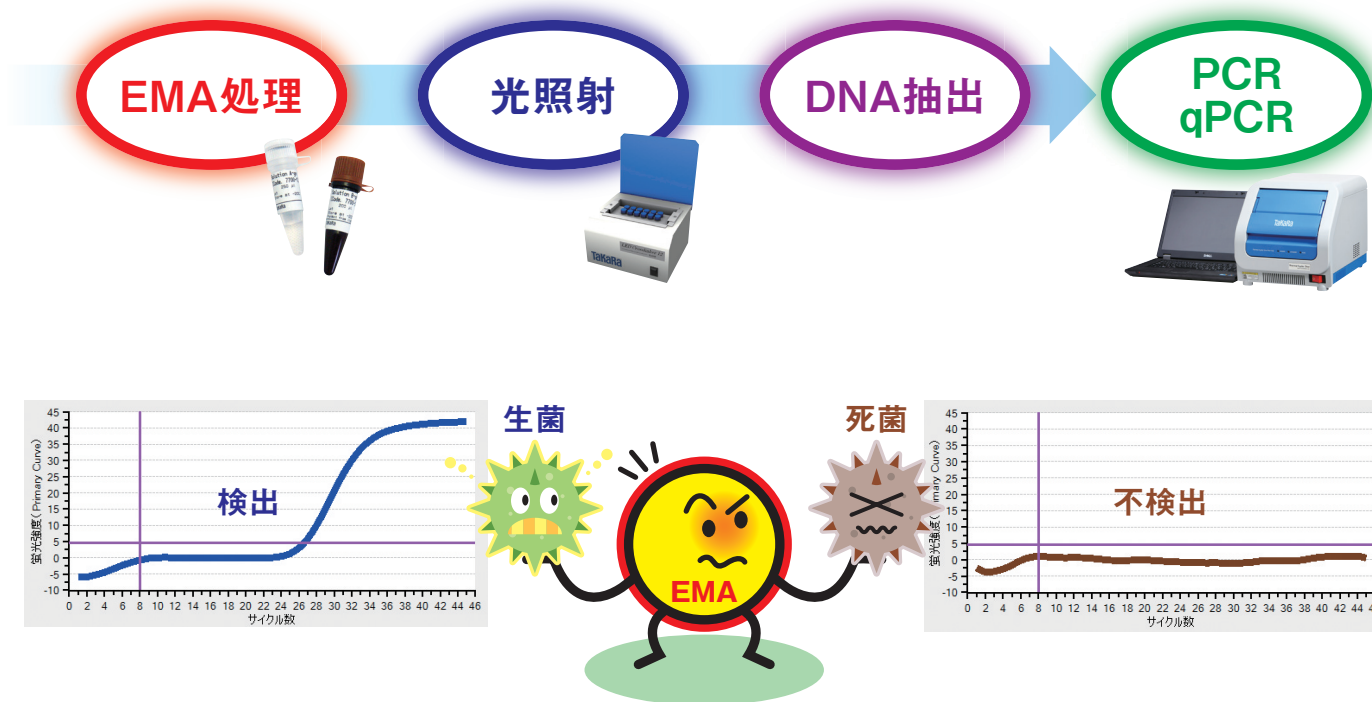


タカラバイオの新技术

PCR・qPCRによる 生菌由来DNAの選択的な検出法

(2018年1月改訂版)



- 生菌由来DNAを選択的に検出するシステム
- さまざまなリアルタイムPCR (qPCR) / PCR検出系と組み合わせて使用可能
- グラム陰性菌用、陽性菌用の汎用試薬に加え、特定菌専用試薬もラインナップ!

こんな方におすすめです!

