PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

(2024年12月改訂版)

微生物の検出および同定には主として培養法が用いられていますが、近年、より簡便かつ迅速に結果が得られる方法として、PCRやリアルタイムPCR等の遺伝子検出技術も一般的手法として普及しつつあります。その一方で、遺伝子検査の課題として、生菌だけでなく死菌由来DNAも検出する点が指摘されてきました。

そこでタカラバイオでは上述の課題を克服すべく、生菌由来DNAを選択的に検出できる"Viable Bacteria Selectionシステム"をご提案します。本システムでは、選択的膜透過性色素(EMA:ethidium monoazide)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EMA-PCR法を応用しています。独自の技術で死菌由来DNAのEMA修飾効果を向上させたことで、増幅サイズが短いリアルタイムPCRでも効果的な生菌由来DNAの選択的検出が可能となり、今後ますます幅広い場面への応用が期待されます。

本冊子では、Viable Bacteria Selectionシステムによる「生菌由来DNAの選択的検出」について、グラム陰性菌用専用試薬 Viable Bacteria Selection Kit for PCR(Gram Negative)、およびグラム陽性菌用専用試薬 Viable Bacteria Selection Kit for PCR(Gram Positive)を使用する場合の詳細をご紹介します。これらの製品はグラム陰性菌またはグラム陽性菌を対象としてEMA-PCRを行うための専用EMA処理キットです。対象とする細菌の検出にはお手持ちのPCR/qPCR検出系をご利用いただけます。

目 次
I.「PCRによる生菌由来DNAの選択的検出」実験の概要 ·········· 2
1)「PCRによる生菌由来DNAの選択的検出」の用途
2)EMA-PCR法の原理について
Ⅱ.「PCRによる生菌由来DNAの選択的検出」を始めるにあたって・・・・・・・5
1)必要な実験器具・装置
2)基本的な実験の流れ
3)実験室や設備について
Ⅲ-1. EMA処理条件の検討手順・・・・・・・・・・・ 11
1)はじめに
2)実験の流れ
3)結果の解析
4)実験例
Ⅲ-2. 実検体測定の手順・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20
1)はじめに
2)実験の流れ
3)結果の解析
Ⅳ. 実験操作方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22
Ⅴ. 関連製品一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

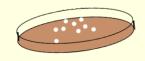
I.「PCRによる生菌由来 DNA の選択的検出」実験の概要

1)「PCRによる生菌由来DNAの選択的検出」の用途

微生物の検出および同定には主として培養法が用いられていますが、専門知識と熟練が要求されます。また、場合によっては結果判定に数日間かかることも多く、より簡便かつ迅速に結果が得られる方法として、PCR法等の遺伝子増幅技術を応用した手法が注目されています。特にリアルタイムPCR法は、反応後に電気泳動で増幅産物の確認を行う必要がないため、簡便・迅速に結果が得られると同時に、コンタミネーションのリスクが低いといった長所があります。そのため、遺伝子組換え食品の検査、ウイルスや病原菌の検出、検体中のウイルス量の解析など、さまざまな用途に応用されています。

●培養法(従来法)

- ・長所:微生物学分野でのゴールドスタンダード、国内および国際的な標準法、安価
- ・短所:時間がかかる、培養不可能な菌もある、特殊な技術が必要



迅速な方法が求められる

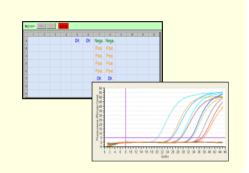
●遺伝子検出 (PCR)

- ・長所:迅速に結果判定できる(その日のうちに判定)
- ・短所: 死菌由来DNAも検出する



更に有用な方法が求められる

●生菌由来DNAの選択的検出(EMA-PCR)



遺伝子検出では生菌だけでなく死菌由来DNAも併せて検出しますが、実際は生菌のみを検出する需要が非常に高いため、死菌由来DNAも検出してしまう点は、長年大きな課題として指摘されてきました。

本稿でご紹介する「EMA-PCR法」は、死菌由来DNAを修飾することでPCR増幅を抑制し、生菌由来DNAの選択的な検出を可能にしました。

本技術が様々な場面で活用され、迅速な微生物検出分野における可能性の幅が広がることが期待されます。

<応用が期待される場面の一例>

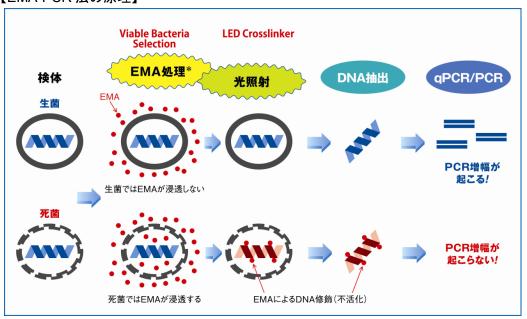
- ・殺菌・消毒効果の検証を迅速に行いたい
- •PCRによる保菌検査で生菌由来であることを証明したい
- ・腸内細菌の生存率を解析したい
- ・培養タンクや環境中での菌生存率の検証を行いたい
- ・製造ラインの工程管理をスピ―デイに行いたい
- ・培養困難な微生物を検出したい

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

2) EMA-PCR法の原理について

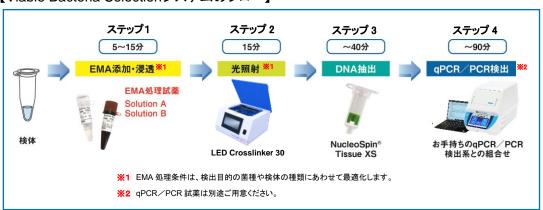
EMA (ethidium monoazide)は可視光に暴露すると、核酸に共有結合する色素です。生菌を含む検体に EMA試薬を添加して光を照射しても、生菌ではEMAが内部に浸透しないためDNAへの化学修飾は起こりません。一方、死菌由来DNAやその他、検体に含まれる核酸はEMAによって化学修飾されます。修飾された核酸は PCR反応の鋳型となることができず遺伝子増幅できませんので、EMA処理後のPCR法により生菌由来DNAの みが検出されます。

【EMA-PCR 法の原理】



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

【Viable Bacteria Selectionシステムのフロー】



ステップ1(EMA処理; EMAの浸透):選択的膜透過性色素(EMA)を含む試薬を検体に添加し、

氷上で遮光静置する。

ステップ2(EMA処理;光照射):光照射によりEMAと核酸を結合させる。

ステップ3(DNA抽出) :EMA処理後のサンプルよりDNAを抽出する。

ステップ4(PCR/qPCR検出):ターゲット細菌の遺伝子検出を行う。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出



