版:2020年12月



# GeneFields® EHEC/SS キット ユーザーマニュアル

研究専用試薬

### キット概要

糞便中の3菌種のDNAを検出するための検査キットです:マルチプレックスPCRとDNA Stripを使用し、糞便中のサルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌(EHEC)のDNAを検出します。



本キットの使用に際しては、本キットに含まれる試薬または本キットで推奨する試薬を必ず使用してください(4.4 保証欄参照)

#### 1. はじめに

腸管病原菌遺伝子検出キット GeneFields<sup>®</sup> EHEC/SS はマルチプレックス PCR と DNA Strip を用いて、糞便中の 3 菌種(サルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌(EHEC))の DNA を同時かつ迅速に検出できます。また偽陰性対策として、PCR 阻害の有無を確認するための陽性コントロールも同時に検出します。

#### 【キットの特徴】

- 1. 3 菌種(サルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌(EHEC))をそれぞれ特異的に増幅する PCR プライマーが PCR オリゴミックスに全て含まれているため、3 菌種の存在を同時に調べることが可能です。
- 2. アガロースゲル電気泳動に比べ、操作ならびに結果判定が容易です。
- 3. 特別な読み取り装置(蛍光検出器やリアルタイム PCR 機器)は不要です。
- 4. PCR 用サンプルの調製、PCR、検出、結果の判定まで3時間以内で実施できます。

# 2. キットの構成

内容物	量または個数
PCR Oligo Mix	230 µl × 1本
Coloring Buffer	1,600 µl × 1本
DNA Strip	48本 × 1袋
Lysis Buffer B(サンプル懸濁用バッファー)	125ml × 1本
ユーザーマニュアルと検査結果判定用カード	1 セット

\* 各試薬は実際のテスト分よりも多めに入っています

# 3. 輸送と保存条件

PCR Oligo Mix は-20℃以下で保管ください。

その他の試薬は2℃~8℃で輸送、保管してください。また、凍らせないでください。適切な条件下で保管した場合のキットの使用期間は外箱に表示しています。

### 4. 使用上または取り扱い上の注意事項

#### 4.1 使用上の注意事項

- ◆ 本キットをご使用になる際には、取扱説明書をよく読み、記載された試験方法に従って使用してください。
- 本キットは研究用試薬であり、臨床的診断を下す目的で使用することはできません。
- 各試薬は保存温度を厳守してください。また保存にあたっては、コンタミネーション防止に注意してください(コンタミネーション防止対策の詳細については 4.3 をご参照ください)。
- 試験溶液の調製に使用する器具ならびに試薬類の使用方法等については、それぞれの製造元もしくは販売元に ご確認ください。
- 商品の仕様は、予告なく変更する場合があります。
- サンプルの状態および PCR 装置の機種や PCR 産物の増幅量などにより、判定シグナルの強弱が異なる場合があります。

### 4.2 危険防止上および廃棄上の注意事項

- 試験実施の際には、適切な設備・施設、責任ある管理者の指導のもとで標準的な遺伝子検査実験手順にて 実施してください。
- 誤って試験溶液等が目や口に入った場合には、水道水で洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。
- 怪我をする恐れがあるので、DNA Strip が目に入らないように注意してください。
- 試料の残液などは感染の可能性があると考え、必要に応じてオートクレーブ処理(121℃、20分) などの適切 な滅菌処理を実施してください。
- 本キットならびに試料および試験溶液の残りなどを廃棄する場合には、当該地域の廃棄物に関する規定に従い、 衛生面、環境面に十分配慮し廃棄してください。

### 4.3 コンタミネーションの防止対策

- 1. 以下の3つのステップは別々の実験室で実施することを推奨します。
  - a. PCR 用サンプルの調製(糞便サンプルの懸濁・加熱・遠心)
  - b. PCR 反応溶液の準備
  - c. DNA Strip を使った検出

