

## VT·SAL·IPA Ver.4

腸管系病原菌遺伝子検出試薬キットVer.4  
Intestinal Pathogen Gene Detection Kit Ver.4

## 研究用試薬

P/N:241-09680-91

## 取扱説明書

この文書をよく読んで正しくご使用ください。  
いつでも使用できるように大切に保管してください。

## 特長

- 腸管出血性大腸菌(VT 遺伝子)、サルモネラ属菌(invA 遺伝子)、赤痢菌(ipaH 遺伝子)に由来する遺伝子をマルチプレックス PCR と融解曲線解析により一度に検出できます。
- PCR 増幅から遺伝子検出まで 1 本のチューブで手間なく行えます。
- 偽陰性対策として、内部コントロール DNA (I.C.) を含んでいます。
- キャリーオーバー汚染による偽陽性対策として、UNG(Uracyl-N-Glycosidase)を採用しています。

## 試薬キット構成

No	試薬名称	本数	液量
①	PCR Reagent-A	3 本	1170 $\mu$ L
②	PCR Reagent-B	1 本	80 $\mu$ L
③	Enzyme Mix	1 本	20 $\mu$ L

使用回数:200 tests

使用期限:包装袋のラベルに記載

保存温度:-20  $^{\circ}$ C

## キット以外に必要な機器・消耗品

## ■ 機器・消耗品

- リアルタイム PCR 装置:FAM 蛍光フィルター対応
- 恒温装置:90 $^{\circ}$ Cに設定可能なもの
- 高速遠心機:10,000 rpm で遠心可能なもの
- マイクロピペットおよびフィルター付チップ
- 小型遠心機(スピンドウン用)
- ボルテックスミキサー
- クラッシュアイスや市販の保冷材などの冷媒
- チューブ冷却用アルミブロック
- リアルタイム PCR 用反応チューブ
- 検便懸濁液調製用(1.5mL~2 mL チューブ)
- 反応液調製用チューブ (0.5 mL~2 mL)

## ■ 試薬

- 蒸留水(検便懸濁液調製用)

## 操作方法

## 使用上の注意

- ・本試薬キットは**冷凍(-20  $^{\circ}$ C)**で保存してください。
- ・操作は全て**氷冷下**(クラッシュアイスなどの冷媒で冷却したアルミブロック上)で実施してください。
- ・①PCR Reagent-A は必要な本数を予め室温にて解凍後、**ボルテックスでしっかり混和・スピンドウンし、使用時まで氷冷下**に保持してください。
- ・②PCR Reagent-B はジメチルスルホキシド(DMSO)入りのため**氷冷下では直ちに固化**します。使用時に予め室温にて解凍後、**ボルテックスでしっかり混和・スピンドウンし、室温のまま使用時まで**保持してください。
- ・③Enzyme Mix は冷凍保存下でも凍らないため、室温で解凍する必要はありません。スピンドウンし**使用時まで氷冷下**に保持してください。

## 1 検体処理

- (1) 検便(例:検便容器の採便棒先端に付着した便など)を、蒸留水 50 $\mu$ L を入れた 1.5mL チューブ内で、5%(w/v)程度の濃度に懸濁します。
- (2) 90 $^{\circ}$ Cの恒温装置で、5分間の加熱処理<sup>※1</sup>を行います。  
※1:使用する装置によって最適化が必要な場合があります。
- (3) 高速遠心機で、10,000rpm・5分間の遠心分離を行います。
- (4) 沈渣が混入しないように2 $\mu$ Lの上清を回収し、PCR反応に使用します。

## 2 反応試薬調製

- (1) 反応調製用チューブで、PCR反応液を調製します<sup>※2</sup>。

## 【1テスト分】

:必要な反応数を掛けて使用量を計算してください。

① PCR Reagent-A	17.5 $\mu$ L
② PCR Reagent-B	0.4 $\mu$ L
③ Enzyme Mix	0.1 $\mu$ L
Total	18.0 $\mu$ L

※2・Enzyme Mix は微量のため取扱いに注意してください。

各試薬を混ぜた後は、ボルテックスで5秒間しっかりと混合してください。

ピペッターの分注誤差を考慮し1割増の反応数での調製をお勧めします。

- (2) **1** で加熱処理をした2  $\mu$ Lの検体が入ったPCR反応液チューブに、(1)のPCR反応液を18 $\mu$ L添加します。
- (3) ボルテックスミキサーで5秒間しっかりと混合後、スピンドウンし、PCR装置にて直ちに反応を開始します。