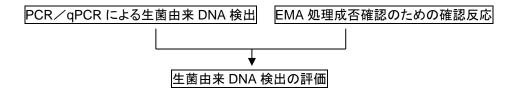
【Viable Bacteria Selectionシステムの利点】

・独自技術による EMA 修飾の効率化

Viable Bacteria Selection システムでは、EMA 処理に独自の技術を施し、EMA 修飾の効率化を実現したことにより、非常に効率よく死菌由来 DNA を修飾できます。死菌由来 DNA への修飾効果が向上したことで、リアルタイム PCR のように増幅サイズが短い場合にも効果的に死菌由来 DNA の増幅を排除できるようになりました。本技術は高感度なリアルタイム PCR への適用が可能です。

・EMA 処理成否チェックが可能

Viable Bacteria Selection システムでは、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います。EMA 処理用の試薬コンポーネントには、反応確認用のプラスミド DNA があらかじめ添加されており、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。従って、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、EMA 処理操作が阻害を受けずに行われたかどうかを確認することができます[Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)を使用]。実検体の反応では、検体中に含まれる様々な夾雑物による影響が懸念されますが、事前に EMA 処理の成否を確認できるため、無駄のない精度の高い検討が可能です。



・専用装置使用で精度の高い EMA 処理条件の検討が可能

Viable Bacteria Selection システムでは、EMA 処理時の光照射に使用できる専用装置 LED Crosslinker 30 (製品コード EM300)もご用意しています。EMA 処理の条件設定では、光の照射時間および照射距離を検証する必要があり、市販の LED ランプやハロゲンランプの使用も可能ですが、専用装置を活用すれば精度の高い安定したデータ取得に有効です。本装置は高輝度 LED ランプ搭載のため長期使用が可能です。

II.「PCR による生菌由来 DNA の選択的検出」を始めるにあたって

1)必要な実験器具・装置

Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズを用いた「生菌由来DNAのPCR検出」の実験に必要な器具 類についてご紹介します。

【EMA処理 に必要な器具・装置】

器具名称	参昭
	1
滅菌1.5 ml(もしくは0.2 ml)チューブ	U
マイクロピペット	2
マイクロピペット用フィルター付きチップ	3
撹拌機	4
小型卓上遠心機	5
アイスボックス	6
チューブスタンド	7
ヒートブロック(95℃以上に設定可能なもの)	8
光照射装置もしくは光照射用ランプー式	9

【DNA 調製に必要な器具・装置】

器具名称	参照
滅菌1.5 mlチューブ	1
マイクロピペット	2
マイクロピペット用フィルター付きチップ	3
撹拌機	4
小型卓上遠心機	5
チューブスタンド	7
ヒートブロック (56℃、70℃設定可能なもの)	8

【PCR/リアルタイムPCR に必要な器具・装置】

器具名称	参照
マイクロピペット	2
マイクロピペット用フィルター付きチップ	3
撹拌機	4
小型卓上遠心機	5
アイスボックス	6
チューブスタンド	7
PCR装置またはリアルタイムPCR装置	<u> </u>
電気泳動装置一式(エンドポイントPCRの場合)	-
反応チューブ	_

※詳細は、別冊「PCR 実験の手引き」、または「リアルタイム PCR による遺伝子迅速検出」をご覧ください。

【その他】

● ディスポーザブル手袋(パウダーフリータイプ)、白衣、スリッパ、マスク 実験エリアごとに専用のものを用意することで、コンタミネーション防止に役立ちます。

Clontech TakaRa cellortis DNA の選択的検出

PCR/qPCR による生菌由来

【器具詳細一覧】

E HH Z	₹計和一見』 	ㅁጐ 글 선	制口切
	器具名称	用途•詳細	製品例
1	滅菌1.5 ml チューブ	透明チューブのご利用をお勧めします。 弊社では、右記のチューブでの使用実績があります。	DNA LoBindチューブ, 1.5 ml PCR clean (Eppendorf、製品 コード 95295) <スクリューキャップ> 1.5 ml ループ付凍結保存チュー ブ (SARSTEDT、製品コード 72.692.100)
2	マイクロ ピペット	少量の液体の分取等に使用する器具です。扱う液量に応じて、適切なサイズ(20 µl用、200 µl用、1,000 µl 用、10 µl用等)のものを使用します。 コンタミネーション防止のため、必ず用途別に分けてください。それぞれの実験エリアからの持ち出しは禁止することをお勧めします。(コンタミネーションの原因となるため、兼用は避けてください)	
3	用	エアロゾルによるコンタミネーションを防止するため 疎水性フィルター付きのチップを使用します。各メー カー、マイクロピペットに対応した滅菌済のものが販 売されています。	
4	撹拌機	サンプルと試薬を混合するためなどに使用します。	VORTEX-GENIE 2 (サイエンティフィックインダストリ ーズ)
5	小型卓上遠心機	反応液をチューブに分注後、チューブ壁などに飛散し た反応液をスピンダウンするときに使用します。	SUKESAN ~すけさん~ (チヨダサイエンス)
6	アイスボックス	発泡スチロール製などのアイスボックスにクラッシュ アイスを入れて使用します。サンプルや試薬のチュー ブを立てて冷却します。	
7	チューブスタンド	1.5 ml と 0.2 ml の PCR チューブに対応したものがあると、便利です。 PCRチューブ(96穴プレート)に対応したスタンドは、金属製のものを準備すれば、氷上にセットすることで冷却しながら反応液を調製できるのでお勧めです。	

Clontech TakaRa cellortis PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

8	ヒートブロック	検体サンプルの熱処理 (不活化処理)に使用します。1.5 mlチューブで使用できるものをご用意ください。	
9	光照射装置	Viable Bacteria Selectionシリーズ専用のための光照射装置。高輝度LEDランプを搭載した専用装置で、精度の高い安定したデータ取得に有効です。一度に最大30サンプルの光照射が可能で、タッチパネルにて設定を行ったプログラムに従い光照射ON/OFFを自動的に制御できます。	(製品コードEM300)

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

2)基本的な実験の流れ

基本的な実験操作の流れは、次の5つのステップです。

各ステップで使用する主な試薬や装置

1. 検体サンプルの調製(前培養など)





2. EMA 処理

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

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



LED Crosslinker 30 (製品コード EM300)





3. DNA 調製

NucleoSpin® Tissue XS(製品コード 740901.10/.50/.250)





4. PCR/リアルタイム PCR

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



Clontech PCR Thermal Cycler GP(製品コード WN400)

もしくは

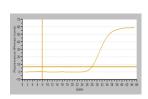
Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズ





5. 結果の解析





PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

3) 実験室や設備について

菌体の取り扱いには十分に注意し、必要に応じて安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内で操作してください。また、PCRによる検出は非常に高感度です。コンタミネーションを防止するために、サンプルの調製から PCR 検出まで次の 4 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。



