

取扱説明書

FastGene™ VT1/VT2 Detection Kit

Cat.No.	概要	包装単位
FG-VT-16	FastGene™ VT1/VT2 検出キット	16 回分
FG-VT-96	FastGene™ VT1/VT2 検出キット	96 回分

【製品説明】

本キットは、食品由来の培養液からO-157等の腸管出血性大腸菌群が産生する食中毒の原因遺伝子であるペロ毒素遺伝子VT1およびVT2を、日本板硝子株式会社製リアルタイムPCR 装置や、FAM・ROX・Cyanine5が検出可能なリアルタイムPCR装置を用いて検出するためのキットです。

本キットの遺伝子増幅には、精製DNAまたは菌体培養液から粗抽出した溶液を、テンプレートDNA溶液としています。

VT1およびVT2遺伝子の検出には、厚生労働省 医薬食品局 食品安全部 監視安全課より通知された「腸管出血性大腸菌O26、O103、O111、O121、O145及びO157の検査法について」（平成26年11月20日付け食安監発1120 第3号）に記載されたものと同じ配列のプライマー・プローブを使用し、加水分解プローブ法によるリアルタイムPCRで検出します。

本キットには、VT1 遺伝子を検出するためのFAM標識プローブ、VT2 遺伝子を検出するためのROX標識プローブ、およびインターナルコントロールとして細菌共通の16S rRNA遺伝子検出用のCyanine5 標識プローブの3種類の蛍光標識プローブが含まれています。

この3波長を同時にモニタリングすることで、1つの反応液でVT1遺伝子、VT2遺伝子の検出と、16S rRNA遺伝子を検出することが可能です。

*：本キットで使用しているDNA polymeraseにも、製造上の極微量の細菌由来のDNAが混入している可能性があるため、水で反応しても検出されることがあります。

【キット構成】 16回分 (Cat.No. FG-VT-16)、96回分 (Cat.No. FG-VT-96)

PCR試薬/Primer/Probe Mixチューブ 16本 (Cat.No. FG-VT-16)、または96本 (Cat.No. FG-VT-96)

※この試薬は蛍光標識プローブを含んでいますので、遮光に留意してください。

【保存】

-20℃ (輸送、保存とも)

【キット以外に必要なもの (主なもの)】

【機器】

- 日本板硝子株式会社製リアルタイムPCR 装置および専用チップまたは、FAM・ROX・Cyanine5が検出可能なリアルタイムPCR装置と反応容器
- ヒートブロック (98℃まで温度を上げられるもの)
- 卓上遠心機
- ボルテックスミキサー

【その他器具および消耗品】

- マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付)
- 1.5 mLマイクロチューブ

【操作上の注意】

- 1) リアルタイムPCR 装置の取扱いは、装置の取扱説明書に従ってください。
- 2) VT1およびVT2遺伝子が陽性と判定された検体は、さらに微生物学的な手法を用いて詳しい確認を行ってください。
- 3) コンタミネーション発生の原因となりますので、PCR反応後の反応容器からは、サンプル溶液は決して取り出さないでください。
本キットでは増幅反応と検出を同時に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に使用する必要はありません。
- 4) 本キットはリアルタイムPCR 装置での結果より判定を行います。

【操作】

1. サンプルの調製

菌体培養液を約10 -20 μ Lを1.5 mLマイクロチューブに入れ、98°Cで8分以上処理後（※）に遠心機でスピンドウンし、サンプル溶液とします。

※O157等、腸管出血性大腸菌群の不活化を保証するものではありません。

サンプルの取り扱いには、十分に注意をしてください。

2. PCRプログラムの作成

〈日本板硝子株式会社製リアルタイムPCR 装置を使用する場合〉

プレインストールされているプログラムの6番目、「62°C 20sec」を使用します。

〈FAM・ROX・Cyanine5が検出可能なリアルタイムPCR装置を使用する場合〉

下記プログラムを作成し、ランニングに使用します。反応液量は17 μ Lです。

• PCRの温度サイクル

プレ変性	95°C	15秒
変性	95°C	5秒
伸長	62°C	20秒 検出 x45サイクル

• 測定波長

FAM	ROX	Cy5
VT1	VT2	IC (16S rRNA)

3. 反応液の調製

キットの「PCR試薬/Primer/Probe Mixチューブ」にサンプル溶液を2.5 μ Lを加え、よく混ぜてスピンドウンをし、合計17 μ Lの反応液を作成します。

作成後は、使用されるリアルタイムPCR装置合わせた反応容器に移し、測定を実施します。

〈日本板硝子株式会社製リアルタイムPCR 装置を使用する場合〉

反応液を、専用チップの流路内にピペットで注入する際、ピストンを1段目まで押し込んで反応液を注入したら、2段目のブローアウト（ピペット内の残液の吐出）は行わないでください。ピストンを2段目まで押し込むと、流路内に気泡が発生し、測定中にエラーが出て測定ができなくなります。

4. 測定結果の確認

日本板硝子株式会社製リアルタイムPCR 装置の場合は約20 -25分、FAM・ROX・Cyanine5が検出可能なリアルタイムPCR装置の場合は、装置にもよりますが、約50 -60分程度で測定は終了します。

測定終了後は、リアルタイムPCR装置の取扱説明書に従い、判定結果を確認します。

〈日本板硝子株式会社製リアルタイムPCR 装置を使用する場合〉

各遺伝子の測定結果は、対応した色のグラフで装置画面に表示されます。

VT1遺伝子：青（FAM）

VT2遺伝子：緑（ROX）

16S rRNA遺伝子（細菌共通インターナルコントロール）：赤（Cy5）**

**：16S rRNA遺伝子の細菌共通領域に設計されており、ほとんどのサンプルから検出されるため、インターナルコントロールとして用いることが可能です。

【結果判定】

判定例

	VT1	VT2	IC (16S rRNA)	判定
1	検出 (+)	非検出 (-)	検出 (+)	VT1陽性
2	非検出 (-)	検出 (+)	検出 (+)	VT2陽性
3	検出 (+)	検出 (+)	検出 (+)	VT1/VT2陽性
4	非検出 (-)	非検出 (-)	検出 (+)	検出限界以下
5	非検出 (-)	非検出 (-)	非検出 (-)	判定不能

*日本板硝子株式会社製リアルタイムPCR 装置を使用する場合、16サイクルより早くPCRカーブが立ち上がりますと、サイクル数が算出されませんが、機械の仕様となります為、その場合はPCRカーブの立ち上がりの有無で検出・非検出をご判断ください。

【トラブルシューティング】

問題	原因	対策
判定不能になる	サンプル量が過剰である	培養液を希釈して再検査する
	試薬劣化の可能性	保存温度を確認し、試薬を新しいものと交換する
全ての検査でVT1/VT2 が陽性になる	陽性増幅産物のキャリーオーバー汚染の可能性	試薬および消耗品を新しいものに交換する
測定がエラーになる*	反応液に気泡ができてきている可能性	気泡を作らないように分注時に注意し、再検査する

*日本板硝子株式会社製リアルタイムPCR 装置を使用する場合のトラブルシューティングとなります。

■ 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。結果判定により発生する問題に関して、日本ジェネティクス株式会社は一切の責任を負いません。
- 日本ジェネティクス株式会社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。