

製品コード RR277A

研究用

TaKaRa

TaKaRa Mycoplasma qPCR Detection Kit

説明書

2024年6月に核酸抽出キットを NucleoSpin Mycoplasma DNA (製品コード 740860.50) に変更しました。詳細は VI. 操作の章をご確認ください。

v202410Da

本製品は、細胞溶液から抽出した DNA を用いて、リアルタイム PCR によりマイコプラズマを検出するためのキットです。マイコプラズマの 16S rRNA から 23S rRNA の遺伝子領域を対象として、広範な種を検出できるようにプライマー・プローブを設計しています。また、キットに添付している Spike-in Control DNA により DNA 抽出操作の確認が可能です。

本製品は、東京医科歯科大学 再生医療研究センターの清水則夫先生が、国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST) および国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 (AMED) 再生医療実現拠点ネットワークプログラムの公的支援の下で得た研究成果に基づくものであり、清水先生とタカラバイオ株式会社との共同研究によって開発されました。

I. 内容 (96 テスト) : マイコプラズマ検出用 192 反応、Spike-in Control DNA 検出用 96 反応*1

●	1. Probe qPCR Mix	2.5 ×	960 μl × 3
②	2. Primer/Probe Mix (Myco)*2	12.5 ×	384 μl
③	3. Primer/Probe Mix (Spike-in)*2	12.5 ×	192 μl
Ⓜ	4. H ₂ O		1 ml × 2
●	5. Positive Control (Myco) (1 × 10 ⁴ copies/μl)		300 μl
●	6. PC Dilution Buffer*3		1 ml × 2
●	7. Spike-in Control DNA		1 ml

* 1 : 反応数について補足

本製品では、マイコプラズマ検出用の反応を 2 連で、Spike-in Control DNA 検出用の反応を 1 連で行います。

		マイコプラズマ 検出用	Spike-in Control DNA 検出用	反応数計
サンプル	1 検体	2	1	3
	7 検体	14	7	21
	31 検体	62	31	93

なお、陽性コントロールと陰性コントロールの反応は、1 回の試験につき以下の通り行います。

	マイコプラズマ 検出用	Spike-in Control DNA 検出用	反応数計
陰性コントロール	1	1	2
陽性コントロール	1	0	1

よって、本製品で実施可能な試験回数は次の通りです。

- 1 検体での試験の場合：48 回
- 7 検体での試験の場合：12 回
- 31 検体での試験の場合：3 回

* 2 : 蛍光標識プローブ (FAM 標識) を含んでいるため、遮光に留意してください。

* 3 : Positive Control (Myco) を希釈し感度コントロールとして使用する場合等に使用します。

II. 保存

− 20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

- ・核酸抽出キット
NucleoSpin Mycoplasma DNA（製品コード 740860.50）
- ・マイクロピペットおよびチップ
- ・リアルタイム PCR 装置
Thermal Cycler Dice® Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980）
Thermal Cycler Dice Real Time System II（製品コード TP900/TP960：終売）
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）
LightCycler 480 システム（Roche Diagnostics 社）
CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社） など
- ・ヒートブロック
- ・微量高速遠心機