- ■エリア1: 反応試薬のみを扱うエリアPCR 反応液の調製、分注を行う。(鋳型となるDNA は一切持ち込まない)
- ●エリア2:通常の実験エリア 検体の取扱いやDNA 調製を行う。 検体のバイオハザードレベルが高い場合、 安全キャビネットを設置する。
- ●エリア3:高濃度DNAを扱うエリア 分注済みの反応液への鋳型DNAの添加 を行う。
- ●エリア4:PCR 産物を取扱うエリア PCR 後の増幅産物を電気泳動する場合、 エリア1、2、3 とは異なる別室で行う。

【コンタミ対策3箇条】

- 1. PCR 産物の拡散防止
 - ・リアルタイムPCR 反応後のチューブのフタを開けない
 - PCR 反応後のチューブはオートクレーブ厳禁

リアルタイム PCR の場合は電気泳動が不要なので、PCR 反応後のチューブのフタを開けさえしなければ、PCR 産物の拡散防止が可能です。誤ってオートクレーブしないよう、反応後のチューブの捨て場は他のゴミとは別にしましょう。

- 2. クロスコンタミの防止
 - ・チューブのフタの開閉時は要注意
 - ・エアロゾルの発生に注意
 - チップの交換、廃棄を適切に

クロスコンタミを防止するには、DNA が付着している部分を想像してみます。チューブのフタから手袋へ…、チップの先の気泡がはじけてエアロゾルが発生…など。DNAが空中に舞っている可能性も想定して、フタを開ける時間は最小限にしましょう。

また、使用後のチップは使い捨てのビニール袋などに入れ、こまめに廃棄しましょう。

- 3. エリア分けの徹底
 - ・作業場所をエリア1 ~ 4 に区分
 - ・器具類の使い分けを適切に

試験環境の整備も効果的です。エリア分けのルールを徹底し、器具類の使い分けを確実にすることで、高濃度DNA の検体が存在した場合にもクロスコンタミのリスクを抑制することができます。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

【コンタミ防止に必要なもの】

・ フィルター付きチップ

マイクロピペットのチップは、マイクロピペットの汚染防止のためフィルター付きを使いましょう。

· DNA-OFF® (DNA コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9036)

非アルカリ性、非腐食性、非発がん性のDNAコンタミネーション除去試薬で、実験台や器具などのあらゆる表面からDNAを除去することができます。界面活性剤を含む、安定で耐熱性のあるready-to-useなDNA除去試薬です。

★汚染除去だけでなく、日常的な清掃にも使用することで "DNA Clean" な状態を保ちましょう。

~コンタミ対策チェックリスト~

エリア1、2、3、4の区分けをして	ている。	をして	トリナス	区分	4 <i>0</i>	3.	. 2.	ア1	エリ	П
-------------------------------------	------	-----	------	----	------------	----	------	----	----	---

- □ マイクロピペット等の器具類を作業別に使い分けている。
- □ マイクロピペットはフィルター付きチップを使用する。
- □ チューブのフタを開ける前にはしっかりスピンダウンする。

注意:PCR産物のフタは開けてはいけません!

- □ チューブのフタを開ける際は、フタの裏に触れないよう注意する。
- □ チューブは静かに開ける。
- □ チューブのフタを開けておく時間は最小限にする。
- □ フタを開けたチューブの上は極力避け、分注操作を行う。
- □ PCR 反応後のチューブは、専用のゴミ袋へ廃棄する。

注意:PCR反応後のチューブは、オートクレーブ厳禁です!

コンタミネーションが発生すると、実験結果に影響を及ぼすので、事前に可能な範囲で実験環境の整備を しておくことをお勧めします。 万一コンタミネーションが発生した場合は、考えられる原因にひとつひとつ対処 してください。

試薬へのコンタミネーションが疑われるときは、新しいものに取り替える必要があります。実験台や器具類は洗浄を徹底してください。

Ⅲ-1. EMA処理条件の検討手順

1)はじめに

微生物の菌種やPCR検出系によって最適なEMA処理条件が異なるため、実検体の測定を行う前に純培養菌を用いて条件検討を行います。具体的には、純培養菌の生菌と死菌(熱処理など膜が損傷する条件で処理したもの)を準備し、EMA処理の時間や回数およびEMA濃度を変えて、その効果を確認します。

【死菌を用いての確認】

対象の菌種について、死菌サンプルを用い最適な死菌抑制効果が得られる EMA 処理条件を検討します。また、その条件で EMA 処理を行った際に、どの菌数まで死菌抑制効果があるかを確認します。

【生菌を用いての確認】

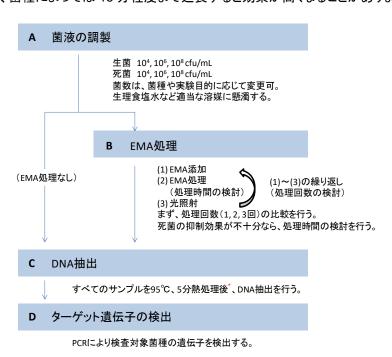
対象の菌種について、EMA 処理の生菌への影響を確認します。生菌サンプルを用いて、EMA 処理あり/なしの結果を比較し、検出感度に影響を与えない EMA 処理条件を検討します。

2)実験の流れ

グラム陰性菌の場合

純培養菌の生菌と死菌を準備し、各種条件でそれぞれ EMA 処理を行います。まず、EMA 処理条件を 5 分に設定して、EMA 処理回数 (1、2、3 回)の検討を行います。PCR 増幅サイズが短い (100 bp 前後)場合には 3 回、PCR 増幅サイズが長い (1 kb 程度)場合には 1 回が標準的な条件です。

死菌の抑制効果が不十分な場合は、続いて EMA 処理時間の検討を行います。多くの場合、EMA 処理時間は 5 分で十分ですが、菌種によっては 15 分程度まで延長すると効果が高くなることがあります。



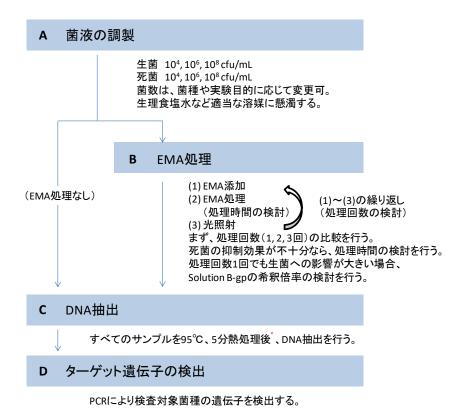
*:対象菌種に適した方法(条件)で不活化処理する。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

グラム陽性菌の場合

純培養菌の生菌と死菌を準備し、各種条件でそれぞれ EMA 処理を行います。まず、EMA 処理条件を 5 分に 設定して、EMA 処理回数 (1、2、3 回)の検討を行います。PCR 増幅サイズが短い (100 bp 前後)場合には処 理回数を増やすことにより死菌の抑制効果が上がります。

死菌の抑制効果が不十分な場合は、続いて EMA 処理時間の検討を行います。多くの場合、EMA 処理時間 は 5 分で十分ですが、菌種によっては 15 分程度まで延長すると効果が高くなることがあります。また 1 回の EMA 処理で生菌への影響が大きい場合には、Solution B-gp を Dilution Buffer で適宜希釈して使用し、EMA 処理濃度を検討します。



