

BactFinder/FungiFinder

前処理プロトコル参考例

迅速試験法編

2025年5月20日

島津ダイアグノスティクス株式会社

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	迅速法
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 (0.9%)	Sigma-Aldrich	S8776	○
TurboNuclease 250units/μL	Accelagen	N0103M	○
1M MgCl2	ニッポンジーン	310-90361	○
破砕ビーズ	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	○

●機器

機器	メーカー	型番	迅速法
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	—	—	○
ヒートブロック (37°Cが可能なもの)	—	—	○
破砕機	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)	—	—	○

●容器等

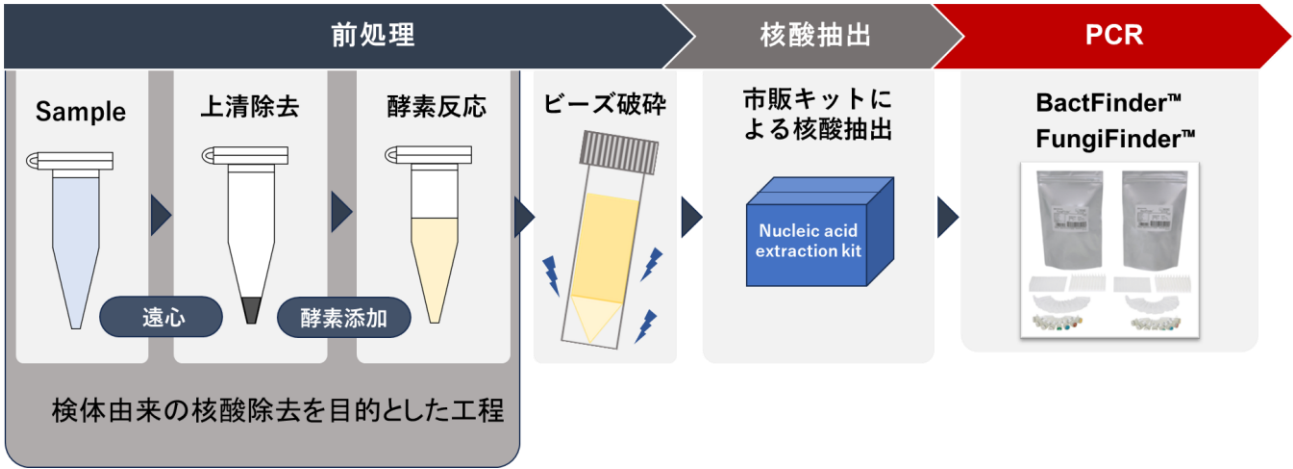
資材 (推奨品)	メーカー	型番	迅速法
1.5mLチューブ (サンプル調製用)	ザルスタット	72.706.400	○
1.5mLチューブ (溶出用)	ザルスタット	72.706.200	○
フィルターチップ (各種) 滅菌	—	—	○

