

マイコプラズマ遺伝子検出キット

Myco Finder

取扱説明書

—— 特徴 ——

本品は細胞培養液より抽出したマイコプラズマ遺伝子をリアルタイムPCRによって検出するキットです。また、本品は2種のテストストリップに反応試薬が全て固相化されているため、試薬調製が容易であり、簡単な操作で短時間に結果を得ることができます。

—— 全般的な注意 ——

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 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・構造等（キットの構成） ——

- | | | | |
|---|---|-------|---------|
| ① | テストストリップA（白色 8 ウェル） | | 6 Strip |
| ② | テストストリップB（透明 8 ウェル） | | 6 Strip |
| ③ | 陽性コントロール（ 2×10^3 copies / μ L） | | 1 本 |
| ④ | 陰性コントロール（DNase Free Water） | | 1 本 |
| ⑤ | フラットキャップ | | 6 本 |

—— 使用目的 ——

細胞培養液より抽出したマイコプラズマ遺伝子の検出。

—— 操作上の注意 ——

- 1) 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。
- 2) 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・DNA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。
- 3) テストストリップは必要分をアルミ袋から出し、残りはチェックをししっかり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。
- 4) テストストリップは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。
- 5) 陽性コントロールは、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。
- 6) 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。
- 7) リアルタイムPCR装置の取扱い、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。
- 8) 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、増幅産物をテストストリップ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、フィルターチップ（滅菌済、DNase・RNase Free）、遠心分離機、遠心チューブ、リアルタイムPCR装置

【 操作方法 】

1. DNA抽出方法

QIAGEN 社の QIAamp UCP DNA Micro Kit を用いた抽出方法を示します。

他の市販の DNA 抽出キットを用いる事も可能ですが、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。

- 1) 細胞培養液または細胞培養液を遠心濃縮した細胞懸濁液 200 μ L に Proteinase K 20 μ L、Buffer AUL 200 μ L を添加し、ミキサーで混和します。
- 2) 56°C、15 分間インキュベートします。
- 3) 99% エタノールを 200 μ L 添加し、ミキサーで混和します。
- 4) 全量をスピニングカラムへ移し、6,000 $\times$ g（8,000 rpm）、1 分間遠心します。
- 5) スピニングカラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AUW1 を 500 μ L 添加します。6,000 $\times$ g（8,000 rpm）、1 分間遠心します。
- 6) スピニングカラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AUW2 を 500 μ L 添加します。20,000 $\times$ g（14,000 rpm）、3 分間遠心します。
- 7) スピニングカラムを新しいコレクションチューブに移し、カラムを空のまま 20,000 $\times$ g（14,000 rpm）、1 分間遠心します。
- 8) カラム内に液残りがいないことを確認します。
- 9) スピニングカラムを別途準備した遠心チューブに移し、Buffer AUE を 100 μ L 添加します。室温（15 ～ 25°C）で 5 分間インキュベートします。
- 10) 6,000 $\times$ g（8,000 rpm）、1 分間遠心し、得られたサンプルを用いて試薬調製を行います。

※本キットにおける無細胞検体からの集菌処理方法（特願 2019-514548）については、販売元営業担当またはカスタマーサポート担当にお問い合わせください。

2. 試薬の調製方法

- 1) アルミ袋からテストストリップAとテストストリップBを必要なテスト分取り出します。
- 2) テストストリップAにDNA抽出で得られたサンプル25 μ Lを添加し、穏やかに20回ピペッティングして固相化試薬を溶解します。サンプルは適宜希釈して使用してください。
- 3) テストストリップAの溶解したサンプル全量をテストストリップBへ移し、穏やかに20回ピペッティングして固相化試薬を溶解します。
- 4) テストストリップBにフラットキャップを装着し、リアルタイムPCRによる検出を行います。
※白色チューブで検出する際は、先にテストストリップBにサンプルを添加し、溶解後にテストストリップAに移してください。

3. リアルタイムPCRによる検出

BioRad社のCFX96のプロトコール例を示します。

- 1) リアルタイムPCR装置の蛍光検出波長をFAM + ROX（又はFAM + HEX）に設定します。なお、各蛍光は下記の検出に使用されます。
 - ① マイコプラズマの検出 : FAM
 - ② 陽性コントロールの検出 : FAM + ROX（又はFAM + HEX）
- ※リアルタイムPCR実施前に、複数の蛍光を取得するための蛍光フィルターの設定が必要となります。BioRad社のCFX96を使用する場合は、Scan ModeをAll channelsにすることで、搭載されている全てのフィルターのデータを読み込むように設定することができます。

2) 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。

95℃ 10Sec
98℃ 3Sec } 45cycle
60℃ 1Sec }

——— 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。
BioRad社のCFX96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。DNA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。

——— 判定に関わる注意事項 ———

- リアルタイムPCR装置の蛍光検出波長をFAM + ROXの組み合わせで使用する場合、マイコプラズマ陽性検体はFAMの蛍光強度が増加し、陽性コントロールはFAMとROXがほぼ同じサイクル数 (Cq値) で蛍光強度が増加します。また、陰性コントロール又は陰性サンプルの場合、蛍光強度は増加しません。
- リアルタイムPCR装置の蛍光検出波長をFAM + HEXの組み合わせで使用する場合は、HEXの検出にFAMの蛍光が漏れこむことがあるので注意が必要です。

——— 性 能 ———

1. 感度・正確性試験

M. arginini, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hyorhinis*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*のプラスミドスタンダード (10 copies / test)を陽性管理検体、陰性コントロール (DNase Free Water)を陰性管理検体として本品で試験する場合、陽性管理検体は全て陽性、陰性管理検体は全て陰性を示します。

2. バリデーションデータ

詳細なバリデーションデータにつきましては、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。

**, * 3. 実施例等の追加情報

実施例等の情報につきましては、下記 URL をご参照ください。
<https://cell-culture.biz.sdc.shimadzu.co.jp/reagent/mycoplasma/myco-finder/>

——— 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

検体は感染の恐れがあるものとして取扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるため、防護具 (眼鏡、手袋、マスク等) を着用の上、十分に注意をしてください。

2. 使用上の注意

- 本品は凍結を避け、貯法 (2 ~ 8℃) に従い、保存してください。
- 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 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。
- 他の目的に転用しないでください。

3. 廃棄上の注意

- コンタミネーションを避けるため、PCR反応後のテストストリップはフラットキャップ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反応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。
- 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 】

2 ~ 8℃で保存してください。

【 有効期間 】

製造日から12ヵ月

※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 ———

Myco Finder 48テスト用 Code 69202

* ——— 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

* 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)

製造元

日本テクノサービス株式会社

茨城県牛久市中央 1-19-1 〒300-1234 TEL 029 (886) 6811 (代)