IV. 使用に際して

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。

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。）

V. 操作上の注意

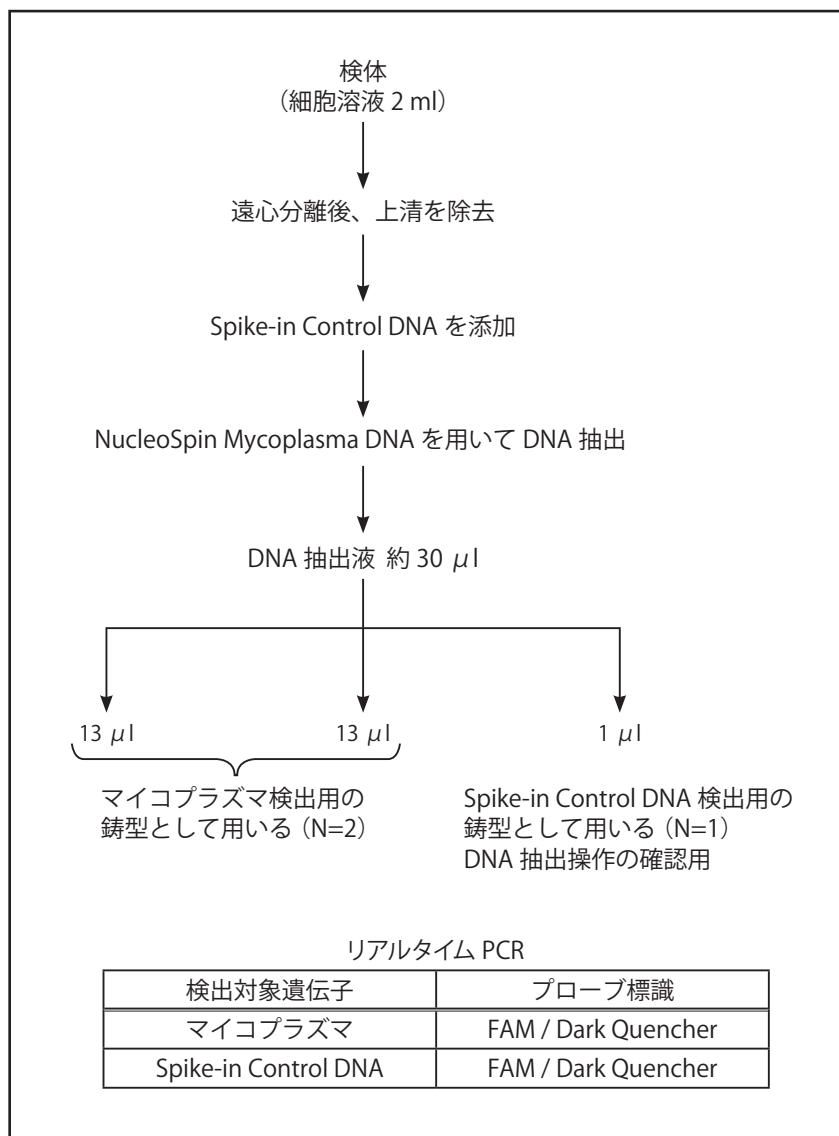
1. リアルタイム PCR 装置の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
2. 万一、プローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。
3. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の3つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します（IX. 補足：エリア分けについてを参照）。どのエリアにおいても、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製を行います。
 - エリア 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. 本製品はリアルタイム 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

2 ml の細胞溶液を初発検体として、遠心分離による濃縮後、DNA 抽出を行います。リアルタイム PCR では、得られた DNA 溶液を鋳型として、マイコプラズマ検出用の反応を 2 連で、Spike-in Control DNA 検出用の反応を 1 連で行います。



マイコプラズマ検出用の 2 反応のうち、両方または片方の反応で Ct 値が算出された場合に、マイコプラズマ陽性と判定します。

VI-1. DNA の抽出 (エリア 2 で実施)

検体から DNA を抽出します。抽出操作の途中で、抽出操作を確認するための Spike-in Control DNA を添加します。以下に、例として NucleoSpin Mycoplasma DNA (製品コード 740860.50) を用いた場合の操作方法を紹介します。

1. 細胞の回収

細胞溶液 2 ml (2×10^6 個程度) を 15,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清 1,810 μ l を除去する (190 μ l 残す)。

2. Spike-in Control DNA の添加

Spike-in Control DNA を 10 μ l 添加する。

3. サンプルの溶解

Proteinase K 溶液を 5 μ l 添加する。

Lysis Buffer SML を 200 μ l 添加し、ボルテックスで 10 ~ 15 秒混合する。

Carrier RNA Stock 溶液*¹ を 5.6 μ l 添加し、穏やかに混合する。

室温で 3 分間放置する。

* 1 : Carrier RNA Stock 溶液の調製法

[製品コード 740860.50 の場合]