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

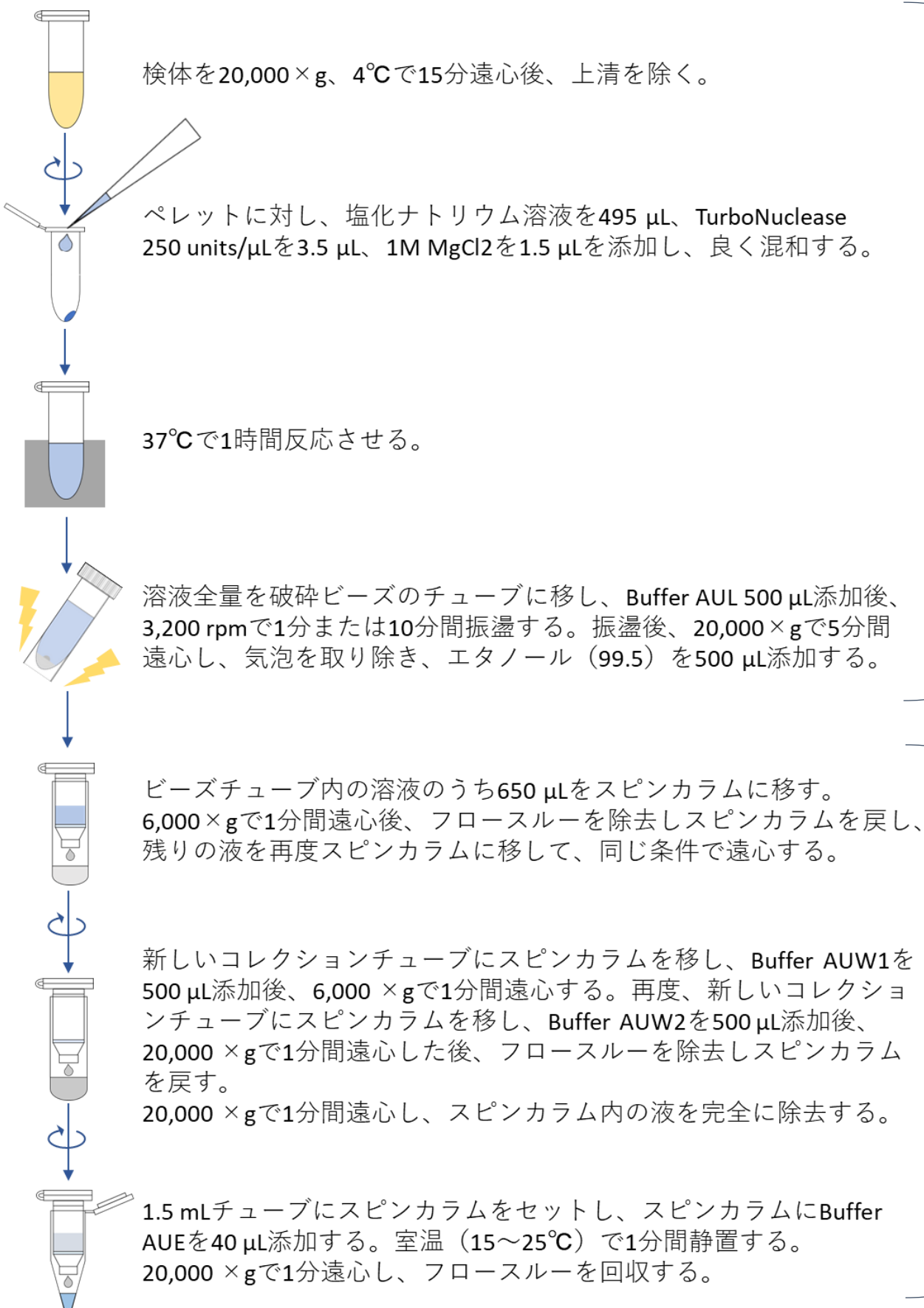


前処理からリアルタイムPCRまでの流れ（当社実施例）



前処理 + 核酸抽出操作フロー

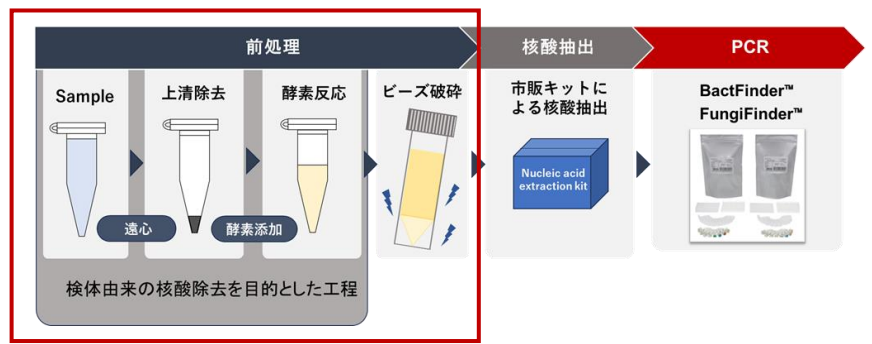
前処理および核酸抽出方法は試験者の任意であり下記の方法に限定するものではありません。



詳細は
5ページ

詳細は
6ページ

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)の工程が実施可能な容器、量であればこの例に限らない。
2. 20,000 × 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 μL、TurboNuclease 250 units/μLを3.5 μL、1M MgCl₂を1.5 μL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 μL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 rpmで1分間または10分間振盪させる。
※微生物によって最適な振盪条件が異なるため2条件での処理を推奨。
9. 20,000 × 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 μL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

