析に使用する製品です。
2. 測定結果：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。
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 分以上加熱滅菌処理、または 2.5% 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、ろ紙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。

### 【操作上の注意】

1. TB Green *Premix Ex Taq* GC は、泡立てないように緩やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬組成に偏りがあると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、TB Green *Premix Ex Taq* GC を -80℃で保存した場合、保存中に白色～黄白色の沈殿が生じることがあります。軽く手で温めるか、遮光して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。沈殿が生じたままでは、試薬組成に偏りができますので、必ず均一に混合してからご使用ください。
2. 反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。
3. TB Green *Premix Ex Taq* GC は、インターカレーター (TB Green) を含んでいます。反応液調製時に強い光を当てないように注意してください。
4. 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 (VIII. 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。

本キット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。

## V. 操作

### 操作の概要

#### サンプル懸濁液の調製

検体 10 g + BPW (ペプトン水) 90 ml

↓  
ストマッカー処理

#### DNA 抽出

試料原液 1 ml (検体 0.1 g 相当量) を 8,000 × g で 5 分遠心し、上清を除去する。

↓  
NucleoSpin Tissue による DNA 抽出 (最終液量 100 μl)

#### リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

rpIP Positive Control を段階希釈し、検量線作成用スタンダードを調製する。

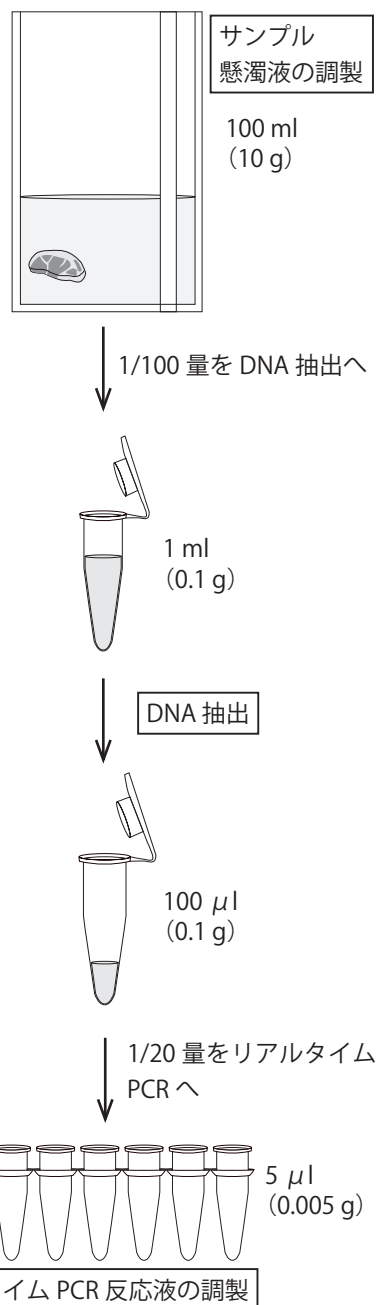
↓  
反応液を調製する。

↓  
反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール、検量線作成用スタンダード、または検体サンプル 5 μl (検体 0.005 g 相当量) を添加する。

↓  
反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。

#### 定量解析

リアルタイム PCR 装置の解析ソフトにより、検量線から検体サンプルの定量結果が算出される。



---

## V-1. サンプル懸濁液の調製 (エリア 2 で実施)

検体 10 g に 90 ml の BPW (ペプトン水) を加え、必要に応じてストマッカー処理等を行ったものを試料原液とする。

1. 検体を 10 g 秤量し、ストマッカー袋等へ移す。
2. 検体の 9 倍量に相当する 90 ml の BPW を加える。
3. 必要に応じてストマッカー等を用いてホモジネートしたものを試料原液とする。

※ 培養法による菌数測定を並行して行う場合には、上記の方法で調製したサンプル懸濁液を 10℃、2 時間培養することにより損傷菌が回復し、より正確な菌数測定が可能になります。