別々の実験室の確保が難しい場合は、3 つのステップについて作業台を分離、または作業エリアを分離してください。

- 2. DNA のコンタミネーションを避けるため、使い捨てグローブとマスクを着用して実験を行ってください。
  - a. 素手で機器や試薬を触らないでください。
  - b. サンプルを取り扱うステップ、試薬を取り扱うステップ、PCR 産物を取り扱うステップは全て別の使い捨てグローブを着用してください。
- 3. マイクロピペットとチップによるクロスコンタミネーションを避けるため、マイクロピペットの取扱いに注意してください。
  - a. フィルターのついたマイクロピペットチップを使用してください。また、試薬やサンプルの入ったチューブにマイクロピペットの先端が入らないようにしてください(長いタイプのマイクロピペットチップの使用を推奨します)。
  - b. 0.1%次亜塩素酸ナトリウムまたは市販の DNA 除去剤(推奨品: DNA-AwayTM (Thermo Scientific 社製))で定期的にマイクロピペットを拭いてください。 拭く際は必ず使い捨てのグローブを着用してください。

#### <注意事項>

作業を行う際は 0.1%次亜塩素酸ナトリウムまたは市販の DNA 除去剤が直接皮膚に触れないように必ず使い捨てのグローブを着用してください。また、0.1%次亜塩素酸ナトリウムまたは市販の DNA 除去剤が皮膚や衣服に付いた場合は、直ちに水で洗い流してください。詳しくは使用製品の取扱説明書や SDS をご覧ください。

- 4. 試薬や DNA を含むチューブをあける前に、スピンダウンを行ってください。サンプルや試薬の入ったチューブ及び PCR 用試薬を混合したマイクロチューブの蓋が空いた状態で、直上で作業を行うことを避けてください。
- 5. ピペットだけでなく、試験に使用する器具(机、機械、チューブ立て など)は検査の前後に0.1%次亜塩素酸ナトリウムまたは市販の DNA 除去剤(推奨品: DNA-Away™ (Thermo Scientific 社製))で拭いてください。

# 4.4 保証

- 本キットにより得られた結果の判断および利用は、お客様の責任のもと実施してください。
- 検査結果判定により発生する問題に関して、当社は一切の責任を負いません。
- 本キットに含まれる試薬または本キットで推奨する試薬以外の試薬を使用して得られた結果については、当社は 一切保証いたしません。
- 本キットに不具合があると当社が判断した場合は、代替品とお取替えいたします。

### 5. 検査の原理

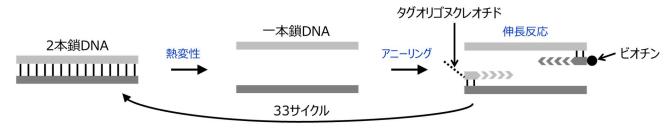
# 5.1 マルチプレックス PCR 用プライマー(PCR Oligo Mix)と Coloring Buffer

PCR Oligo Mix にはサルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌(EHEC)を特異的かつ同時に増幅可能なように設計した PCR オリゴヌクレオチドが含まれています。それぞれのフォワードプライマーの 5'末端には DNA Strip に固定してあるプローブと結合するための特異的なタグオリゴヌクレオチドが修飾されています。また、それぞれのリバースプライマーの 5'末端には、Coloring Buffer に含まれるストレプトアビジンで修飾した青いラテックスビーズ(以下、青色ビーズ)と結合するようにビオチンが修飾されています。

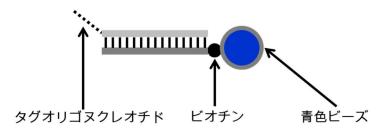
上述のとおり、Coloring Buffer にはビオチンと結合する性質を持つストレプトアビジンが修飾された青色ビーズが含まれています。

# 5.2 PCR 増幅と DNA Strip

本キットではマルチプレックス PCR により、サルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌(EHEC)に特異的な DNA を同時に増幅します。全ての PCR 産物の片側にはタグオリゴヌクレオチド、もう片側にはビオチンが標識されています(下図を参照ください)。



