

BactFinder/FungiFinder

前処理プロトコル例

高感度試験法編

2025年5月20日
島津ダイアグノスティクス株式会社
製品開発部

事前にご準備いただくもの

下記に示すリストは一例であり、これらの使用に限定するものではありません。

●試薬

試薬名	メーカー	型番	対応プロトコール	
			迅速法	高感度法
D-PBS(-)	富士フイルム和光純薬	045-29795	○	○
エタノール	富士フイルム和光純薬	054-07225	○	○
QIAamp UCP DNA Micro Kit	QIAGEN	56204	○	○
塩化ナトリウム 溶液	Sigma-Aldrich	S8776	○	○
TurboNuclease 250units/μL	Accelagen	N0103M	○	○
1M MgCl2	ニッポンジーン	310-90361	○	○
破碎ビーズ	島津ダイアグノスティクス	69247	○	○
BactFinder™ / FungiFinder™	島津ダイアグノスティクス	69245/69246	○	○
無菌試験前培養用培地セット	島津ダイアグノスティクス	66244	—	○

●機器

機器	メーカー	型番	対応プロトコール	
			迅速法	高感度法
クリーンベンチ	—	—	○	○
遠心機 (20,000×G対応、4°Cの設定が可能なもの)	—	—	○	○
遠心機用1.5 mLチューブ対応ローター	—	—	○	○
遠心機用15 mLチューブ対応ローター	—	—	—	○
ヒートブロック (37°Cが可能なもの)	—	—	○	○
破碎機	例) TAITEC	例) μ T-12	○	○
マイクロピペット (100–1000 μL)	—	—	○	○
マイクロピペット (20–200 μL)	—	—	○	○
マイクロピペット (2–20 μL)	—	—	○	○
マイクロピペット (0.5–10 μL)	—	—	○	○
リアルタイムPCR装置 (0.1mLチューブ対応、必要な蛍光：FAM/HEX or VIC)	—	—	○	○
電動ピペッター (あると便利)	—	—	—	○

●容器等

資材 (推奨品)	メーカー	型番	対応プロトコール	
			迅速法	高感度法
1.5mLチューブ (サンプル調製用) ※	ザルスタット	72.706.400	○	○
1.5mLチューブ (溶出用) ※	ザルスタット	72.706.200	○	○
フィルターチップ (各種) 滅菌 ※	—	—	○	○
15mL遠沈管※	ビオラモ	VIO-15BN	—	○
注射針 (22G~25G程度)	—	—	—	○
シリンジ (5 mL容) 滅菌	—	—	—	○
ディスポーザブルピペット (10 mL) 滅菌	—	—	—	○