### 3 PCR 増幅・融解曲線解析

リアルタイム PCR 装置にて、PCR 増幅と融解曲線解析を行います。

#### 【設定条件】※3

島津製作所製 遺伝子検出装置 GVP-9600 使用の場合

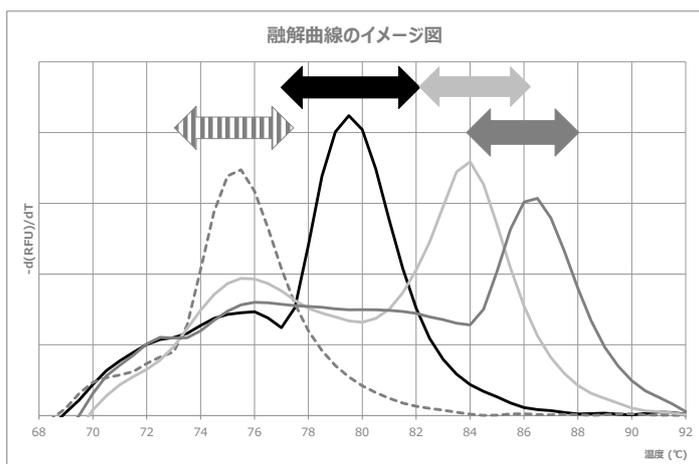
温度	時間
95℃	3分
↓	
[94℃ 1秒 ⇒ 59℃ 5秒 ⇒ 72℃ 5秒]	
×40 サイクル	
↓	
68~92℃ 0.5℃、5秒間隔の測光	

※3：使用する装置によって最適化が必要な場合があります。十分な検証を行ってからご使用ください。装置は製品に付属する取扱説明書に従って、正しくご使用ください。

### 4 解析結果

#### 【GVP-9600 による検出例】※4、※5

—	腸管出血性大腸菌	: 77.5 ≤ VT <sup>Tm</sup> ≤ 82.0 °C
—	サルモネラ属菌	: 82.0 ≤ SAL <sup>Tm</sup> ≤ 86.0 °C
—	赤痢菌	: 84.0 ≤ IPA <sup>Tm</sup> ≤ 87.5 °C
.....	I.C.	: 73.0 ≤ I.C. <sup>Tm</sup> ≤ 77.0 °C



※4：お使いの装置によって、ピーク検出温度範囲が異なる場合があります。他社装置を使用している場合は、お客様自身でその装置に合せた陽性または陰性の判断基準の検討が必要です。

※5：82.0℃付近のピークが検出された場合は、I.C.ピークとの位置関係から腸管出血性大腸菌かサルモネラ属菌のピークかを判断してください。

#### 【判定例】

		I.C. 特異的ピーク	
		○	×
腸管系病原菌 3 菌種 特異的ピーク	○	陽性	陽性
	×	陰性	判定不能※6

※6：いずれの特異的ピークも確認できない場合は再解析を行います。

### 注意事項

#### 1. 試薬に関する注意事項

- ・本製品は研究用です。医薬品医療機器法に基づく体外診断用医薬品あるいは医療機器として承認・認証等を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。
- ・本取扱説明書および SDS に従って正しくご使用ください。SDS の入手は当社までお問合せください。
- ・本試薬キットは腸管系病原菌(腸管出血性大腸菌・サルモネラ属菌・赤痢菌)の3種について、完全な検出を保証するものではありません。サンプル中の菌量や夾雑物の多寡などや、変異株によっては、検出されない場合があります。

#### 2. 廃棄に関する注意事項

- ・増幅産物による汚染を防ぐため、PCR 後の反応チューブはふたを開けないで廃棄してください。廃棄の際にオートクレーブは行わないでください。DNA はオートクレーブでは分解されません。エアロゾルが発生して汚染原因となる可能性があります。
- ・廃棄物は法令や自治体等の条例・規制等に従って適切に廃棄してください。

#### 3. その他

- ・本取扱説明書の著作権は(株)島津製作所が保有します。当社の許可無く内容の一部または全部を転載・複製することはできません。
- ・本取扱説明書に記載の会社名・商品名は各社の商標の場合があります。本文中では一部®・TM を省略しています。
- ・Ampdirect®は(株)島津製作所の登録商標です。

### 保証について

#### 1. 保証内容

- ・取扱説明書に記載した性能を保証します。使用期限内に品質に異常が生じた場合は、無償で製品を代替します。使用期限は包装袋のラベルに記載しています。使用期限内にご使用ください。

#### 2. 責任の制限

- ・どのような場合にも、お客様の逸失利益、間接的損害、派生的な損害について、当社は一切責任を負いません。第三者からお客様に対してなされた損害賠償に基づく損害についても、当社は一切責任を負いません。また、お客様の操作方法、計測装置により反応の有無が変わる場合があります。誤判定が発生した場合でも発生した損害についても、当社は一切責任を負いません。如何なる場合にも、当社の損害賠償責任は本製品の代金相当額をもってその上限とします。

#### 3. 保証除外事項

- ・使用期限内に品質に異常が生じた場合でも以下の場合は保証対象から除外いたします。(1)誤って使用された場合、(2)保存方法が適切でなかった場合、(3)本製品に因らない理由で異常が生じた場合

© 2018 Shimadzu Corporation. All rights reserved.

技術的な内容に関するお問い合わせ窓口

#### 株式会社島津製作所

分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット TEL : 075-823-1351  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/general/contact/contact.htm>