- 殺菌・消毒効果の検証を迅速に行いたい。
- PCRによる保菌検査で生菌由来であることを証明したい。
- 腸内細菌の生存率を解析したい。
- 培養タンクや環境中での菌生存率の検証を行いたい。
- 製造ラインの工程管理をスピーディーに行いたい。
- 培養困難な微生物を検出したい。

…など、様々な分野でご利用ください。



遺伝子検査の課題である「生菌だけでなく死菌由来DNAも検出する」という点を解決しました！

EMA-PCR法とは…

EMA (ethidium monoazide) は可視光に暴露すると核酸に共有結合する選択的膜透過性色素です。生菌を含む検体にEMAを含む試薬を添加して光を照射しても、生菌では薬剤が内部に浸透せずDNAへの化学修飾は起こりませんが、死菌中のDNAやその他の検体に含まれるDNAはEMAと光照射により化学修飾を受けます。

EMAにより修飾されたDNAはPCR反応の鋳型とならないため、EMA処理後は生菌由来DNAのみが検出されます。

EMA-PCR法とは、EMAが死菌由来DNAを修飾し、修飾を受けたDNAがPCR増幅できない状態となることを利用して、生菌由来DNAを選択的に検出する方法です。

タカラバイオの独自技術により、EMA-PCR法の応用範囲が広がりました！

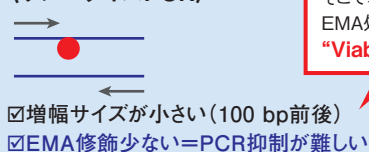
従来のEMA-PCR法は、エンドポイントPCRなど増幅サイズが大きい場合はEMAで修飾されやすく、死菌由来のPCR増幅を効率よく抑制できましたが、増幅サイズが小さい場合はEMAで修飾されにくく、死菌由来のPCR増幅の抑制効果が低いため、課題とされていました。

タカラバイオは、独自技術により死菌由来DNAのEMA修飾効果の向上を図り、増幅サイズが100 bp程度のリアルタイムPCR (qPCR) においても効果的に生菌由来DNAの選択的検出を行うことができる **Viable Bacteria Selectionシステム**を開発しました。