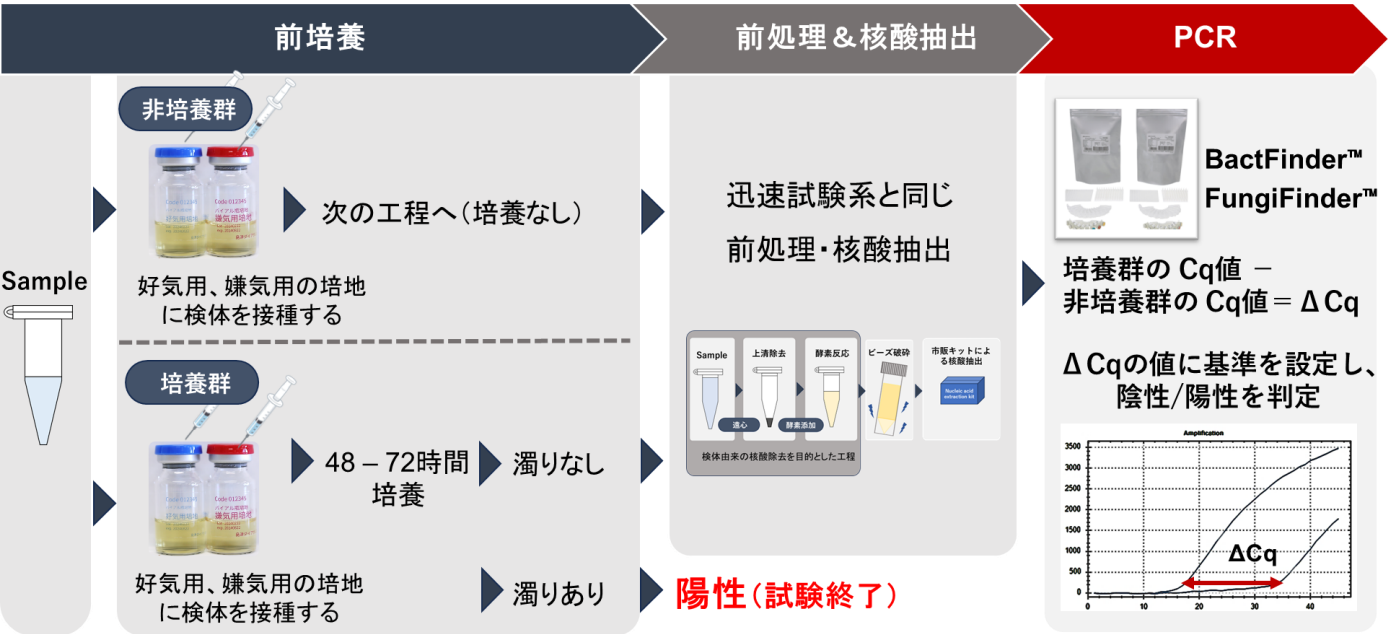
※DNase・RNaseフリー、最大遠心強度20000 Gであるものならば別品可

当社販売試薬

製品名	製品コード	包装	貯蔵方法
BactFinder	69245	50 テスト	-30～-15℃
FungiFinder	66246	50 テスト	-30～-15℃
破碎ビーズ	69247	50 回用	室温



前培養からリアルタイムPCRまでの流れ（当社実施例）

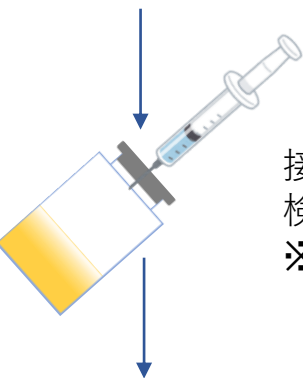


検体接種および培地回収のフロー

< 検体の接種 >



使用する好気培養用培地、嫌気培養用培地を室温に戻す。
培養前測定用、培養後測定用で1検体につき各2本ずつ、
計4本用意する。



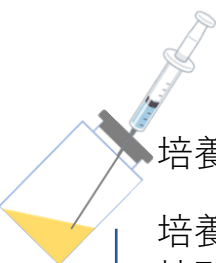
接種時に大量の空気が入らないよう注意しながら、
検体 (~ 100 μ L) を注射針を用いて接種する。
※検体は事前に濃縮や Buffer 置換等の処理が可能

培養前測定用培地は核酸抽出へ、
培養後測定用培地は培養 (48時間※) へ

※培養時間は変更可

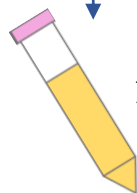
詳細は
6ページ

< 培地からの核酸抽出 >



培養前測定用の培地は接種直後に液を回収し、核酸抽出を行う。

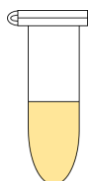
培養後測定用の培地は規定時間の培養後に液を回収し、
核酸抽出を行う。



注射針を用いて各培地を回収し、15 mL 遠沈管にまとめる。



検体を 20,000 $\times$ g、4°C で 10 分遠心後、上清 8.5 mL を除く。

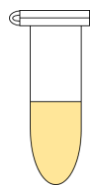


ペレットを再懸濁し、全量を 1.5 mL チューブに移す。

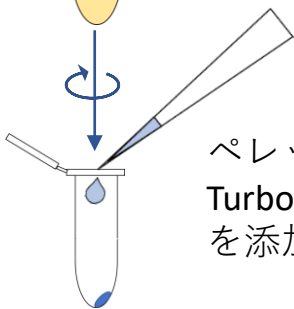
詳細は
6ページ

前処理＋核酸抽出操作フロー

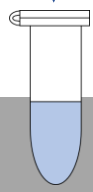
前処理および核酸抽出方法は試験者の任意であり下記の方法に限定するものではありません。