## V-2. DNA 抽出 (エリア 2 で実施)

試料原液 1 ml を 8,000 × *g* で 5 分間遠心し、上清を除去する。NucleoSpin Tissue の細菌用プロトコールに従って DNA 抽出を行い、100 μl で溶出する。

1. 試料原液 1 ml を 1.5 ml マイクロチューブに分取する。
2. 8,000 × *g* で 5 分間遠心し、上清を除去する。
3. 180 μl の Buffer T1、25 μl の Proteinase K\*<sup>1</sup> 溶液を細菌のペレットに添加し、激しく攪拌する。
4. 56℃で 1 ~ 3 時間 (または一晩) 完全に溶解するまでインキュベートする。
5. サンプルを攪拌する。Buffer B3 を 200 μl 加えて、激しく攪拌した後、70℃で 10 分間インキュベートする。不溶物が残る場合は、11,000 × *g*、5 分間遠心し、上清を新しいチューブに移す。
6. エタノール (> 99%) を 210 μl 添加し、よく混合する。
7. NucleoSpin Tissue Column を Collection Tube にセットする。6. の溶液をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。ろ液を捨てた後、新しい Collection Tube にカラムをセットする。
8. 1 回目の洗浄 :  
500 μl の Buffer BW をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。  
ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。  
2 回目の洗浄 :  
600 μl の Buffer B5\*<sup>2</sup> をカラムに添加し、11,000 × *g*、1 分間遠心する。  
ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
9. カラムを 11,000 × *g*、1 分間遠心する。
10. カラムを 1.5 ml マイクロチューブ (各自で用意) にセットする。70℃に温めた Buffer BE を 100 μl 加え、室温で 1 分間インキュベートした後、11,000 × *g*、1 分間遠心する。溶出した DNA 溶液は 4℃で保存する。(長期保存の場合は - 20℃で保存し、凍結融解はできるだけ繰り返さない。)

\* 1 : Proteinase K 溶液の調製法

製品コード 740952.10 の場合 :

Proteinase K (凍結乾燥品) 6 mg に Proteinase Buffer PB を 260 μl 加えて完全に溶解する。調製した Proteinase K 溶液は、- 20℃で保存する (6 カ月安定)。

\* 2 : Buffer B5 の調製法

製品コード 740952.10 の場合 :

Wash Buffer B5 (concentrate) 4 ml に、エタノール (96 ~ 100%) 16 ml を添加する。

### V-3. リアルタイム PCR

V-2. で調製した DNA 溶液の内、5  $\mu$ l を鋳型としてリアルタイム PCR を行う。同時に検量線作成用スタンダードの反応を実施する。

#### 1. 検量線作成用スタンダードの調製 (エリア 3 で実施)

rpIP Positive Control を EASY Dilution で段階希釈し、検量線作成用スタンダードとする。(リアルタイム PCR には、1 反応当たりそれぞれ 5  $\mu$ l を使用する。)

- (1)  $1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ l (rpIP Positive Control 原液)
- (2)  $1 \times 10^4$  copies/ $\mu$ l (rpIP Positive Control 原液 5  $\mu$ l + EASY Dilution 45  $\mu$ l)
- (3)  $1 \times 10^3$  copies/ $\mu$ l (2. の  $1 \times 10^4$  copies/ $\mu$ l 溶液 5  $\mu$ l + EASY Dilution 45  $\mu$ l)
- (4)  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ l (3. の  $1 \times 10^3$  copies/ $\mu$ l 溶液 5  $\mu$ l + EASY Dilution 45  $\mu$ l)

リアルタイム PCR を実施する際に、スタンダードの値を copies/g の単位で入力しておく、反応終了後、定量値を検体 1 g 当りのコピー数として得ることができる。(定量の原理等については「VI. 定量解析」の項を参照)