〈エンドポイントPCR〉

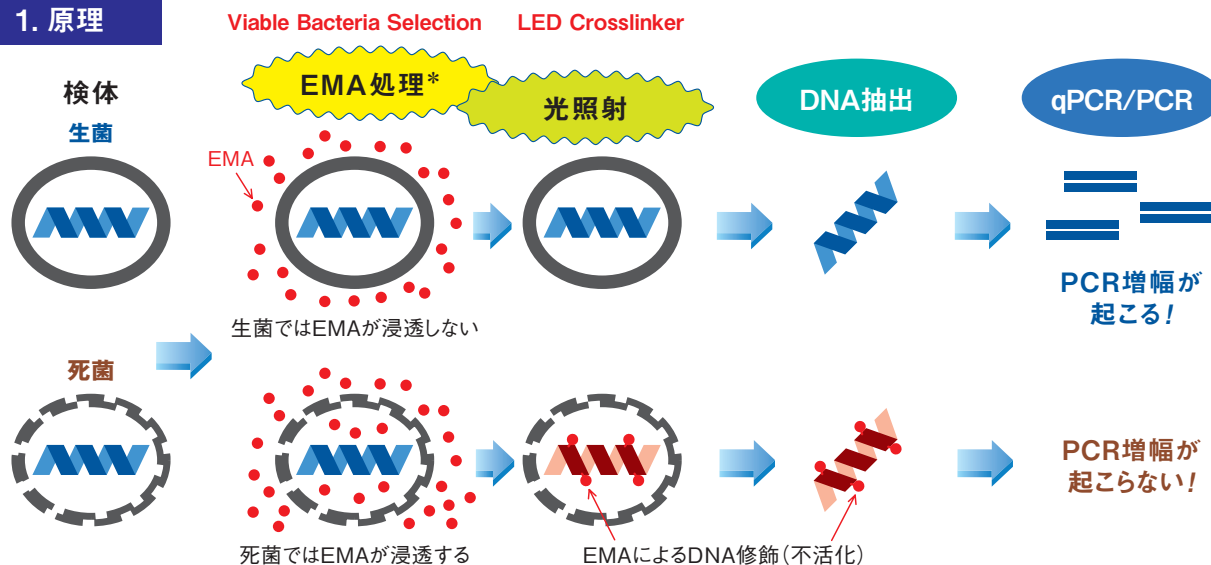


〈リアルタイムPCR〉



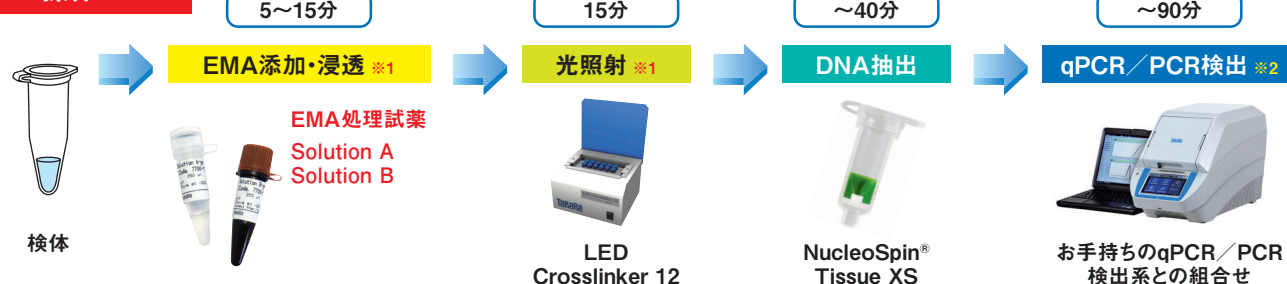
そこで、短鎖PCR増幅にも効果的なEMA処理法を開発！
“Viable Bacteria Selection”シリーズ誕生

1. 原理



*参考文献 Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K, Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*. 2003 Apr; 34(4):804-8, 810, 812-3.

2. 操作フロー



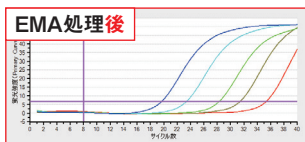
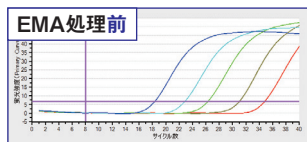
※1 EMA処理条件は、検出目的の菌種や検体の種類にあわせて最適化します。

※2 qPCR/PCR試薬は別途ご用意ください。

3. 検証データ (ビフィズス菌での検証)

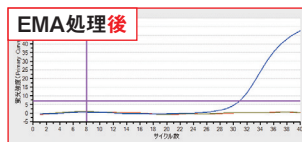
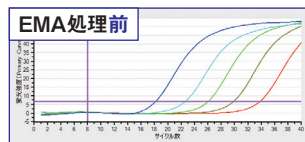
検証1：生菌への影響

培養したビフィズス菌 (*Bifidobacterium bifidum*) を生理食塩水に懸濁して生菌サンプルとして使用。 $6 \times 10^6 \sim 6 \times 10^2$ 個の生菌から、プロトコルに従ってEMA処理なし、EMA処理ありサンプルをそれぞれ調製し、リアルタイムPCR (インターカレーター法) で検出を行った。その結果、EMA処理あり／なしではほぼ同等の結果が得られ、本キットを用いたEMA処理によって検出感度には影響がないことが分かった。



検証2：死菌抑制効果

ビフィズス菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 生菌を90℃で2分間熱処理し死菌サンプルとして使用。 $6 \times 10^6 \sim 6 \times 10^2$ 個の死菌から、プロトコルに従ってEMA処理なし、EMA処理ありサンプルをそれぞれ調製し、リアルタイムPCR (インターカレーター法) で検出を行った。その結果、本キットを用いたEMA処理により、少なくとも 6×10^5 個までの死菌を完全に抑制可能であることが分かった。



【主要な製品】

EMA処理キット (グラム陰性菌用／グラム陽性菌用)

★お手持ちのPCR／qPCR検出系への応用が可能

EMA処理条件を最適化し、目的細菌の生菌由来DNA選択的検出系を構築することができます。

グラム陰性菌専用のEMA試薬

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (製品コード 7700)

〈製品内容〉 100検体分

•Solution A-gn	250 μ l $\times$ 4
•Solution B-gn	200 μ l $\times$ 8

グラム陽性菌専用のEMA試薬

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive) (製品コード 7705)

〈製品内容〉 100検体分

•Solution A-gp	500 μ l $\times$ 2
•Solution B-gp	200 μ l $\times$ 8
•Dilution Buffer	1 ml $\times$ 8



光照射装置

★ルーチン利用をより便利に！

高輝度LEDランプを搭載した専用装置を用いることで、精度の高い安定したデータが得られます。

光照射専用装置 (1.5 mlチューブ 12本を同時に処理可能)