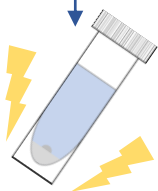
検体を $20,000 \times g$ 、 4°C で 15 分遠心後、上清を除く。



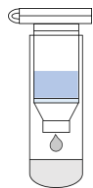
ペレットに対し、塩化ナトリウム溶液を $495 \mu\text{L}$ 、
TurboNuclease $250 \text{ units}/\mu\text{L}$ を $3.5 \mu\text{L}$ 、 1 M MgCl_2 を $1.5 \mu\text{L}$
を添加し、良く混和する。



37°C で 1 時間反応させる。



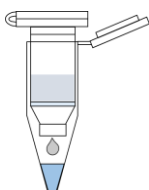
溶液全量を破砕ビーズのチューブに移し、Buffer AUL $500 \mu\text{L}$ 添加後、 $3,200 \text{ rpm}$ で 10 分間振盪する。振盪後、 $20,000 \times g$ で 5 分間遠心し、気泡を取り除き、エタノール (99.5) を $500 \mu\text{L}$ 添加する。



ビーズチューブ内の溶液のうち $650 \mu\text{L}$ をスピncラムに移す。
 $6,000 \times g$ で 1 分間遠心後、フロースルーを除去しスピncラムを戻し、残りの液を再度スピncラムに移して、同じ条件で遠心する。



新しいコレクションチューブにスピncラムを移し、Buffer AUW1 を $500 \mu\text{L}$ 添加後、 $6,000 \times g$ で 1 分間遠心する。再度、新しいコレクションチューブにスピncラムを移し、Buffer AUW2 を $500 \mu\text{L}$ 添加後、 $20,000 \times g$ で 1 分間遠心した後、フロースルーを除去しスピncラムを戻す。
 $20,000 \times g$ で 1 分間遠心し、スピncラム内の液を完全に除去する。

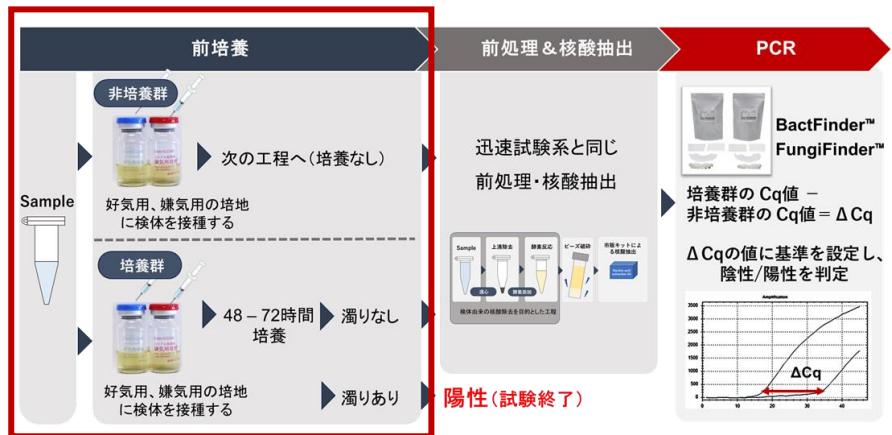


1.5 mL チューブにスピncラムをセットし、スピncラムに Buffer AUE を $40 \mu\text{L}$ 添加する。室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) で 1 分間静置する。
 $20,000 \times g$ で 1 分遠心し、フロースルーを回収する。