300 μ g の凍結乾燥品の Carrier RNA に RNase free 水を 300 μ l 加えて溶解してください。溶解後は - 20°C で保存してください。

4. エタノールの添加

エタノール (96 ~ 100%) を 200 μ l 添加し、ボルテックスで 10 ~ 15 秒混合する。
室温で 5 分間放置する。

5. カラムへの吸着

NucleoSpin Mycoplasma DNA Column を Collection Tube (2 ml) にセットする。

4. の溶液をカラムに添加し、 $4,000 \times g$ 、3 分間遠心する。*²

ろ液を捨てた後、新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。

* 2 : この遠心操作ですべての溶液がカラムを通過しなかった場合は、高速遠心 ($15,000 \sim 20,800 \times g$) を 1 分間行ってください。それでも溶液がカラム上部に残っている場合には、新しい試料でのやり直しを推奨します。

6. メンブレンの洗浄

1 回目の洗浄

Wash Buffer SMW1 をカラムに 400 μ l 添加し、 $11,000 \times g$ 、30 秒間遠心する。

ろ液を捨てた後、新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。

2 回目の洗浄

Wash Buffer SMW2*³ をカラムに 400 μ l 添加し、 $11,000 \times g$ 、30 秒間遠心する。

ろ液を捨てた後、新しい 2 ml の Collection Tube にカラムをセットする。

3 回目の洗浄

Wash Buffer SMW2 をカラムに 200 μ l 添加し、最高速 (最大 $20,000 \times g$) で 5 分間遠心する。

ろ液を捨てた後、新しい 1.5 ml の Collection Tube にカラムをセットする。

* 3 : Wash Buffer SMW2 の調製法

[製品コード 740860.50 の場合]

Wash Buffer SMW2 (Concentrate) 12 ml に 96 ~ 100%エタノールを 48 ml 添加してください。

7. メンブレンの乾燥

カラムの蓋を開けて 56°C で 5 分間乾燥させる。

8. DNA の溶出

70°Cで予温したRNase free水を34 μl *⁴添加し、室温で3分間インキュベートする。
20,000 $\times g$ 、3分間遠心し、DNAを溶出させる。
溶出されたDNA溶液(約30 μl)*⁵をすぐに使用しない場合は、-20°Cで保存する。

* 4： マイクロピペットで吸引する前に、チップを数回プレリンスしてください。

* 5： リアルタイムPCRの鋳型DNA溶液として、27 μl を使用します。溶出DNA溶液が27 μl に満たない場合は、H₂Oで30 μl 程度にFill upしてください。

VI-2. リアルタイム PCR 反応液の調製

マイコプラズマ検出用と Spike-in Control DNA 検出用の 2 種類の反応液を調製し、VI-1. で抽出した DNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行います。

1. 以下の反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
必要数 + a 分の反応液をまとめて調製する。

<マイコプラズマ検出用>

※ (検体数 × 2) + 2 本分 (Positive Control、Negative Control (H₂O)) を調製する。

[1 反応あたり]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix	10 μ l
② Primer/Probe Mix (Myco)	2 μ l
Total	12 μ l

< Spike-in Control DNA 検出用 >

※ 検体数 + 1 本分 (Negative Control (H₂O)) を調製する。

[1 反応あたり]

試薬	使用量
● Probe qPCR Mix	10 μ l
③ Primer/Probe Mix (Spike-in)	2 μ l
⊕ H ₂ O	12 μ l
Total	24 μ l

