

# 細菌遺伝子検出キット 細菌用無菌試験試薬

## Preversion

## 取扱説明書

### 特徴および開発の経緯

本品は細胞培養液より抽出した細菌遺伝子をリアルタイムPCRによって検出するキットです。

### 一般的な注意

- 本取扱説明書をよく読んでから使用してください。取扱説明書に記載された操作方法に従って使用してください。記載した操作方法及び使用目的以外での使用については、信頼性を保証致しかねます。
- すべての検体は感染性のあるものとして扱い、防護具（眼鏡、手袋、マスク等）を着用の上、十分に注意をして操作を行ってください。
- 本試薬は研究用試薬であり、それ以外の目的に使用しないでください。診断目的には使用できません。

### 形状・構成等（キットの構成）

① DNA Free Water	1 本
② 10×PCR Buffer	1 本
③ DNA Polymerase	1 本
④ 10 mM each dNTPs	1 本
⑤ 50 mM MgCl <sub>2</sub>	1 本
⑥ 10×PP Mix*1	1 本
⑦ Internal Control*2	1 本
⑧ Positive Control (100 copies/μL)	1 本
⑨ 試薬調製用 1.5 mL チューブ	12 本
⑩ PCR 反応用 8-Strip, Cap	各 12 本

\*1：10×PP Mix は蛍光プローブを含むため、遮光に留意してください。

\*2：Internal Control はリファレンスとして使用します。検体中にターゲット以外の核酸や阻害物質が大量に含まれる場合は検出されない可能性があります。

### 使用目的

細胞培養液より抽出した細菌遺伝子の検出。

### 操作上の注意

- 反応試薬中のプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入によって分解されると、正確な検出ができません。実験器具・器材以外にも使用者の汗や唾液からヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作には注意してください。
- サンプルのコンタミネーションを防ぐため、サンプル調製・核酸抽出と反応試薬調製は物理的に隔離することを推奨します。困難な場合は、次の作業へ移る前にUV照射や作業スペースの清掃などを行ってください。
- 試薬使用後、試薬チューブのフタをしっかりと閉め保管してください。蛍光試薬が含まれていますので、遮光に注意してください。
- 試薬チューブ破損の恐れがあるので、高所から落としたり、強い衝撃を加えたりしないよう注意して使用してください。
- Positive Controlは、使用前によく混和し、スピンドウンしてから使用してください。
- 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。
- リアルタイムPCR装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。
- 本キットはリアルタイムPCR法を用いており、増幅と検出が同時に行われ

るため、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。コンタミネーションの原因となりますので、増幅産物をPCR用チューブ等から取り出すことはおやめください。

### 用法・用量（操作方法）

#### 【必要な器具】

必要に応じて以下の器具及び器材を準備してください。

ミキサー、マイクロピペット、マイクロチューブ（滅菌済、低吸着、DNase・RNase Free）、フィルターチップ（滅菌済、低吸着、DNase・RNase Free）、遠心分離機、ヒートブロック、リアルタイムPCR装置（FAM、HEXが検出可能なリアルタイムPCR装置）

#### 【操作方法】

##### 1. 核酸抽出方法

市販の核酸抽出キットを用いて検体から核酸を抽出してください。事前に抽出効率等について評価を行うことを推奨します。

リファレンスとして1サンプルあたり2.5 μL程度のInternal Controlを添加し、核酸抽出を行ってください。

##### 2. 試薬の調製方法

- DNA Free Water、10×PCR Buffer、10 mM each dNTPs、50 mM MgCl<sub>2</sub>、10×PP Mixを融解し、ミキサーでしっかりと混和後にスピンドウンします。DNA Polymeraseはスピンドウン後に氷上に保管します。
- 氷上でPCR反応液マスターミックスを調製します。分注ロス等を考慮し、必要なマスターミックス量を調整してください（反応液の組成は下記の＜PCR反応液組成＞をご確認ください）。
- 2)で作製したマスターミックスをPCR用チューブまたはプレートに15 μLずつ分注します。
- 陰性ランコントロール（Negative Control）としてDNA Free Waterを、陽性ランコントロールとしてPositive Controlを10 μLずつ添加します。Negative ControlおよびPositive Controlは試験毎に測定してください。
- 検体の核酸抽出液を10 μLずつ添加します。
- PCRチューブまたはプレート内の反応液をピペッティングまたはミキサーで混合し、スピンドウンします。