詳細は
7ページ

詳細は
8ページ

前培養工程



前培養用培地への検体接種

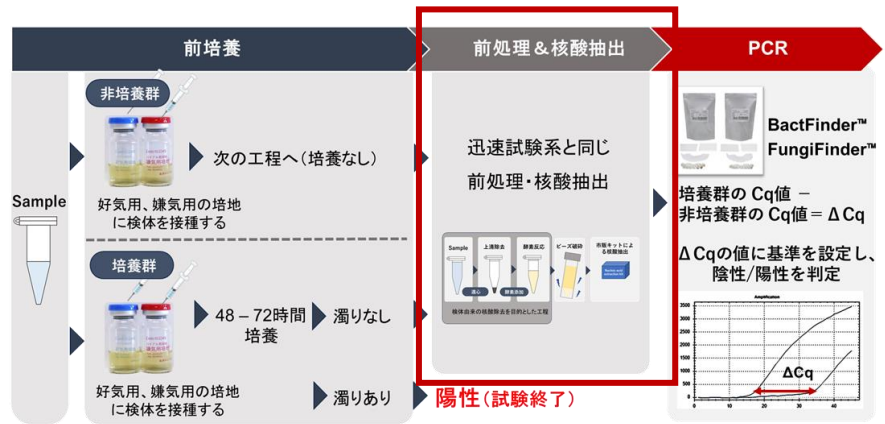
※必要に応じて事前に検体の Buffer 置換、濃縮等を行う。

1. 好気培養用培地、嫌気培養用培地、各 2 本を室温に戻す（1 時間程度放置）。
2. 培地のキャップを開け、各培地に検体（100 μL）を接種する。
3. 培養後測定用の培地をインキュベーターに入れ、一定期間培養する。
（好気培養用培地は 30°C ± 1°C、嫌気培養用培地は 35°C ± 1°C）
4. 培養前測定用の培地は以降の核酸抽出ステップに移行する。

前培養培地からの検体の回収 培養前、培養後共通

1. 好気用・嫌気用共に、培地入りバイアル瓶のゴム栓上部をアルコール綿で拭く。
2. シリンジ（容量 5 mL 以上）に注射針（22～25 G 程度）を取り付ける。
3. バーナーでバイアル瓶のゴム栓を軽く炙ってから、注射針を刺し、中の培地を吸い出す。
4. 吸い出した培地を 15 mL 容の遠沈管（20,000 G 対応）に移す。
5. もう片方の培地も同様の方法で培養液を回収し、同じ 15 mL 容遠沈管にまとめる。※作業は好気⇒嫌気の順をお勧めします。
6. 15 mL 容遠沈管を 20,000 × g、4°C で 10 分遠心後、上清 8.5 mL を除く。

検体の前処理



前培養検体の前処理

前処理および核酸抽出方法は試験者の任意であり下記の方法に限定するものではありません。

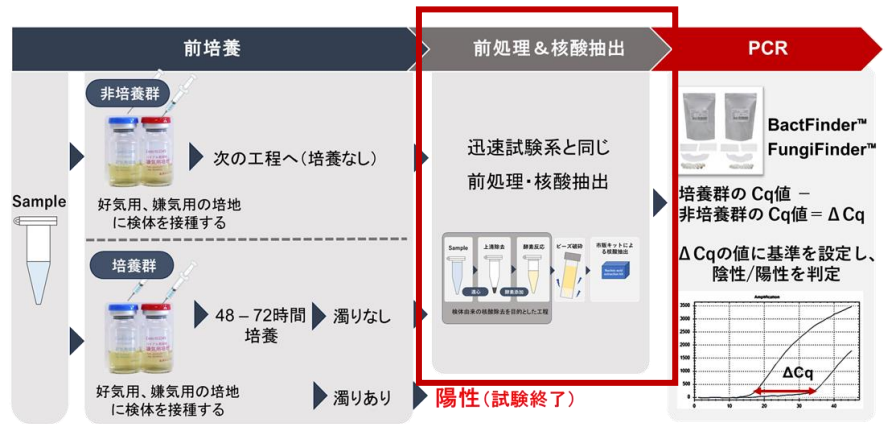
1. 検体を 1.5 mL チューブに移す。
2. $20,000 \times g$ 、 4°C で 15 分遠心後、可能な限り上清を除く。
3. ペレットに対し、塩化ナトリウム溶液を $495 \mu\text{L}$ 、TurboNuclease 250 units/ μL を $3.5 \mu\text{L}$ 、1M MgCl_2 を $1.5 \mu\text{L}$ 加える。
4. 10 回ピペッティングした後、ボルテックスで 5 秒間混和する。
5. 37°C で 1 時間反応させる。
6. 反応後にサンプルをスピンドウンしてから、溶液全量を破砕ビーズのチューブに移す。
7. Buffer AUL $500 \mu\text{L}$ を破砕ビーズのチューブに添加する。