2. 1. で調製した反応液をリアルタイム PCR 用チューブに分注する。

マイコプラズマ検出用 : 12 μ l ずつ
Spike-in Control DNA 検出用 : 24 μ l ずつ

3. DNA 抽出液(または Positive Control (Myco) または H₂O) を添加する。(エリア 3 で実施)

マイコプラズマ検出用 : 13 μ l ずつ
Spike-in Control DNA 検出用 : 1 μ l ずつ

4. 以下の条件で反応を実施する。

初期変性

95°C 30 秒

PCR : 5 サイクル

95°C 5 秒

60°C 1 分

PCR : 40 サイクル

90°C 1 秒

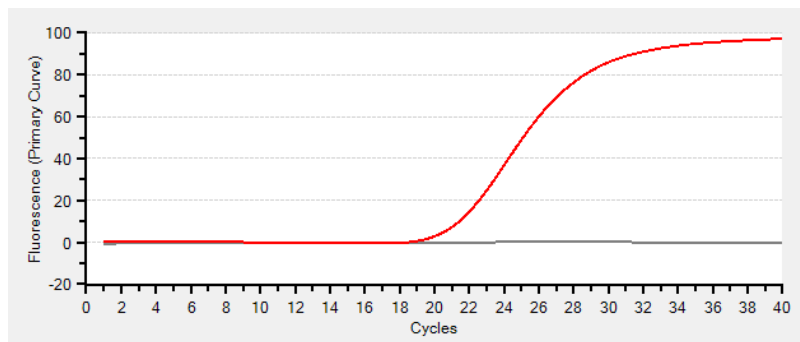
60°C 1 分 (FAM 検出)

※ Thermal Cycler Dice Real Time System III / II では Speed は Fast を選択してください。

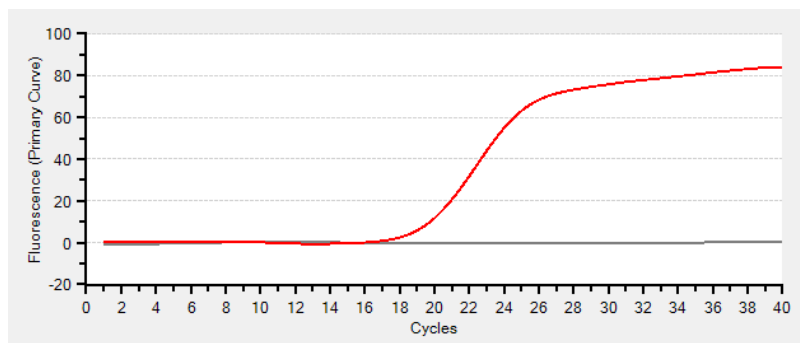
VII. 反応例

Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC を使用した場合の反応例を以下にご紹介します。

< Positive Control (Myco) の検出例 >



< Spike-in Control DNA の検出例 >



VIII. 性能評価試験結果

性能評価試験結果は、NucleoSpin Virus を使用して取得しました。NucleoSpin Virus は、NucleoSpin Mycoplasma DNA と技術的に同等である事を確認しています。NucleoSpin Mycoplasma DNA は、より厳格な衛生基準の下で製造されており、全てのロットで、既定の試験において、マイコプラズマ汚染が検出されないことが試験されています。

本製品では、初期の 5 サイクルでは蛍光検出を行わず、その後の 40 サイクルで蛍光検出を行うので、Ct 値は実際の PCR サイクル数より 5 小さい値として算出されます。本項の結果は、算出された Ct 値に 5 を加えて実際のサイクル数の値で記載しています。

VIII-1. 網羅性

<方法> 市販の 7 種類のマイコプラズマ由来ゲノム DNA につき、約 10 pg を鋳型として各 N=2 で本製品によるリアルタイム PCR での検出を行った。

<結果> 表 1 に試験に用いたマイコプラズマの種類とリアルタイム PCR 結果 (Ct 値) を示す。7 種類すべてにつき、良好に検出されることが確認されました。