*:対象菌種に適した方法(条件)で不活化処理する。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

3)結果の解析

リアルタイム PCR の場合

EMA 処理なしの結果と各種条件で EMA 処理を行った結果を比較して、生菌への影響と死菌抑制効果を確認します。

次ページの図は、EMA 処理の回数を検討した実験例です。左図には Ct 値を、右図には EMA 処理なしとありの Ct 値の差(Δ Ct 値)を示しています。

【生菌への影響】

生菌を用いた際の EMA 処理なしとありの Ct 値の差(Δ Ct 値)が EMA 処理による生菌の検出感度の低下を表します。適切な EMA 処理条件では、Δ Ct 値は 2~4 程度となることが多く、その値が小さい程、生菌への影響が小さい EMA 処理条件です。EMA は死菌由来 DNA を効率よく修飾しますが、菌種や菌数、処理条件によっては生菌にも若干の影響を与えることが知られています。

次ページの実験例では、Δ Ct 値がいずれも4より小さい値を示しています。

【死菌抑制効果】

死菌を用いた際の EMA 処理なしとありの Ct 値の差(Δ Ct 値が)が死菌抑制効果を表します。適切な EMA 処理条件では、 Δ Ct 値は 8~15 程度となることが多く、その値が大きい程、効果的に死菌を抑制できる EMA 処理条件です。結果を正しく解釈するために、どの程度まで死菌抑制効果があるかをあらかじめ確認しておくことが重要です。

【EMA 処理条件の選定】

生菌と死菌の結果を踏まえて、生菌への影響が小さく、死菌抑制効果が十分な EMA 処理条件を選択します。 次ページの実験例では、生菌への影響は EMA 処理 1~3 回のいずれでも小さく、どの回数でも問題はありませんでした。

一方、死菌抑制効果は EMA 処理 1 回よりも 2 回の方が大きく、2 回と 3 回はほぼ同等なので、操作が簡便な EMA 処理 2 回を選択します。

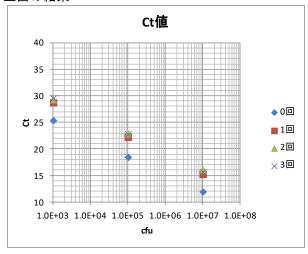
エンドポイント PCR の場合

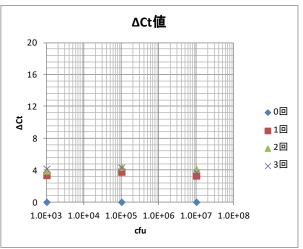
エンドポイント PCR の場合は、目的サイズのバンドの有無で、EMA 処理効果を判断します。死菌抑制効果が不十分な場合には、前述の通り、EMA 処理回数や EMA 処理時間を変更する他、PCR 増幅サイズを大きくすることによって効果を上げることもできます。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

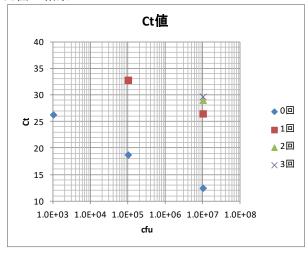
EMA 処理回数の検討例

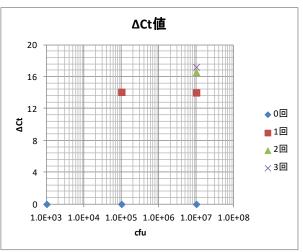
生菌の結果





死菌の結果





 $%10^3$ cfu の死菌で EMA 処理が 1 \sim 3 回の場合、および 10^5 cfu の死菌で EMA 処理が $2\sim$ 3 回の場合は、Ct 値が得られなかった(検出限界以下だった)。

4)実験例

グラム陰性菌の場合

【大腸菌での検討例 ~リアルタイム PCR~】

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (製品コード 7700)を使用したEMA処理の条件検討の一例として、大腸菌での検討例を以下にご紹介します。

<方法>

- 大腸菌をLB寒天培地で37℃、一晩培養した。
- 2) 1)を生理食塩水に懸濁し、懸濁液を濁度を指標として 109個/ml となるように調製した。
- 3) 2)のサンプルを二つに分け、一方をそのまま生菌とし、もう一方をヒートブロックで 95℃、5 分間熱 処理し、菌とした。
- 4) 生菌、死菌、それぞれを生理食塩水で 10 倍段階希釈し、10⁹ 個/ml から 10⁴ 個/ml までの 6 段階 の標準サンプルを調製した。
- 5) 4)の生菌および死菌の標準サンプルをそれぞれ以下のような処理に供した。

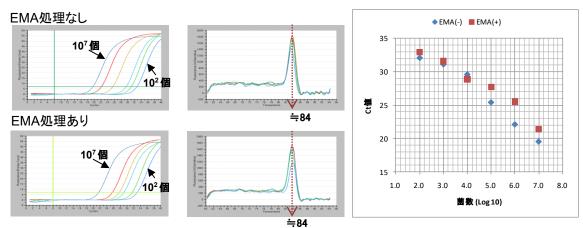
それぞれの処理に用いた菌数は 107 個から 102 個となる。

- ・EMA 処理なし: 各標準サンプル 10 μl を生理食塩水 55 μl と混合し、65 μl とした。
- EMA 処理あり: 各標準サンプル 10 µl を生理食塩水 30 µl と混合し、 Solution A-gn 10 µl を 添加した。
- 6) EMA 処理を行わないサンプルは 4°Cにて保存。
- 7) EMA 処理ありサンプルについて説明書記載の操作に準じて処理を行った。
 - ・氷上静置時間:5分
 - ·光照射時間 :5分(3回目は15分)
 - •EMA 処理回数:3 回
- 8) 全てのサンプル (EMA 処理あり、EMA 処理なし)について前述の核酸抽出手順に準じ DNA 精製を行った。
- 9) 得られた DNA 2 µl を鋳型としてリアルタイム PCR を行った。
 - ・TB Green[®] *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus)(製品コード RR420A)、
 Thermal Cycler Dice[®] Real Time System // (製品コード TP900:終売)を使用。
 - ・ターゲットは大腸菌 LacZ、増幅サイズ 70 bp
- 10) リアルタイム PCR 結果より EMA 処理の影響や効果について解析した。

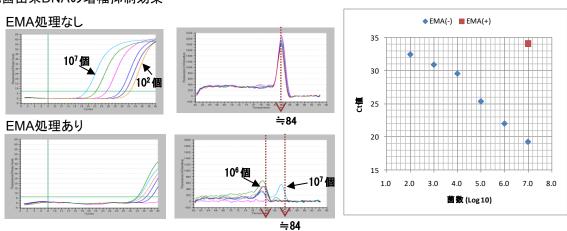
PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