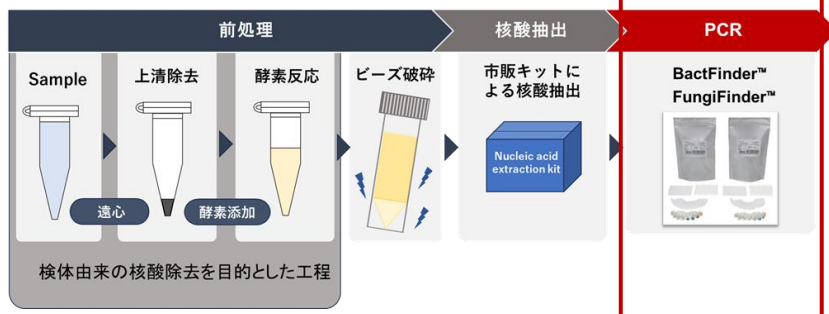


下記はQIAamp UCP DNA Micro Kit (QIAGEN) を使用した例を示しています。

14. 13)の溶液のうち 650 μL をスピнка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нкаラムを戻す。
16. 13)の溶液のうち再度 650 μL をスピнка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нка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нка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нкаラムを戻す。
22. 20,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、スピнкаラム内の液を完全に除去する。
23. 1.5 mLチューブにスピнкаラムをセットし、スピнка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 (詳しい手順は添付文書参照)

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 $\times$ PCR Buffer	2.5 μ L
10 $\times$ 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 μL

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

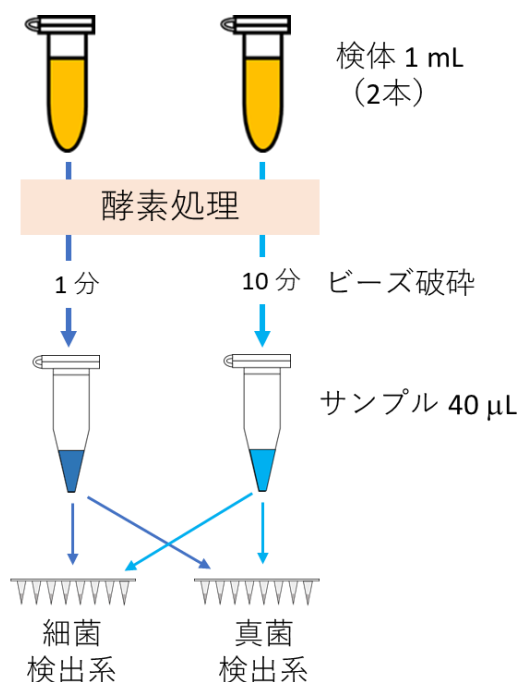
迅速試験法の試験サンプルについて

試験サンプルの構成は任意であり、被検体の特性や目的に適う方法を選択してください。

1 抽出あたりの細胞数の上限は 1×10^6 cells です。これを超える場合、PCR阻害が起こる場合があります。

下記は 1×10^6 cells/mL の検体を想定した例であり、抽出の工程は簡略化して示されています。

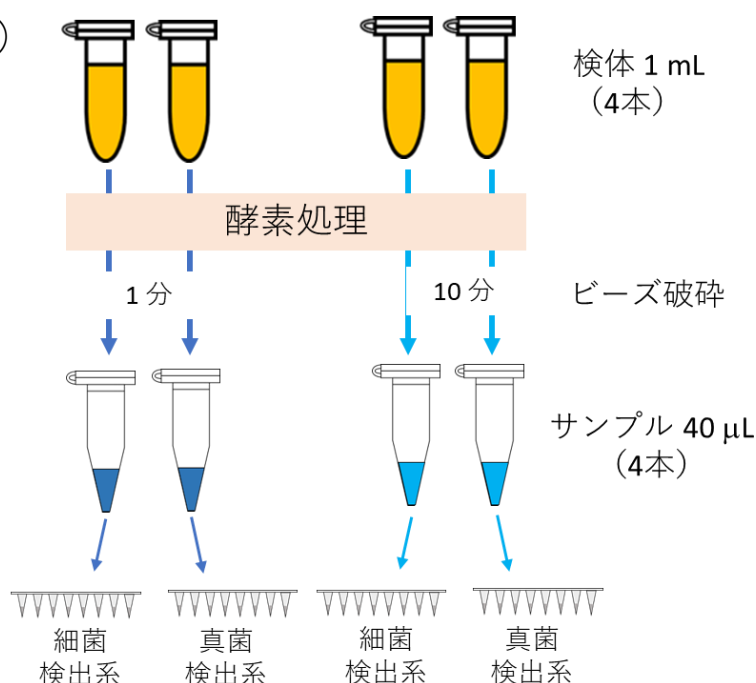
例①



破碎条件によって2種のサンプルを調製し、各チューブを細菌又は真菌検出系で試験する。
(1 検体 2 ウェル)