#### ＜PCR反応液組成＞

試薬	液量（1反応分）
DNA Free Water	8.5 μL
10×PCR Buffer	2.5 μL
10×PP Mix	2.5 μL
10 mM each dNTPs	0.5 μL
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75 μL
DNA Polymerase	0.25 μL
Total	15 μL

##### 3. リアルタイムPCRによる検出

BioRad社のCFX Connectのプロトコル例を示します。

- リアルタイムPCR装置の蛍光検出波長をFAM・HEXに設定します。
- リアルタイムPCRのプログラムの設定は、下記のプロトコルを基準に設定してください。設定方法については、お使いのリアルタイムPCR装置の取扱説明書に従って行ってください。

#### ＜PCRプログラム＞

温度	時間	Cycle数	蛍光検出
95°C	10 sec	1 cycle	なし
95°C	10 sec	45 cycles	あり (FAM・HEX)
66°C	1 min		

※PCRステップのはじめの1サイクルはバックグラウンドシグナル検出の可能性があるので、蛍光検出は行わないでください。

※Passive Reference設定がある場合は、「None」を選択し、測定を開始してください。

### 測定結果の判定法

リアルタイムPCR装置の解析ソフトを用いて結果判定を行います。Cq値が算出された場合は陽性、算出されない場合は陰性と判断してください。

BioRad社のCFX ConnectではRegression法、Baseline Subtracted Curve Fitモードでの解析を推奨します。解析後は、増幅曲線を確認し、Cq値が正しく算出されていることを確認してください。核酸抽出液の精製度、試薬の混和不良、泡立ちなどの原因により、Regression法で正しく解析されない場合には、Single threshold法などで解析してください。解析ソフトの使用方法は、ソフト付属のマニュアルに従ってください。

### 判定に関する注意事項

- 1) 細菌項目、Positive Controlは全てFAMで検出されます。リファレンス (Internal Control) は全てHEXで検出されます。
- 2) リファレンス (Internal Control) は、他の核酸が大量に存在する場合には検出されないことがあります。
- 3) リアルタイムPCR装置や解析方法によっては、ごく稀にバックノイズシグナルからCq値を算出している場合があります。試験後は必ず増幅曲線を確認し、得られたCq値が核酸増幅の行われた結果に由来していることを確認してください。

### 性能

#### 1. 感度・正確性試験

Negative Controlをサンプルとして試験するとき、蛍光増幅が検出されません。Positive Controlをサンプルとして試験するとき、35サイクル以内に陽性となります。

#### 2. 製品性能データ等

詳細な性能データにつきましては、製造販売元営業担当又はカスタマーサポート担当にお問い合わせください。

### 使用上または取扱い上の注意

#### 1. 取扱い上（危険防止）の注意

- 1) 検体は感染の恐れがあるものとして取扱ってください。
- 2) 試薬が目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師などに相談し、指示を受けてください。
- 3) DNA Polymeraseは、グリセリンを40%以上含んでいます。火気の近くでは使用しないでください。

#### 2. 使用上の注意

- 1) 貯蔵方法（-30～-15℃）に従い、保存してください。
- 2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 3) 製造番号の異なる試薬を混合して使用しないでください。
- 4) 他の目的に転用しないでください。

#### 3. 廃棄上の注意

- 1) コンタミネーションを避けるため、PCR反応後のチューブやプレートは蓋を開けずに密閉できるビニール袋を2重にし、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物として処理してください。PCR増幅産物は飛散を防止するためオートクレープ処理を行わないでください。
- 2) 検査に使用した試薬・器具等を廃棄する場合、廃棄物の処理及び清掃に関する法律及び水質汚染防止法等の規定に従って医療廃棄物、産業廃棄物、または感染性廃棄物として処理してください。

### 貯蔵方法・有効期間

#### 【貯蔵方法】

-30～-15℃で保存してください。

#### 【有効期間】

製造日から6ヶ月

※外装および容器のラベルに使用期限を表示してあります。

### 包装単位

細菌用無菌試験試薬 Preversion 50テスト用 …… Code 66232

### 関連製品

真菌用無菌試験試薬 Preversion 50テスト用 …… Code 66233

### 問い合わせ先

〒110-0005 東京都台東区上野 3-24-6

島津ダイアグノスティクス株式会社 カスタマーサポート担当

電話 03(5846)5707

製造販売元

**島津ダイアグノスティクス株式会社**

東京都台東区上野 3-24-6 〒110-0005 TEL 03(5846)5611 (代)