表 1. copies/tube と copies/g の対応表

	copies/tube (1 反応当りのコピー数)	copies/g (検体 1g 当りのコピー数)
1	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^8$
2	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^7$
3	$5 \times 10^3$	$1 \times 10^6$
4	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^5$

#### 2. 反応液の調製 (エリア 1 で実施)

下記に示す反応液を氷上で調製する。

鋳型以外のコンポーネントを必要本数 +  $\alpha$  分調製し、各反応チューブに 20  $\mu$ l ずつ分注して軽くキャップをしめる。その内の 1 本に陰性コントロールとして dH<sub>2</sub>O を 5  $\mu$ l 加え、反応チューブのキャップをしっかりと閉める。

< Thermal Cycler Dice Real Time System の場合 >

[1 反応あたり]

試薬	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> GC (2 $\times$ conc.)	12.5 $\mu$ l
rpIP Primer Mix (5 $\times$ conc.)	5.0 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	2.5 $\mu$ l
鋳型	(5.0 $\mu$ l)
Total	25.0 $\mu$ l

< Thermo Fisher Scientific 社のリアルタイム PCR 装置の場合 >

[1 反応あたり]

試薬	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> GC (2 $\times$ conc.)	12.5 $\mu$ l
rpIP Primer Mix (5 $\times$ conc.)	5.0 $\mu$ l
ROX Reference Dye or ROX Reference Dye II*	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	2.0 $\mu$ l
鋳型	(5.0 $\mu$ l)
Total	25.0 $\mu$ l

\* : StepOnePlus には ROX Reference Dye を、7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を使用する。



---

### 3. 鋳型 (DNA 溶液) の添加 (エリア 3 で実施)

2. で分注した反応液に、検体 DNA 溶液や検量線作成用スタンダード等の鋳型を 5  $\mu$ l 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉める。  
蛍光測定を行うため、チューブに汚れが付かないよう注意し、キャップを閉めるときは手袋を着用する。0.2 ml チューブ用の卓上遠心器で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

### 4. リアルタイム PCR 反応の開始

以下の PCR 条件でリアルタイム PCR を実施する。

※リアルタイム PCR 装置の操作方法は、各機種取扱説明書をご参照ください。

初期変性  
95°C 30 秒  
2 Step PCR  
35 サイクル  
95°C 5 秒  
60°C 30 秒 (蛍光検出: FAM)  
融解曲線分析

## VI. 定量解析

### VI-1. 定量の原理

#### rplP Positive Control について

本製品に含まれる rplP Positive Control は、*rplP* 遺伝子の該当領域を搭載したプラスミド DNA であり、OD<sub>260</sub> 値より換算した値で  $1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ l に調整されています。段階希釈物を検量線作成用スタンダードとして使用し、定量解析を行うことができます。  
(ただし、本キットは遺伝子検出用キットであるため、死菌の遺伝子も検出されます。正確な生菌数が必要な場合は、培養法による検査も行う必要があります。)

#### 検体 1 g 当りのコピー数への換算

本説明書に従って操作すると、リアルタイム PCR へは検体 0.005 g 相当量を使用することになりますので、その値を 200 倍すると検体 1 g 当りのコピー数となります。

検体 10 g + 希釈水 90 ml

↓ ストマッカー処理

試料原液 1 ml (検体 0.1 g 相当量)

↓ DNA 抽出

DNA 溶液 100  $\mu$ l (検体 0.1 g 相当量)

↓ 1/20 をリアルタイム PCR へ

リアルタイム PCR に使用 5  $\mu$ l / 反応 (検体 0.005 g 相当量)

## VI-2. 定量解析の手順

検体 1 g 当りのコピー数として定量する方法 (標準)

1. スタンダードの値を copies/g 単位で入力する。
2. 定量結果は、検体 1 g 当りのコピー数 (copies/g) として表示される。

1 反応当りのコピー数として定量し、検体 1 g 当りのコピー数に換算する方法 (オプション)