<結果>

1.EMA処理の生菌への影響



2.死菌由来DNAの増幅抑制効果



<結果の考察>

1. EMA処理の生菌への影響

EMA処理なしと処理ありの結果の比較から、 $10^7 \sim 10^5$ 個では $1.5 \sim 2$ サイクル程度のCt値の遅れが認められたが、それ以下の菌数では同等の結果が得られており、検出感度には影響がないと判断できる。

2. 死菌由来DNAの増幅抑制効果

上図の結果より、少なくとも10⁵ 個までの死菌由来DNAを完全に抑制できると考えられた。この時、 EMA処理なしの10⁵ 個サンプルのCt値は25.4だった。

大きく成分が異ならない検体を用いて同様にEMA処理〜検出を行う際、EMA処理なしの各サンプルの Ct値が先述のCt値(25.4)を上回っている場合に、死菌由来DNAは完全に修飾され、これに起因する増幅は起こらないと考えることができる。つまりこの条件下での増幅はすべて生菌由来DNAに起因するものと推察できる。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

【大腸菌での検討例 ~エンドポイント PCR~】

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (製品コード 7700)を使用したEMA処理後にエンドポイントPCRで検出する場合の実験例を以下にご紹介します。

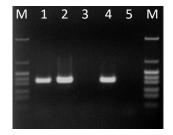
<方法>

- 1) 大腸菌をLB寒天培地で37°C、一晩培養した。
- 2) 1)を生理食塩水に懸濁し、懸濁液を濁度を指標として 109 個/ml となるように調製した。
- 3) 2)のサンプルを二つに分け、一方をそのまま生菌とし、もう一方をヒートブロックで 95°C、5 分間 熱処理し、死菌とした。
- 4) 生菌、死菌、それぞれを生理食塩水で希釈し、2×10⁹ 個/ml に調整した。
- 5) 4) の生菌および死菌の標準サンプルをそれぞれ以下のような処理に供した。それぞれの処理に用いた菌数は 2×10^7 個となる。
 - ・EMA 処理なし: 各標準サンプル 10 μl を生理食塩水 55 μl と混合し、65 μl とした。
 - ・EMA 処理あり: 各標準サンプル 10 µl を生理食塩水 30 µl と混合し、Solution A-gn 10 µl を添加した。
- 6) EMA処理を行わないサンプルは4℃にて保存。
- 7) EMA 処理ありサンプルについて説明書記載の操作に準じて処理を行った。
 - •氷上静置時間:5分
 - ·光照射時間 :5分(3回目は15分)
 - •EMA 処理回数:3 回
- 8) 全てのサンプルについて前述の核酸抽出手順に準じ DNA 精製を行った。
- 9) 得られた DNA 2 µl を鋳型としてエンドポイント PCR を行った。
 - ・TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version(製品コード RR006A)、
 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Touch(製品コード TP350:終売)を使用
 - ・ターゲットは大腸菌 LacZ、増幅サイズ 1,002 bp
- 10) PCR 産物 5 µl を電気泳動に供し、PCR 結果より EMA 処理の影響や効果について解析した。

<結果>

M:pHY Marker

- 1: 生菌 EMA処理(+)
- 2: 生菌 EMA処理(-)
- 3: 死菌 EMA処理(+)
- 4: 死菌 EMA処理(一)
- 5: Negative Control
- 1% Agarose L03



<結果の考察>

生菌は、EMA処理の有無に関わらず検出されたが、死菌は、EMA処理なしで検出され、EMA処理ありでは検出されなかった。EMA処理により、少なくとも2×10⁷ 個の死菌由来DNAの増幅が抑制され、生菌のみが検出できると推測される。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

グラム陽性菌の場合

【黄色ブドウ球菌での検討例 ~リアルタイム PCR~】

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive) (製品コード 7705)を使用したEMA処理の条件検討の一例として、黄色ブドウ球菌での検討例を以下にご紹介します。

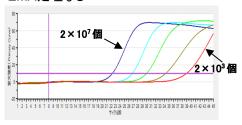
く方法>

- 1) 黄色ブドウ球菌をNutrient寒天培地で37℃、一晩培養した。
- 2) 1)を生理食塩水に懸濁し、懸濁液を濁度を指標として 5×108 個/ml となるように調製した。
- 3) 2)のサンプルを二つに分け、一方をそのまま生菌とし、もう一方をヒートブロックで 95℃、5 分間熱処理 し、死菌とした。
- 4) 生菌、死菌、それぞれを生理食塩水で 10 倍段階希釈し、5×10⁸ 個/ml から 5×10⁵ 個/ml までの 5 段階の標準サンプルを調製した。
- 5) 4)の生菌および死菌の標準サンプルをそれぞれ以下のような処理に供した。それぞれの処理に用いた菌数は 2×10^7 個から 2×10^3 個となる。
 - ・EMA 処理なし: 各標準サンプル 40 μl を生理食塩水 20 μl と混合し、60 μl とした。
 - ・EMA 処理あり: 各標準サンプル 40 µl に Solution A-gp 10 µl を添加した。
- 6) EMA処理を行わないサンプルは4℃にて保存。
- 7) EMA 処理ありサンプルについて説明書記載の操作に準じて処理を行った。
 - •氷上静置時間:5分
 - ·光照射時間 :5分(2回目は15分)
 - •EMA 処理回数:2回
- 8) 全てのサンプル (EMA 処理あり、EMA 処理なし)についてグラム陽性菌に適した核酸抽出により DNA 精製を行った。
- 9) 得られた DNA 2.5 µl を鋳型としてリアルタイム PCR を行った。
 - ・CycleavePCRTM Staphylococcus aureus (DnaJ gene) Detection Kit(製品コード CY228)、Thermal Cycler Dice® Real Time System // (製品コード TP900:終売)を使用。
- 10) リアルタイム PCR 結果より EMA 処理の影響や効果について解析した。

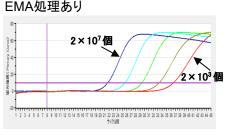
<結果>

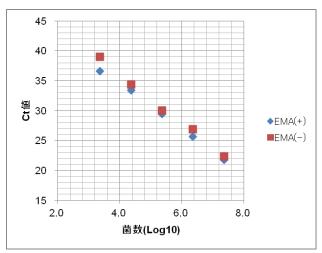
1. EMA処理の生菌への影響

EMA処理なし



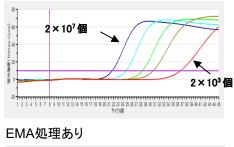
EMA処理あり

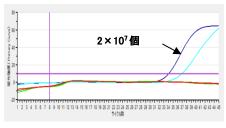


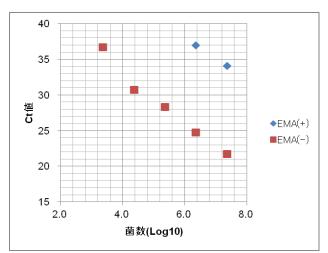


2. 死菌由来DNAの増幅抑制効果

EMA処理なし







<結果の考察>

1. EMA処理の生菌への影響

生菌におけるEMA処理あり/なしの結果を比較することによりEMA処理の影響を確認した。 EMA処理あり/なしでほぼ同等の結果が得られており、検出感度には影響がないと判断できる。