表 1. 網羅性試験結果

No.	Species	ATCC No.	1 反応当り	Ct1	Ct2	平均値
1	<i>Mycoplasma arthritis</i>	19611D	10 pg	27.4	27.4	27.4
2	<i>Mycoplasma bovis</i>	25523D	10 pg	24.4	24.5	24.4
3	<i>Mycoplasma hominis</i>	23114D	10 pg	23.2	23.2	23.2
4	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	25934D	10 pg	24.0	24.0	24.0
5	<i>Mycoplasma pirum</i>	25960D	10 pg	26.4	26.4	26.4
6	<i>Mycoplasma synoviae</i>	qCRM-25204D	10 ⁴ copies	23.5	23.4	23.4
7	<i>Spiroplasma citri</i>	27556D-5	10 pg	25.9	26.0	25.9

VIII-2. 特異性試験

<方法> 市販の13種類の細菌由来ゲノムDNAにつき、約100 pgを鋳型として各N=2で本製品によるリアルタイムPCRでの検出を行った。

<結果> 表2に試験に用いた細菌の種類とリアルタイムPCRの結果(Ct値)を示します。いずれの細菌由来ゲノムDNAでもクロス反応は認められず、マイコプラズマ特異的な検出が可能であることが確認されました。

表2. 特異性試験結果

No.	Species	NBRC No.	1反応当り	Ct1	Ct2
1	<i>Bacillus subtilis</i>	13719G	100 pg	--	--
2	<i>Brevibacillus brevis</i>	100599G	100 pg	--	--
3	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	13948G	100 pg	--	--
4	<i>Clostridium kluyveri</i>	12016G	100 pg	--	--
5	<i>Escherichia coli</i>	12713G	100 pg	--	--
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14940G	100 pg	--	--
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	106052G	100 pg	--	--
8	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	13245G	100 pg	--	--
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	100910G	100 pg	--	--
10	<i>Streptococcus mutans</i>	13955G	100 pg	--	--
11	<i>Streptomyces avermitilis</i>	14893G	100 pg	--	--
12	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100887G	100 pg	--	--
13	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	12172G	100 pg	--	--

VIII-3. 検出感度試験

<方法> ATCCより購入した7種類のマイコプラズマ標準品(表3)を用いて、本製品の95%陽性カットオフ値の確認を行った。

10⁶個/mlのCHO細胞を用意し、そこにマイコプラズマ標準品を1、10、100 cfu/ml (*M. pneumoniae*については0.1、1、10 ccu/ml)となるように添加して、DNA抽出および本製品による測定を行った。マイコプラズマ標準品の段階希釈は4連で行った。10 cfu/mlの各希釈液では、DNA抽出とリアルタイムPCRは6回繰り返して行い、計24点の結果が得られた。1 cfu/mlと100 cfu/mlの各希釈液では、DNA抽出とリアルタイムPCRは2回繰り返して行い、計8点の結果が得られた。

表3. マイコプラズマ標準品

菌種	ATCC No.	Lot No.	Post-preservation titer	Genome copy (GC)
<i>Mycoplasma arginini</i>	23838-TTR	60224014	3.70 × 10 ⁹ cfu/ml	8.93 × 10 ⁹ GC/ml
<i>Mycoplasma fermentans</i>	19989-TTR	60316337	1.00 × 10 ⁹ cfu/ml	8.61 × 10 ⁹ GC/ml
<i>Mycoplasma salivarium</i>	23064-TTR	60171952	1.67 × 10 ⁹ cfu/ml	3.80 × 10 ⁹ GC/ml
<i>Mycoplasma orale</i>	23714-TTR	61060921	3.08 × 10 ⁸ cfu/ml	1.54 × 10 ⁹ GC/ml
<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>	17981-TTR	63478133	8.77 × 10 ⁸ cfu/ml	1.23 × 10 ⁹ GC/ml
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	23206-TTR	60171953	7.10 × 10 ⁸ cfu/ml	5.86 × 10 ⁹ GC/ml
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	15531-TTR	60171955	1.00 × 10 ⁸ ccu/ml	5.82 × 10 ⁹ GC/ml

