



Application

糞便、膿瘍およびパラフィン組織の試料を用いた *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) の検出

製品名 KAPATaq Extra PCR Kit (KK3009)

メーカー名 KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは大雄会医科学研究所 澤村卓宏 様のご厚意により掲載させていただきました。

概要

我々の検査室では受領する試料は、今回の赤痢アメーバ検査の例のように様々な材料からの対応が必要となります。例えば糞便は食物残渣、腸内細菌の死骸や剥離した消化管由来の細胞などが多く含まれますし、膿瘍は白血球や集積した細菌の中から、赤痢アメーバの核酸を抽出しなければなりません。即ち少ない標的の核酸量であっても増幅可能なPCR検査システムの適応は検査の信頼性向上の観点から重要です。さらにこれら試料にはPCR反応阻害の原因となりうる物質も含まれています。つまり核酸抽出時に除去しきれなかった場合の阻害反応物質が含まれた試料においても可能な限り対応可能なPCR検査システムが理想です。

実験条件

● サンプル：

臨床所見他で赤痢アメーバの感染が確定している患者より採取された糞便（約200mg）、膿瘍（約200mg）およびパラフィン組織（厚さ5μmの標本2枚から患部のみ採取）を使用した。

● gDNAの抽出：

糞便はQIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いgDNAを抽出した。
膿瘍およびヒト白血球はHigh Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) を、
FFPEはHigh Pure FFPE Isolation Kit (Roche) を用い能書に従いgDNAを抽出した。

● プライマー配列 (5' → 3')：

forward ggaggagtaggaaagttgac
reverse ttctgcaattctgctcga

● 反応組成：

< KAPATaq Extra PCR Kit >

KAPATaq Extra DNAポリメラーゼ	0.1 μL
5×KAPATaq Extra バッファー	4 μL
25mM MgCl ₂	1.4 μL
dNTPs (10mM each)	0.6 μL
forward primer (10 μM)	1 μL
reverse primer (10 μM)	1 μL
template DNA solution	2 μL
water	9.9 μL
total	20 μL

● PCRプログラム：

94℃	5 min	} 35サイクル
94℃	1 min	
60℃	1 min	
72℃	1 min	

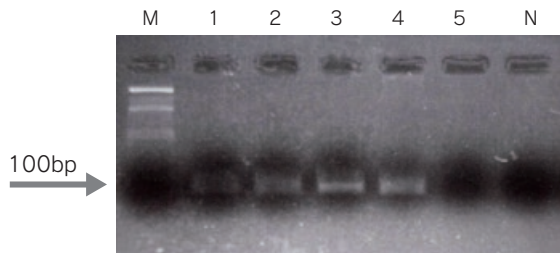
● PCR装置：Applied Biosystems 2720

● 電気泳動条件：

バッファーの種類：TBEバッファー
電圧：100V
泳動時間：20 min
核酸染色試薬：Midori Green Advance (先染め)
イルミネーター：UV

結果

反応終了後、3%アガロースゲルによる電気泳動を実施する。想定分子量のポジションに明瞭なバンドを認めたと例を陽性例とする。



M : DNA分子マーカーX1V
(100bpラダー)
(Sigma)
Lane 1 : 糞便
Lane 2 : 膿瘍
Lane 3 : 膿瘍
Lane 4 : FFPE
Lane 5 : ヒト白血球
N : 陰性コントロール (H₂O)

Lane 1から4において特異バンドを認めた。
陰性(ネガティブコントロール)の
Lane5 (ヒト白血球) は想定通りバンドが
認められなかった。



お客様のコメント

今回、赤痢アメーバの診断が確定している試料をKAPATaq Extra PCR Kitで検討しました。その結果、我々が日常的に使用する材料を用いても可能であることが確認できました。基礎研究の分野において広範に使用されているこの試薬の臨床検体における有用性が期待できます。