1. スタンダードの値を copies/tube 単位で入力する。
2. 定量結果は、1 反応当りのコピー数 (copies/tube) として表示される。
3. 検体 1 g 当りのコピー数 (rPLP Positive Control 相当数) を算出する。  
定量値 × 200 = 検体 1 g 当りのコピー数 (copies/g)

## VI-3. コピー数と菌数の相関について

### 純培養菌の場合

以下の 5 種類の菌株を TSB 培地で一晚培養し、生理食塩水でそれぞれ段階希釈して TSA 培地への塗沫培養により生菌数を求めた。また、各希釈段階の菌液 1 ml を分取し、本説明書に従いリアルタイム PCR 解析を実施した。

供試菌株

- *Proteus mirabilis* JCM 1669
- *Klebsiella pneumoniae* IAM 1063
- *Citrobacter freundii* IAM 12471
- *Enterobacter aerogenes* IAM 1183
- *Escherichia coli* IAM 1137

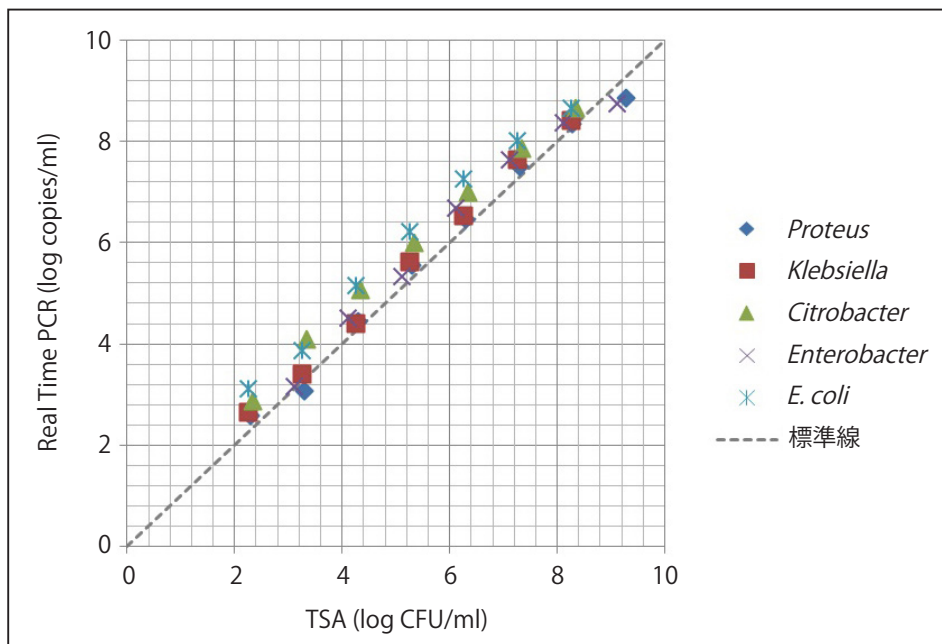


図2. コピー数と菌数の相関 (純培養菌)

TSA 塗沫培養の結果 (菌数; CFU/ml) を横軸に、リアルタイム PCR の結果 (コピー数; copies/ml) を縦軸にプロットした。TSA 塗沫培養とリアルタイム PCR の結果はよく相関し、コピー数の方がわずかに高めに算出される傾向にあったが、その差異はほぼ 1 オーダー以内に収まった。

## 実検体の場合

肉類 6 種、野菜類 5 種、サラダ類 5 種につき、生理食塩水または BPW を用いて 10% 懸濁液を調製し、VRBG 混釈培養 (37℃、48 ~ 96 時間) による菌数測定と本製品によるリアルタイム PCR 解析を実施した。