<結果> 表4と表5に検出感度試験の結果を示します。表4には各試験区のCt値の平均値と標準偏差をまとめました。表5には各試験区にて陽性判定となった個数とその割合をまとめました。

7菌種のマイコプラズマ標準品すべてにつき95%陽性カットオフ値が少なくとも10cfu/ml(*M. pneumoniae*については1ccu/ml)以下であり、日本薬局方記載のA法(培養法)の代替法とする場合の検出感度を満たすことを確認しました。

表4. 検出感度試験結果 1

	Average of Ct			SD of Ct		
	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml
<i>M. arginini</i>	33.0	36.2	39.7	0.356	0.995	2.003
<i>M. fermentans</i>	31.9	35.5	38.8	0.385	0.828	0.952
<i>M. salivarium</i>	33.3	37.0	39.2	0.532	0.857	1.853
<i>M. orale</i>	33.8	38.1	39.1	0.293	1.336	0.650
<i>M. hyorhinis</i>	31.3	35.4	39.7	0.402	0.550	2.470
<i>A. laidlawii</i>	30.6	35.2	39.2	0.512	1.908	1.585

	Average of Ct			SD of Ct		
	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml
<i>M. pneumoniae</i>	33.2	36.5	40.0	0.397	1.132	1.898

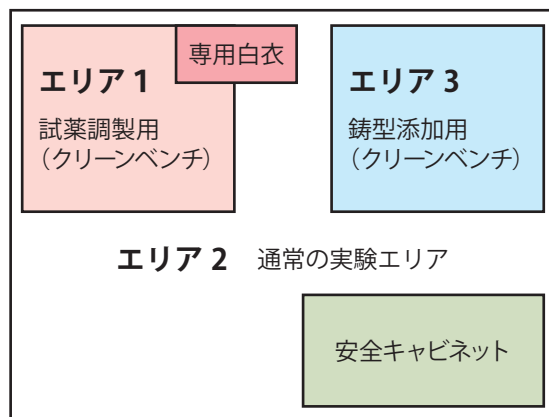
表5. 検出感度試験結果 2

	Positive No.			Positive %		
	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml	100 cfu/ml	10 cfu/ml	1 cfu/ml
<i>M. arginini</i>	8/8	24/24	6/8	100.0	100.0	75.0
<i>M. fermentans</i>	8/8	24/24	5/8	100.0	100.0	62.5
<i>M. salivarium</i>	8/8	24/24	6/8	100.0	100.0	75.0
<i>M. orale</i>	8/8	24/24	5/8	100.0	100.0	62.5
<i>M. hyorhinis</i>	8/8	24/24	8/8	100.0	100.0	100.0
<i>A. laidlawii</i>	8/8	24/24	8/8	100.0	100.0	100.0

	Positive No.			Positive %		
	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml	10 ccu/ml	1 ccu/ml	0.1 ccu/ml
<i>M. pneumoniae</i>	8/8	24/24	3/8	100.0	100.0	37.5

※性能評価試験の詳細については、本書末尾のテクニカルサポートラインにお問合せください。

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
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。

X. 関連製品

Virus Test Kit (HIV, HTLV, HCV, HBV, ParvoB19) Ver.2 (製品コード RR273A)
Virus Test Kit (EBV, CMV, WNV) Ver.2 (製品コード RR274A)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC (製品コード TP970)
0.1 ml 8-strip -neo- tube & cap Set (製品コード NJ907)
FrameStar® 0.1ml 96 well qPCR plate (製品コード NJ904)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)
NucleoSpin Mycoplasma DNA (製品コード 740860.50)

XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。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。
- ・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、FrameStar は Azenta Life Sciences. 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