PCR 産物と Coloring Buffer を混合すると Coloring Buffer に含まれる青色ビーズ(ストレプトアビジン標識ラテックスビーズ)が PCR 産物の末端に標識されているビオチンと結合し、PCR 産物と青色ビーズの複合体を形成します。この複合体には DNA Strip に結合するためのタグオリゴヌクレオチドと青色ビーズの両方が標識されていることになります(下図を参照ください)。



PCR 産物と Coloring Buffer 混合液に DNA Strip を入れると、形成された複合体は毛細管現象により DNA Strip 上を移動します。

次ページの図に示すように、DNA Strip のテストエリアの Line A、Line B、Line C、Line D、Line Eに PCR 産物に

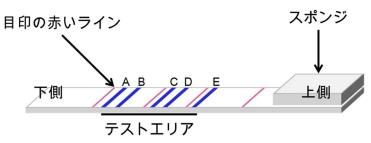
標識されたタグオリゴヌクレオチドと結合するプローブオリゴヌクレオチドが印刷されています。 Line A には VT1 遺伝子、 Line B には VT2 遺伝子、 Line C には ipaH 遺伝子、 Line D には invA 遺伝子、 Line E には陽性コントロールとしてヒト由来 DNAの PCR 産物(PCR 産物と青色ビーズの複合体)がそれぞれ結合します(検出対象菌種とターゲット遺伝子の関係は右表の通りです。)

検出対象菌種	ターゲット遺伝子
サルモネラ	invA 遺伝子
赤痢菌	ipaH 遺伝子
腸管出血性大腸菌	VT1, VT2 遺伝子
陽性コントロール	ヒト由来 DNA

PCR 産物を吸い上げる際はスポンジ側が上になるようにし(下図の「上側」)、下図の「下側」を下にして DNA Stripを 1.5ml マイクロチューブに入れます。

複合体には青色ビーズが存在するため、DNA Strip 上のプローブと複合体が結合した場合、Line が青く染色されます。 このようにして、ターゲットとする PCR 産物を DNA Strip 上の青色のラインとして可視化します。

Line E にはヒト由来 DNA の PCR 産物が結合します。 このラインは陽性コントロールとして設定されており、ラインが青く着色することで PCR 増幅が正確に行われたことが確認できます。



### 6. プロトコール

### 検査に必要なもの(キットには含まれていません)

- 遠心分離機
- サーマルサイクラー
- 低温インキュベーター、PCR チューブボックス (4°C) または氷
- インキュベーター (50℃でマイクロチューブの加温が可能なもの)
- インキュベーター (100℃でマイクロチューブの加温が可能なもの)
- マイクロピペッター及びチップ(1 µl, 20 µl, 200 µl, 1000µl)
- PCR 用チューブ (0.2 ml)
- マイクロチューブ (1.5 ml)
- PCR 用チューブ用スタンドおよびマイクロチューブ用スタンド
- Uracil DNA Glycosylase (UNG), heat-labile (タカラバイオ カタログ番号 2820 (2020 年 12 月現在))
- 2x QuantiTect Multiplex PCR NoROX Master Mix

  (QIAGEN® QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit に含まれています。カタログ番号 204743 または 204745(2020 年 12 月現在))

### 6.1 PCR 用サンプルの調製(糞便検体の前処理)

1. 1.5ml チューブに Lysis Buffer B(サンプル懸濁用バッファー)を 50µl 入れ、糞便検体を 5%(w/v)程度の濃度に懸濁してください。

#### NOTE:

- a. 糞便検体は検便容器の採便棒先端に付着したものを竹串などで取ってご使用ください。
- b. 便懸濁液の濃度が5%(w/v)より高くなりすぎると、検出感度低下の原因になります。
- c. 採便容器中のキャリブレア液は 1.5ml チューブ内に極力持ち込まないでください。検出感度低下の原因になります。
- 2. 懸濁した便液を100℃ 10分間で加熱してください。
- 3. 7,000G以上で3分間、室温で遠心してください。
- 4. 遠心上清 2µl を PCR 用サンプルとして使用してください。