表 2. コピー数と菌数 (実検体)

	qPCR [log copies/g]	VRBG [log CFU/g]
鶏挽き肉	3.44	2.74
手羽先肉	5.03	4.48
手羽先肉	5.52	4.96
豚小間切れ肉	3.17	1.70
豚挽肉	3.89	2.49
牛肩ロース	3.32	1.60
かいわれ大根	6.33	4.52
かいわれ大根*	6.75	7.04
小松菜	3.59	3.09
小松菜*	3.94	4.65
もやし*	7.35	6.79
大根サラダ	5.45	3.38
大根サラダ*	3.84	3.33
オニオンサラダ	5.50	3.80
ベビーリーフ	7.12	6.58
キャベツミックスサラダ*	4.87	3.50

\* : 10% 懸濁時に BPW を使用 (その他は、生理食塩水を使用)

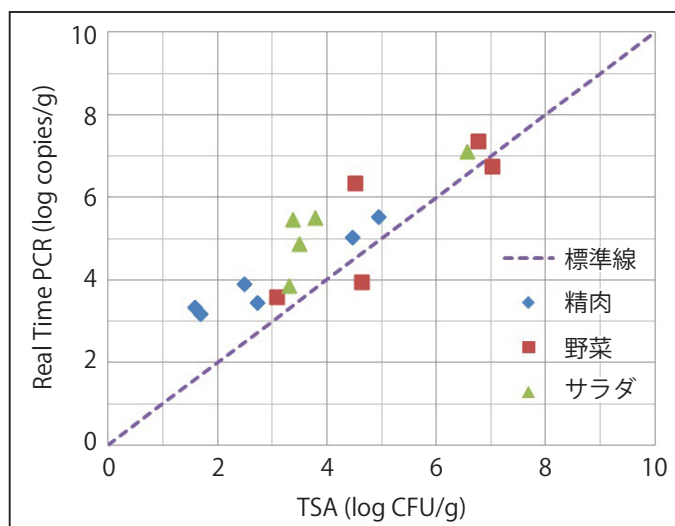


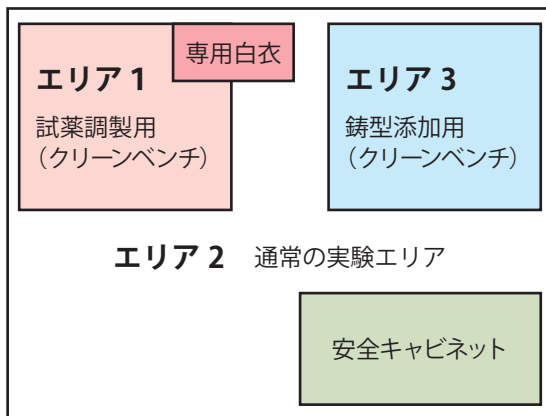
図 3. コピー数と菌数の相関 (実検体)

VRBG 混釈培養の結果 (菌数;CFU/g) を横軸に、リアルタイム PCR の結果 (コピー数;copies/g) を縦軸にプロットした。VRBG 混釈培養とリアルタイム PCR の結果はよく相関し、コピー数の方が菌数よりも 1 ~ 2 オーダー高めに算出される傾向にあった。その原因としては、VRBG は胆汁未などの選択剤を含む培地であるため、殺菌工程などで損傷を受けた細菌がうまく培養されない可能性が考えられる。そこで、10% 懸濁液調製の際に、生理食塩水の代わりに BPW を用いることにより損傷回復を試みたところ (表 2 の\*印の検体)、VRBG 混釈培養とリアルタイム PCR の結果がほぼ一致した。

## VII. 検出可能な菌種について

腸内細菌科菌群 12 種および非腸内細菌科菌群 19 種を用いて、本製品に用いられているプライマーの特異性を PCR 法により確認した結果、腸内細菌科菌群のみが検出され、非腸内細菌科菌群は検出されなかったことから、腸内細菌科菌群に特異的であることが確認されました。

## 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。  
(鑄型となる 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鑄型 DNA 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

TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A/B)  
NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)  
Bacteria (*tuf* gene) Quantitative PCR Kit (製品コード RR240A)

## 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。
- ・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。
- ・TB Green、*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*Premix Ex Taq* 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**