2. 死菌由来DNAの増幅抑制効果

死菌におけるEMA処理ありンなしの結果を比較することにより、死菌由来DNA抑制効果を確認した。 上図の結果より、EMA 処理あり/なしのCt 値の差は14 程度であることから3 log~4 log 程度の死 菌抑制効果があり、2×104~2×105個までの死菌を抑制できると推測できる。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

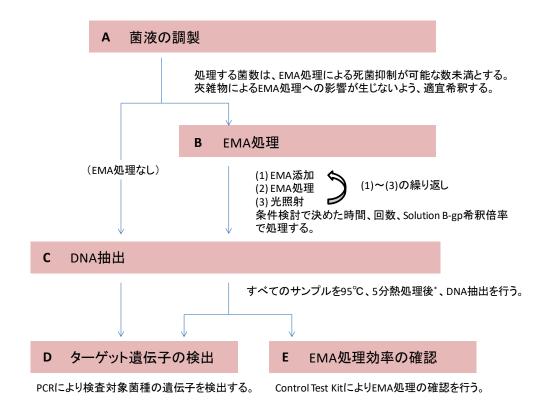
Ⅲ-2. 実検体測定の手順

1)はじめに

「Ⅲ-1.EMA 処理条件の検討手順」で決めた条件で実検体の EMA 処理を行います。この場合にも、EMA 処理なしと EMA 処理ありの比較を行います。EMA 処理なしの結果は生菌と死菌を合わせた総菌数を、EMA 処理ありの結果は主に生菌数を表しますので、これらの結果から生菌および死菌の存在を推定することができます。なお、実検体にはさまざまな夾雑物が含まれ EMA 処理に影響を及ぼす可能性がありますので、EMA 処理を行った検体に関しては、別途 Control Test Kit を用いて EMA 処理効果の確認を行います。

2)実験の流れ

EMA 処理に供する菌数は、その EMA 処理条件で抑制可能な死菌数以下になるようにします。また、検体に含まれる夾雑物が EMA 処理に影響を及ぼすことが明らかな場合は、必要に応じて検体を希釈します。



*:対象菌種に適した方法(条件)で不活化処理する。

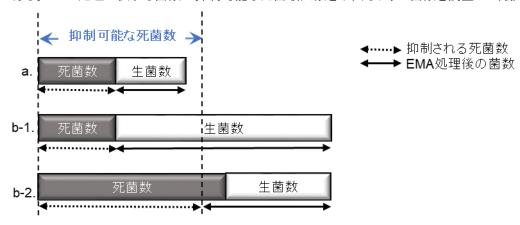
PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

3)結果の解析

同一検体由来の EMA 処理あり/なしの結果を比較して、生菌と死菌の存在の有無を下表の通り判断します (陽性コントロール、陰性コントロール、インターナルコントロールが妥当な結果を示すことを前提とする)。

		前処理(EMA	4処理)あり
		検出	不検出
	検出	生菌 十/一*3	生菌 —* ²
前処理(EMA 処理)	快山	死菌 +/-	死菌 +
なし	不 检山		生菌 一*1
	不検出		死菌 一

- *1: EMA 処理ありサンプルで不検出
- → 生菌由来 DNA が検出限界以下
- EMA 処理なしサンプルで不検出
- → 死菌由来 DNA も検出限界以下
- ⇒ 検体サンプル中の生菌および死菌が検出限界以下である。
- *2: EMA 処理ありサンプルで不検出
- → 生菌由来 DNA が検出限界以下
- EMA 処理なしサンプルで検出
- → 死菌由来 DNA は EMA 処理で完全に修飾済み
- ⇒ 検体サンプル中の生菌が検出限界以下である。
- *3: EMA 処理ありサンプルで検出 EMA 処理なしサンプルで検出
 - a. EMA 処理なしの定量結果 (総菌数)が抑制可能な死菌最大数より少ない場合 ⇒EMA 処理ありの定量結果は、生菌数を表す。
 - b. EMA 処理なしの定量結果 (総菌数)が抑制可能な死菌最大数より多い場合
 - ⇒EMA 処理ありの定量結果には、生菌数の他、抑制しきれなかった死菌数が含まれる可能性が ある。EMA 処理に供する菌数が抑制可能な死菌最大数を下回るように菌数を調整して再試する。



"抑制可能な死菌数"と比較して

- a. "総菌数"が少ない
- ⇒ 生菌が検出される
- b-1. "総菌数"は多く、"死菌数"は少ない ⇒ 生菌が検出される
- b-2. "総菌数""死菌数"が共に多い
- ⇒ 生菌と、EMA 処理で抑制しきれなかった死菌が検出される

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

Ⅳ. 実験操作方法

1)サンプル (菌液)の調製

検出目的の菌種に適した方法でサンプル調製を行い、最終的に100 µl程度の菌懸濁液を用意してください。このサンプル液のうち40 µlを「2) EMA処理」に使用します。残りは氷上もしくは4℃で保存し、EMA処理なしサンプルを用意するために40 µlを「2) EMA処理」の実験操作、8) 加熱殺菌(不活化処理)を行った後、「3) 核酸抽出」に使用します。

なお、菌液に不純物が多く含まれると、EMA処理で光照射が不十分になることがありますので、サンプル調製の際にできる限り不純物を除去してください。

2)EMA処理

Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (製品コード 7700)もしくは Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive) (製品コード 7705)を用いた実験操作

<必要な試薬など>

- ・Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (製品コード 7700)もしくは
- •Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive) (製品コード 7705)

本製品は、グラム陰性菌もしくはグラム陽性菌を対象としてEMA-PCRを行うための前処理用キットです。 対象とする細菌のEMA処理条件を最適化し、効率よく死菌由来DNAの修飾を行うことで、リアルタイムPCR やエンドポントPCRにより、生菌由来DNAのみを選択的に検出する系を構築することができます。

キットの内容(100検体分)

Gram Negative

1.	Solution A-gn*1	$250 \mu l \times 4$
2.	Solution B-gn*2	$200 \mu l \times 8$



Gram Positive

1.	Solution A-gp*1	500 µl	×	2
2.	Solution B-gp*2	200 µl	×	8
3.	Dilution Buffer	1 ml	×	8

- *1 核酸修飾反応の促進試薬です。前処理操作の成否を確認するためのプラスミドDNA を含みます。
- *2 選択的膜透過性色素 (EMA)を含む溶液です。光による化学反応により物質性状が変化し、核酸修 節能力が減衰しますので、遮光に留意してください。-20℃で保存する際には、アルミパックに入れて 下さい。実験操作中は、アルミホイル等で覆い、できるだけ光に当てないよう注意してください。