#### NOTE:

- a. 調製当日に PCR 増幅を行うことを強くお奨めします。
- b. 調製当日に PCR 増幅を行わない場合は、数日間の凍結保存が可能です。ただし、検出感度が低下する 恐れがあります。
- c. ご使用時は室温で融解した後に7,000G以上で3分間、室温で遠心を行い、ご使用ください。
- d. 加熱処理を行っていない懸濁液は保存できません。

# 6.2 PCR 增幅

1. 下表に従い反応液を準備します。

試薬名	1 テストの容量	
2x QuantiTect Multiplex PCR NoROX Master Mix	5.0 μl	
PCR Oligo Mix	2.9 µl	
PCR 用サンプル(6.1 で調製した糞便検体の前処理液)	2.0 μΙ	
UNG	0.1 μΙ	
Total	10.0 µl	

#### NOTE:

- a. 使用の前に個々の試薬を完全に混合します。混合が不十分だと間違った試験結果が生じる可能性があります。
- b. 反応液を準備する際は全ての試薬を氷上に置いてください。
- c. 反応液を準備した後、10 分以内に PCR 反応を開始するようにしてください。
- d. キャリーオーバー汚染した PCR 産物を分解することを目的として、Uracil DNA Glycosylase (UNG)を使用します。
- 2. 反応液を含む PCR チューブをサーマルサイクラーにセットします。 PCR 増幅プロトコールは下表に従って実施してください。

ステップ	温度と時間	
UNG reaction	25℃, 10min	
Enzyme activation	95°C, 9 min	
Denaturation	33 cycles	95°C, 30 sec
Annealing		68°C, 30 sec
Extension		72°C, 15 sec
Hold	4°C to 10°C	

# 6.3 DNA Strip を使用した検出

1. Coloring Buffer を室温にします。

#### NOTE:

Coloring Buffer には沈殿が生じます。Coloring Buffer を使用する前に、沈殿が見えなくなるまで Coloring Buffer を転倒混和などで混合してください。

2. 30  $\mu$ l の Coloring Buffer と 10  $\mu$ l の PCR 産物を新しい 1.5ml マイクロチューブに入れ、ピペッティングでよく混合します。

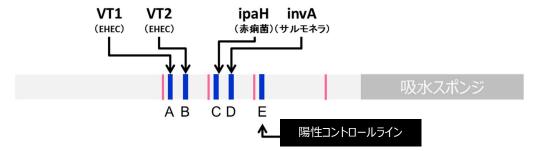
- 3. 混合した溶液の入った 1.5ml マイクロチューブを 50℃で 1 分間インキュベートします。
- 4. 3. の 1.5ml チューブに DNA Strip を入れます。50℃で 40 分間インキュベートします。 インキュベートの間、DNA Strip が 1.5ml チューブの底まで入っていることを確認してください。

#### NOTE:

- a. インキュベーションを開始する際、チューブに挿入する DNA Strip の方向にご注意ください。 DNA Strip のスポンジ側が上になっていることを確認してください(右図参照)。 DNA Strip のスポンジ側を混合した溶液中に入れると偽陽性の原因になります。
- b. インキュベーションは必ず 40 分間行ってください。インキュベーション時間が不十分な場合 偽陽性のラインが出ますので、インキュベーション中に DNA Strip を取り出さないでくださ い。
- c. インキュベーションは必ず 50℃で行ってください。温度を間違うと偽陽性の原因になります。
- 5. キットに同封している検査結果判定カードを使って結果を判定してください。

### 6.4検査結果の判定

下図とキットに添付している検査結果判定カードに従って未知のサンプルの検査結果を判定します。



● Line A が青色になった場合 : 腸管出血性大腸菌 (EHEC) が「検出」 ● Line B が青色になった場合 : 腸管出血性大腸菌 (EHEC) が「検出」

Line C が青色になった場合 : 赤痢菌が「検出」Line D が青色になった場合 : サルモネラが「検出」

※本ユーザーマニュアルに記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

#### 【販売元】



# 極東製薬工業株式会社

〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町7番8号 問合せ先:営業学術部 03-5645-5664

#### 【製造元】

# KUR∧BO 倉敷紡績株式会社

環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