※ Buffer AULはQIAamp UCP DNA Micro Kit (QIAGEN) に付属している試薬である。

8. 破砕機にセットして $3,200 \text{ rpm}$ で 10 分間振盪させる。
9. $20,000 \times g$ で 5 分間遠心し、気泡を取り除く。
10. 必要に応じて Internal Control を添加する。
11. 10 秒間ボルテックスで混和し、スピンドウンする。
12. 破砕ビーズのチューブにエタノール (99.5) を $500 \mu\text{L}$ 添加する。
13. ボルテックスで 10 秒間で攪拌した後、スピンドウンする。

➡ カラムを用いた核酸抽出工程へ

核酸抽出工程



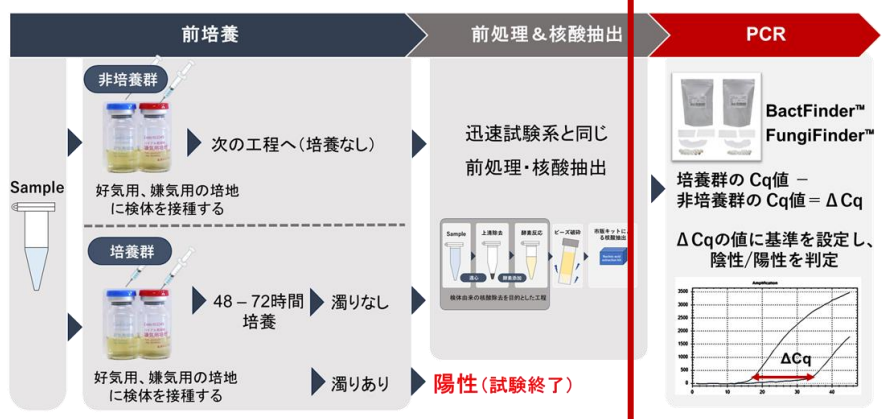
カラムを用いた核酸抽出

下記はQIAamp UCP DNA Micro Kit (QIAGEN) を使用した例を示しています。

14. 13)の溶液のうち 650 μL をスピンカラムに移す。
15. 6,000 $\times g$ で 1 分間遠心後、フロースルーを除去しスピンカラムを戻す。
16. 13)の溶液のうち再度 650 μL をスピンカラムに移す。
17. 6,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。
18. 新しいコレクションチューブにスピンカラムを移し、Buffer AUW1 を 500 μL 添加する。
19. 6,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。
20. 新しいコレクションチューブにスピンカラムを移し、Buffer AUW2 を 500 μL 添加する。
21. 20,000 $\times g$ で 1 分間遠心した後、フロースルーを除去しスピンカラムを戻す。
22. 20,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、スピンカラム内の液を完全に除去する。
23. 1.5 mL チューブにスピンカラムをセットし、スピンカラムに Buffer AUE を 40 μL 添加する。
24. 室温 (15~25°C) で 1 分間静置する。
25. 20,000 $\times g$ で 1 分遠心し、フロースルーを回収する。

➡ リアルタイムPCRによる測定へ (添付文書参照)

PCR



※BactFinder/FungiFinderの添付文書をよくご確認の上ご使用ください。

反応液組成

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

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		

* HEX非対応の場合は、HEX と最大蛍光波長の近いもので測定