

製品コード RR260A

食品・環境分析用

---

**Takara**

***Kudoa septempunctata* (18S rRNA)  
qPCR Detection Kit**

---

説明書

v201712Da

---

本製品は、厚生労働省通知「*Kudoa septempunctata* の検査法について」(生食監発 0427 第 3 号) に記載のプライマー、プローブ配列で、リアルタイム PCR によりクドア・セプテンブクタータを検出するためのキットです。キットにはリアルタイム PCR 試薬の他、定量用の陽性コントロールプラスミドが添付されています。

## I. 内容 (20 $\mu$ l 反応系、50 回分)

1. <i>Premix Ex Taq</i> <sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus)	(2 $\times$ conc.)	500 $\mu$ l
2. Kudoa Primer/Probe Mix	(10 $\times$ conc.) *1	100 $\mu$ l
3. dH <sub>2</sub> O		1 ml
4. ROX Reference Dye	(50 $\times$ conc.)	20 $\mu$ l
5. ROX Reference Dye II	(50 $\times$ conc.)	20 $\mu$ l
6. Kudoa Positive Control	(2.5 $\times 10^7$ copies/ $\mu$ l) *2	50 $\mu$ l
7. EASY Dilution (for Real Time PCR)		1 ml $\times$ 2

\* 1 : 蛍光標識プローブ (FAM-TAMRA 標識) を含んでいますので、遮光に留意してください。

\* 2 : リアルタイム PCR コンポーネント (1 ~ 5) に誤って混入すると、正しい検出反応を行うことができなくなります。コンタミネーション防止に留意してください。

## II. 保存

− 20°C

*Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) は、融解後は 4°C で保存し、凍結融解を避けてください。4°C で 6 ヶ月安定です。長期保存が必要な場合は、最初の融解時に小分け分注して − 20°C 保存してください。

## III. キット以外に必要な機器、試薬 (主なもの)

- ・リアルタイム PCR 装置および専用チューブ  
Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System II (製品コード TP900/TP960)  
Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (製品コード TP700/TP760)  
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) など
- ・卓上遠心機
- ・200  $\mu$ l、20  $\mu$ l、10  $\mu$ 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き)

---

#### IV. 使用に際して

- ・本キットは遺伝子検出であるため、不活化されたクドア・セブテンプリンクタータも検出されます。また、設計した 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。  
(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。)
- ・陽性と判定された検体は、さらに微生物学的手法を用いて確認してください。

#### V. 操作上の注意

1. リアルタイム PCR 装置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、プローブや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、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。

4. 本キットはリアルタイム 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は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

※ DNA 抽出等の前処理法については、厚生労働省通知「*Kudoa septempunctata* の検査法について」(生食監発 0427 第 3 号) をご参照ください。

1. 陽性コントロール (検量線作成用スタンダード) を調製する。(エリア 3 で実施)  
Kudoa Positive Control を EASY Dilution (for Real Time PCR) で段階希釈し、 $2.5 \times 10^7$  (原液)、 $2.5 \times 10^5$ 、 $2.5 \times 10^3$ 、 $2.5 \times 10^1$  copies/ $\mu$ l の溶液を作成する (1 反応系につき 4  $\mu$ l 使用するので、反応系での最終コピー数はそれぞれ  $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^2$  になる)。
2. 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)  
検体サンプル等の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 16  $\mu$ l ずつ分注して軽くキャップを閉める。その内の 1 本に陰性コントロールとして dH<sub>2</sub>O を 4  $\mu$ 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 シリーズの場合 】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
<i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus)	10 $\mu$ l
Kudoa Primer/Probe Mix	2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	4 $\mu$ l
検体サンプル or 陽性コントロール or dH <sub>2</sub> O	(4 $\mu$ l) *1
Total	20 $\mu$ l

### 【 Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置の場合 】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
<i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus)	10 $\mu$ l
Kudoa Primer/Probe Mix	2 $\mu$ l
ROX Reference Dye or Dye II*2	0.4 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	3.6 $\mu$ l
検体サンプル or 陽性コントロール or dH <sub>2</sub> O	(4 $\mu$ l) *1
Total	20 $\mu$ l

\* 1 : 検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えません。

\* 2 : StepOnePlus には ROX Reference Dye を、7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を使用します。

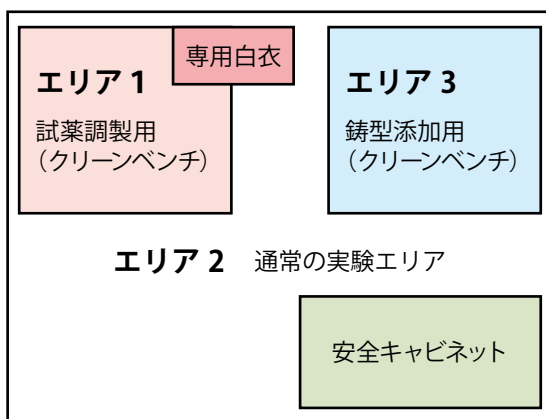
3. 鋳型 (DNA 溶液) を添加する。(エリア 3 で実施)  
2. で分注した反応液に、検体 DNA や検量線作成用スタンダード等の鋳型を 4  $\mu$ l 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉める。  
蛍光測定を行うため、チューブに汚れが付かないように注意し、キャップを閉めるときは手袋を着用する。0.2 ml チューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

4. リアルタイム PCR 反応を開始する。  
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 装置の操作法は、各機種取扱説明書をご参照ください。

初期変性  
95℃ 30 秒  
2 Step PCR  
45 サイクル  
95℃ 5 秒  
60℃ 30 秒 (蛍光検出：FAM)

5. 反応終了後、解析を行う。  
※ 解析法については、厚生労働省通知「*Kudoa septempunctata* の検査法について」  
(生食監発 0427 第 3 号) をご参照ください。

## 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 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。  
標準サンプルの希釈もここで行う。

## VIII. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード TP900/TP960)  
Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (製品コード TP700/TP760)  
Probe qPCR Mix (製品コード RR391A/B)  
EASY Dilution (for Real Time PCR) (製品コード 9160)  
NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)

## IX. 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。
- ・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 <http://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**