# SmartChip™ MyDesign Real-Time PCR System アプリケーションノート No.1: 微生物パネル解析

# SmartChip™ Real-Time PCR System による

# 細菌性腟炎関連微生物のパネル解析例

# 短時間でコストパフォーマンスの高い 微生物同定

### 高い検出感度かつ優れた特異性

対象病原体がわずか  $10\sim500$  コピー/ $\mu$ L でも信頼性のある検出

## 自動化による簡便なワークフロー

22 項目 144 サンプルの検査でも、 ハンズオンタイムはわずか 30 分

#### 経済的

迅速な微生物同定を低コストで

米国では2120万人以上の女性が細菌性腟炎(BV)に罹患しており、BV 検体に存在する微生物を迅速かつ正確に同定することは、婦人科領域の研究機関にとって極めて重要です。BV の特異的原因や要因は不明ですが、検体中の微生物を同定することにより、BV への理解が深まる可能性があります。米国の臨床検査会社での使用例として、19 種類の異なる病原体について、Bacterial Vaginosis Panel (表 1)を準備し、SmartChip Real-Time PCR System (図 1)を用いた定量 PCR 解析により、迅速な検査を実施しています。

## 迅速・簡便・自動化された微生物検出

Bacterial Vaginosis Panel (BV パネル)を用いた検出では、予め解析用プライマーが分注されたチップ (pre-printed SmartChip)を準備し、付属のサンプル自動分注システム (MultiSample Nano Dispenser: MSND)を使用することで、SmartChip Real-Time PCR System 上で反応のセットアップやデータ収集が簡単に行えます。

Pre-amplification

BV パネルの対象病原体				
アトポビウム・バギナエ	モビルンカス・クルティシイ			
Atopobium vaginae	Mobiluncus curtisii			
バクテロイデス フラジリス	モビルンカス・ムリエリス			
Bacteroides fragilis	Mobiluncus mulieris			
カンジダ・アルビカンス	マイコプラズマ・ゲニタリウム			
Candida albicans	Mycoplasma genitalium			
カンジダ・グラブラタ	マイコプラズマ・ホミニス			
Candida glabrata	Mycoplasma hominis			
カンジダ・クルセイ	淋菌			
Candida krusei	Neisseria gonorrhoeae			
カンジダ・パラプローシス	プレボテラ・ビビア			
Candida parapsilosis	Prevotella bivia			
カンジダ・トロピカリス	腟トリコモナス			
Candida tropicalis	Trichomonas vaginalis			
トラコーマクラミジア	ウレアプラズマ・ウレアリチカム			
Chlamydia trachomatis	Ureaplasma urealyticum			
ガードネレラ・バジナリス	ヒトアルブミン			
Gardnerella vaginalis				
単純ヘルペスウイルス 1 型	RNaseP			
HSV1				
単純ヘルペスウイルス2型	βグロブリン			
HSV2				

表 1. Bacterial Vaginosis Panel (BV パネル) は、細菌、酵母菌、原虫、真菌、ウイルス性の病原菌を含む 19 種類の微生物と 3 種類のインターナルポジティブコントロールを同定します。

MSND によるプレプリントチップへのサンプル自動分注の所要時間はわずか 40 分。作業時間が短縮されヒューマンエラーによるばらつきが抑えられます。サンプルの Pre-amplification 後、SmartChip Real-Time PCR System の自動ワークフローにより、22 項目 144 サンプルの解析をハンズオンタイムわずか 30 分、トータルランタイム6時間で行うことが可能です。SmartChip Real-Time PCR Systemを用いた BV Panel により、1 日で 432 サンプルまで解析可能です。

**図 1.** SmartChip Real-Time PCR System を用いた BV パネル解析の ワークフロー



酵素による Clean Up



プレプリントアッセイ

搭載の SmartChip



ップへのサンプル分注

プレプリントアッセイチ サーマルサイクルと



データ収集

## Gardnerella vaginalis

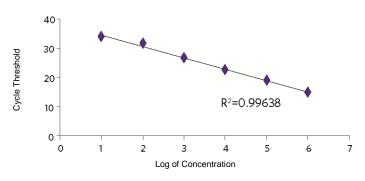
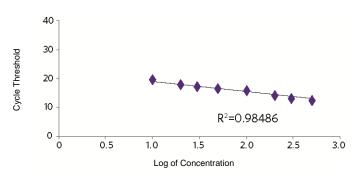


図 2. BV 感染に関与する微生物である Gardnerella vaginalis を検出する BV パネルアッセイの例。6 段階の対数濃度で高い直線性が得られ、効率的なリニア検出が認められます。

# Candida parapsilosis



**図 3.** *Candida parapsilosis* を検出するアッセイの例。コピー数 10~500 個の間で正確なリニア検出が認められます。

サンプル	投入試料濃度 (C/uL)	Ct	CtSD
32270	(C/ GL)	Ct	ССЭБ
Candida parapsilosis	10	19.08	0.34
Candida parapsilosis	20	17.71	0.07
Candida parapsilosis	30	17.10	0.05
Candida parapsilosis	50	16.42	0.07
Candida parapsilosis	100	15.97	0.04
Candida parapsilosis	200	14.51	0.20
Candida parapsilosis	300	13.46	0.10
Candida parapsilosis	500	12.98	0.16

表 2. サンブルのコピー数、Ct 値、Ct の標準偏差をプロットした表では、コピー数と Ct 値との強い相関性と再現アッセイでのばらつきが少ないことが示されています。

#### 低コストで高感度な微生物検出

SmartChip Real-Time PCR System を用いた微生物検出の反応系は 100nL と微量であるため、プレート上での 10μL 反応系に比べて試薬のコストが削減され、同時に精度と感度は維持されます。 BV パネルでのダイナミックレンジと効率を、10 から 1,000,000 まで 10 倍ずつ希釈して評価することにより測定しました。図 2 は、 Gardnerella vaginalis のアッセイの効率を示したものです。6 段階の対数濃度で高い直線性が得られ、効率的に増幅されたことが示されています。

検出感度と検出限界を測定するため、サンプル量(μL)あたりの対象 病原体コピー数が 10~500 個の範囲にあるサンプルを BV パネルで解析しました。図 3 は、μL あたりの対象病原体コピー数が 500~10 個のサンプルで効率のよいリニア増幅が認められることを示したもので、μL あたりの病原体コピー数がわずか 10 個でも、BV パネルの使用により信頼性と再現性のある検出が可能であることが示唆されています。表 2 は感度実験での複製の実際の Ct 値と統計解析を示したものですが、コピー数と Ct 値には相関性があり、複製のばらつきは少ないことが認められ、コピー数濃度が少ない場合でも BV パネルには信頼性と再現性があることが示唆されています。

使用機器・使用製品・消耗品

製品名	製品コード
SmartChip™ MyDesign Real-Time PCR System	640022
SmartChip™ MyDesign Kit	640032
SmartChip™ MyDesign Kit , 20 pack	640036

※Bacterial Vaginosis Panel (BV パネル) は、データをご提供いただいたお 客様が設計したパネルのため、販売は行っておりません。

#### 問い合わせ先:

タカラバイオ株式会社

首都圏支店 TEL: 03-3271-8553 関西支店 TEL: 077-565-6969

テクニカルサポートライン TEL: 077-565-6999 ウェブサイト: https://www.takara-bio.co.jp

本紙で紹介した製品はすべて研究用として販売しております。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 販または譲渡、およびこれらのための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。本紙に記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商 標または登録商標です。



<sup>© 2018</sup> Takara Bio Inc. All Rights Reserved.