く実験準備>

- 1. 作業エリアの確保
 - □ 作業エリアを消毒用エタノールで拭き、コンタミネーション等を予防する。
- 2. 実験器具等の準備
 - □ 手袋をはめる。
 - □ アイスボックスに氷を用意する。
 - □ ヒートブロックの準備 (95℃)

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

<実験操作>

- ※グラム陽性菌の場合は必ず低温 (4℃もしくは氷上)で操作すること。
- 1) グラム陽性菌の場合、必要に応じてSoution B-gp をDilution Buffer で希釈する。(用時調製)
- 2) 用意した検体を、1.5 ml チューブに 40 µl 量り取る。
- 3) Solution A-gn/gp 10 µl を添加し、混合する。

短時間の緩やかなボルテックス、もしくは数回のタッピングで混合する。

卓上型小型遠心機で軽くスピンダウンする。

4) Solution B-gn/gp*3 5 µl を添加し、混合する。

短時間の緩やかなボルテックスもしくは数回のタッピングで混合する。

卓上型小型遠心機で軽くスピンダウンする。

*3 Solution B-gn/gp は、アルミホイル等で覆い、できるだけ光に当てないよう注意してください。

5) 遮光して 5 (~15)分間静置する。

アイスボックスの蓋やアルミホイルで遮光すること。

6) 光照射装置 LED Crosslinker 30 にセットし、光照射*4 する。

(照射時間の例)

EMA処理を1 回のみ行う場合: 15 分間光照射する。

EMA処理を複数回行う場合: 各回の処理で5分間光照射を行い、最後の回のみ

15 分間光照射する。

- *4 グラム陽性菌の場合、光照射は4℃(もしくは氷上)で行います。その際、光照射装置のAC アダプターが結露すると感電や火災の恐れがありますので、結露しないように注意してください。
- 7) サンプルをスピンダウンする。
- 8) ヒートブロックにより各菌種に適した条件 (95℃、5 分間など)で加熱殺菌 (不活化処理)する。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

3)核酸抽出

NucleoSpin® Tissue XS(製品コード 740901.10/.50/.250)を用いたDNA抽出

<必要な試薬など>

- EMA 処理をしたサンプル
 55~65 µl 準備してください。
- 2. EMA 処理をしていないサンプル (比較対象として使用) 滅菌水 15~25 µl を添加し、「1. EMA 処理をしたサンプル」に液量を揃え、EMA 処理したサンプルと 同様の加熱殺菌処理を行う。
- 3. NucleoSpin® Tissue XS*
 - ※組織、血液、細胞などの微量・少量サンプルからゲノムDNAを精製するキット。シリカ膜技術をもとに、革新的なカラム構造により、従来キットを超えた微量なサンプルへの対応が可能となった。本製品は、漏斗状リングにセットされた小径のシリカ膜を特長としている。この構造により、小さい膜領域に正確にサンプルをアプライすることができ、さらにわずか5~30 µlという少量での溶出が可能である。LCM組織、生検サンプル、血液痕、口腔粘膜、法医学サンプル、FFPE、その他微量サンプルに利用可能。
- 4. 特級エタノール (>96%)
- 5. (グラム陽性菌の場合)

20 mg/ml lysozyme in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100 (pH8.0)

く実験準備>

1.試薬調製

NucleoSpin® Tissue XS (製品コード 740901.50 (50 回用))を使用する場合

- □ Proteinase K (凍結乾燥品)に、Buffer PB 1 ml を加え溶解する。 (溶解後の Proteinase K 溶液は-20°Cで保存)
- □ Wash Buffer B5 (2 ml)に、特級エタノール(>96%) 8 ml を加える。
- 2.作業エリアの確保
 - □ 作業エリアを消毒用エタノールで拭き、コンタミネーション等を予防する。
- 3.実験器具等の準備
 - □ 手袋をはめる。
 - □ ヒートブロックの準備($37^{\circ}C^{*1}\rightarrow 56^{\circ}C\rightarrow 70^{\circ}C$) 初めは $37^{\circ}C$ にセットし、 $37^{\circ}C$ での処理が終了したら、設定温度を $56^{\circ}C$ に変更する。 また、 $56^{\circ}C$ での処理が終了したら、設定温度を $70^{\circ}C$ に変更する。
 - *1 グラム陰性菌の場合は 37°Cは必要なし。56°Cからセットする。

<実験操作フロー>

グラム陰性菌の場合

試料溶液 55~65 µl

◆ Buffer T1を160 μl添加

軽く混合し、スピンダウン(数秒)

■ ← Proteinase Kを16 μl添加

ボルテックスにより混合(5秒×2)し、軽くスピンダウン(数秒)

56℃インキュベーション:10分、軽くスピンダウン(数秒)

■ ← Buffer B3 を 160 μl 添加

ボルテックスにより混合(5秒×2)し、軽くスピンダウン(数秒)

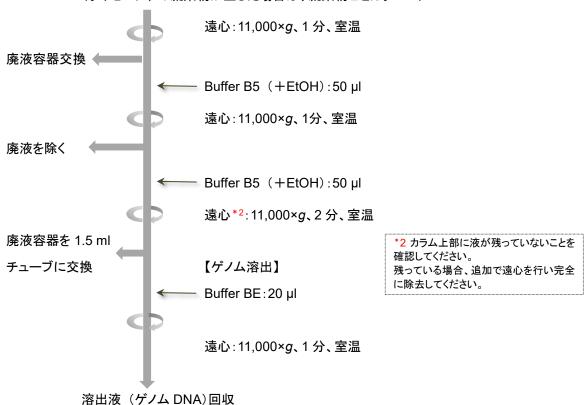
1

70°Cインキュベーション:5分後、ボルテックス。室温に戻ったことを確認し、 軽くスピンダウン(数秒)

★ 特級エタノール (>96%):160 µI添加

ボルテックスにより混合(5秒×2)し、軽くスピンダウン(数秒)

ライセート完成 カラムを2 mlチューブにセットし、カラムにライセート全量を添加 (ライセート中の凝集物が生じた場合は、凝集物ごとカラムへ)