※Internal Control は細菌用、真菌用の両方を添加する

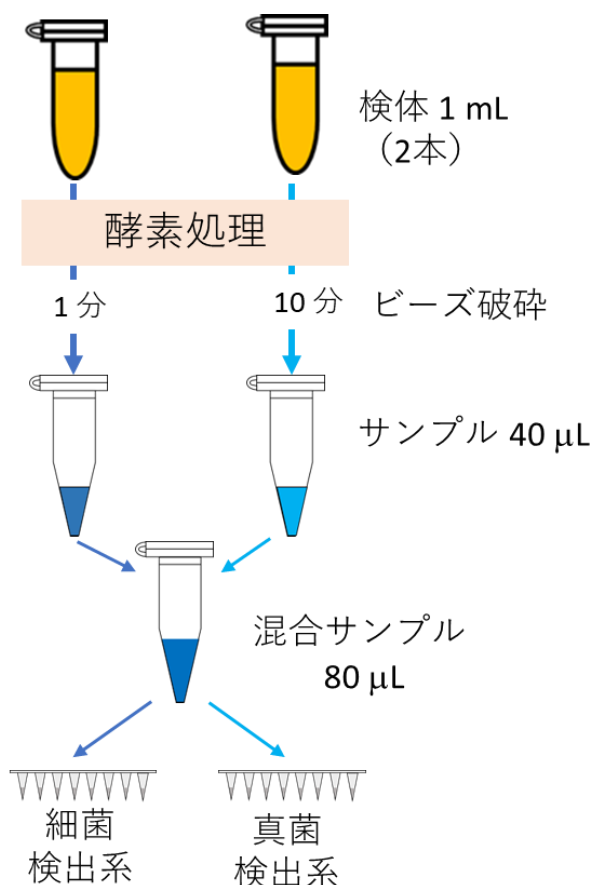
例②



破碎条件によって2種のサンプルを2本ずつ調製し、チューブ毎に測定する。
(1 検体 2 ウェル)

※Internal Control は細菌用は細菌検出系用サンプルへ、真菌用は真菌検出系用サンプルへ添加する

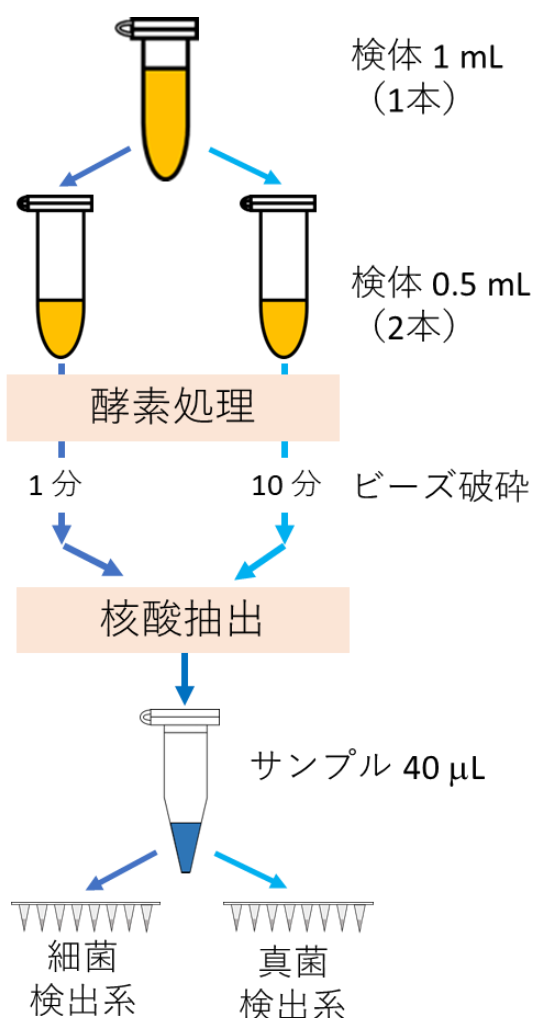
例③



破碎条件によって2種のサンプルを調製し、混合したものをそれぞれの検出系で測定する。
(1 検体 1 ウェル)

※Internal Control は細菌用、真菌用の両方を添加する

例④



検体 1 mL を破碎条件によって2つに分け、それぞれ別々に前処理を行い、カラムを用いる工程で1本にまとめ、以降の核酸抽出を行い、得られたサンプルをそれぞれの検出系で測定する。
(1 検体 1 ウェル)

※Internal Control は細菌用、真菌用の両方を添加する