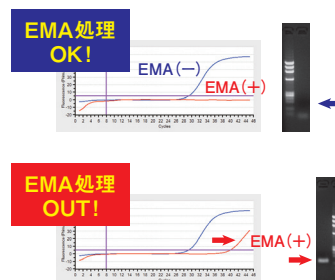
LED Crosslinker 12 (製品コード EM200)



EMA処理成否の確認用キット

★実検体におけるEMA処理の成否をチェック可能

EMA処理が正常に行われたかどうかを確認するための工夫が施されており、様々な夾雑物による影響が懸念される実検体における検証に便利です。コンポーネントに反応確認用のプラスミドDNAが予め添加されており、検体に対してEMA処理が正しく行われるとこのプラスミドDNAも同時に修飾を受け、PCR増幅できなくなります。プラスミドDNA上の領域をターゲットとしてPCR増幅を行うことで、事前にEMA処理の成否を確認できます。



EMA処理成否の確認用キット

Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (製品コード CY290)

■ EMA処理用汎用試薬キットおよびEMA-PCR関連製品

製 品 名	概 要	容 量	製品コード	価格(税別)
EMA処理試薬				
Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative)	グラム陰性菌用EMA試薬キット	100回	7700	¥55,000
Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive)	グラム陽性菌用EMA試薬キット	100回	7705	¥55,000
EMA処理反応確認用試薬				
Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)	EMA処理成否の確認用キット	50回	CY290	¥28,000
抽出関連製品				
NucleoSpin® Tissue XS	微量なサンプルからもゲノムDNA、細菌DNA、ウイルスDNAを効率よく精製可能	10回	740901.10	¥7,900
		50回	740901.50	¥30,000
		250回	740901.250	¥135,000
光照射装置				
LED Crosslinker 12	EMA処理の光照射用装置。検体12本(1.5 ml チューブ)を一度に処理可能	一式	EM200	¥107,800
リアルタイムPCR装置				
Thermal Cycler Dice® Real Time System III with PC	96ウェルプレート対応。 日本語仕様のソフトウェアを搭載	一式	TP970	¥3,500,000

■ 特定菌専用試薬 … 各EMA処理試薬キットで処理後、表中に記載の各qPCR試薬キットで特定菌を検出

サルモネラ菌				
Viable <i>Salmonella</i> Selection Kit for PCR	サルモネラ菌専用EMA処理試薬キット	50回	7711	¥55,000
CycleavePCR® <i>Salmonella</i> Detection Kit Ver.2.0	qPCR試薬キット。 検出対象遺伝子は <i>invA</i> 遺伝子	50回	CY205	¥69,000
腸管出血性大腸菌				
Viable enterohemorrhagic <i>E. coli</i> Selection Kit for PCR	EHEC専用EMA処理試薬キット	50回	7712	¥55,000
CycleavePCR® O-157 (VT gene) Screening Kit Ver.2.0	qPCR試薬キット。 検出対象遺伝子はVT遺伝子	50回	CY217A	¥52,000
		100回	CY217B	¥96,000
カンピロバクター				
Viable <i>Campylobacter</i> Selection Kit for PCR	カンピロバクター専用EMA処理試薬キット	50回	7713	¥55,000
CycleavePCR® <i>Campylobacter</i> (<i>jejuni/coli</i>) Typing Kit	qPCR試薬キット。 検出対象遺伝子は <i>cdtC</i> 遺伝子	50回(<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> 各25回)	CY225	¥69,000
レジオネラ属菌				
Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for PCR Ver.2.0 ★	レジオネラ専用EMA処理試薬キット	50回	7714	¥55,000
CycleavePCR® <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	qPCR試薬キット。 検出対象遺伝子は16S rRNA遺伝子	25回	CY240S	¥31,000
		50回	CY240	¥57,000

★ 液体培養を組み合わせたLC EMA-qPCR法に基づくレジオネラ生菌遺伝子迅速検査システムも販売しています。

Quencher : This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.

A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries). There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and "commercial use" includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.

その他のライセンス(最新のライセンス情報)に関しては弊社ウェブサイトにてご確認ください。

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。

・タカラバイオ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。

・本パンフレットに記載されている会社名及び商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

・本パンフレット記載の価格は2018年1月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店