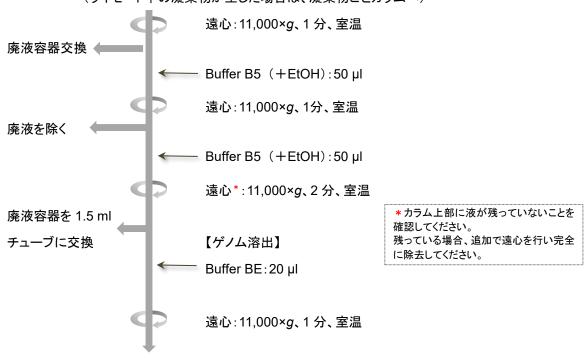


⇒ 4)PCR/リアルタイムPCR検出へ

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

グラム陽性菌の場合

試料溶液 55~65 µl 20 mg/ml lysozyme in 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100 (pH8.0)を160 µI添加 軽く混合し、スピンダウン(数秒) 37℃インキュベーション:30~60分、軽くスピンダウン(数秒) ← Proteinase Kを16 μI添加 軽く混合し、スピンダウン(数秒) 56℃インキュベーション:1~3時間(または一晩)完全溶解、軽くスピンダウン(数秒) ← Buffer B3 を 160 μl 添加 ボルテックスにより混合 (5秒×2)し、軽くスピンダウン (数秒) 70℃インキュベーション:5分後、ボルテックス。室温に戻ったことを確認し、 軽くスピンダウン(数秒) 特級エタノール(>96%):160 µl添加 ボルテックスにより混合(5秒×2)し、軽くスピンダウン(数秒) ライセート完成 カラムを2 mlチューブにセットし、カラムにライセート全量を添加 (ライセート中の凝集物が生じた場合は、凝集物ごとカラムへ) 遠心: 11,000×g、1 分、室温



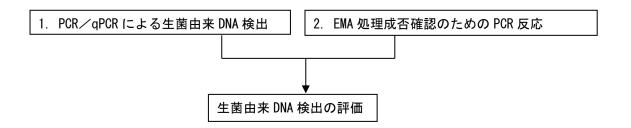
溶出液 (ゲノム DNA)回収

⇒ 4)PCR/リアルタイムPCR検出へ

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

4)PCR/リアルタイム PCR (qPCR)検出

「3) 核酸抽出」で調製したDNAを鋳型としてPCRまたはリアルタイムPCRを行います。検出目的の細菌を対象としたPCRと共に、Control Test Kit (Viable Bacteria Selection) (製品コード CY290)を用いてEMA処理成否確認のためのPCRを行うことにより、より確実な結果の解釈が可能となります (次項)。



<必要な試薬など>

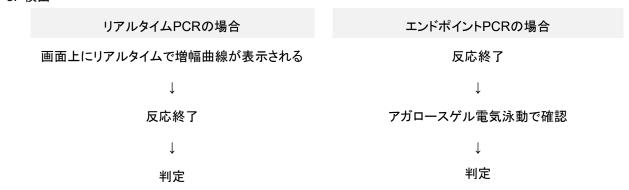
- 1. EMA 処理を行ったサンプル
- 2. EMA 処理を行っていないサンプル (比較対象として使用)
- 3. PCR/リアルタイム PCR 試薬

<実験操作>

別冊「リアルタイム PCR による遺伝子迅速検出」や、各製品の説明書をご参照ください。

く実験操作フロー>

- 1. PCR/リアルタイムPCR用増幅装置のセッティング
- 2. 反応液を調製し、反応開始
- 3. 検出

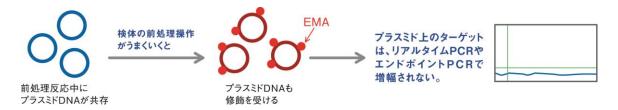


PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

5) EMA 処理の成否確認のための PCR 反応

Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズの試薬コンポーネントには、EMA 処理反応の成否を確認するためのプラスミド DNA があらかじめ添加されており、検体に対して前処理が正しく行われた場合、このプラスミド DNA も同時に修飾を受け、PCR 増幅できない状態になります。したがって、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、EMA 処理操作が阻害を受けずに行われたかどうかを確認することができます。

EMA 処理をしたサンプルに対し、Control Test Kit(Viable Bacteria Selection) (製品コード CY290)を使用すれば、EMA 処理が、検体成分などに由来する反応阻害を受けることなく正しく行われたかどうかを確認することができます。



く必要な試薬など>

1. EMA 処理を行ったサンプル

検体の懸濁液を用意し、Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズによる EMA 処理を行った後、NucleoSpin® Tissue XS 等による DNA 抽出を行ったもの。(操作方法は、本書や各製品の説明書を参照)

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

増幅産物の検出はリアルタイム PCR (qPCR:サイクリングプローブ法で検出)、エンドポイント PCR (アガロースゲル電気泳動で検出)のどちらでも行うことができます。

キットの内容(25 µl 反応、50 回分)

1. 2 × Cycleave Reaction Mixture *1 2 × conc. 625 μ l 2. Primer/Probe Mix *2 5 × conc. 250 μ l 3. dH₂O 1 ml 4. Positive Control *3 125 μ l

- *1 酵素、バッファー、dNTP mixture を含む qPCR/PCR 反応試薬です。
- *2 蛍光標識プローブを含んでいますので、遮光に留意してください。
- *3 Viable Bacteria Selection Kit for PCR シリーズに添加されているものと同一のプラスミド DNA です。本製品による PCR 増幅対象領域は、既知の微生物ゲノム DNA と顕著な相同 性を有していないことを確認しています。

<実験操作>

反応液組成はリアルタイムPCR、エンドポイントPCRで共通です。PCR反応の詳細は、製品説明書をご覧ください。

1) 鋳型以外のマスターミックスを「必要本数+α」調製し、反応チューブに分注し、軽くフタをする。 (サンプルの反応以外に、Positive Control およびNegative Control反応も必ず行う)

★Positive Control反応 : キットに添付のPositive Control (PC)を添加する

★Negative Control反応 : キットに添付のdH2Oを添加する

反応液組成	
	液量(1反応)
2×Cycleave Reaction Mixture	12.5 µl
Primer / Probe Mix (5×conc.)	5.0 µl
dH ₂ O	2.5 µl
total	20.0 µl

- 2) 分注済チューブのうち、Negative Control反応のチューブに、dH2Oを5 µl添加し、しっかりフタをする。
- 3) 分注済チューブのうち、Positive Control反応のチューブに、PCを5 μl添加し、しっかりフタをする。 サンプル反応のチューブに、サンプルDNAを5 μl添加し、しっかりフタをする。
- 4) 反応チューブを軽く遠心する。(3秒程度)
- 5) リアルタイムPCR/PCR反応に供し、解析する。

反応条件			
95°C	10 秒		
\downarrow			
95°C	5 秒		
55°C	10 秒		45 Cycles
72°C	20 秒* 4	J	-

*4 リアルタイムPCRの場合、FAMで検出する。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

<結果判定>

1. コントロール反応

Ct 値 (162 bp の増幅産物)が

- ・陰性コントロール反応で得られた場合
- →コンタミネーションの疑いあり。
- ・陽性コントロール反応で得られなかった場合 →反応阻害の疑いあり。再反応を行う。
- 2. 検体サンプルを鋳型とした反応(「1.コントロール反応」で適切な結果が得られた反応条件下にて行う) Ct 値 (162 bp の増幅産物)が
 - 得られない場合 →EMA 処理操作が正しく行われている。

EMA 処理を行った検体サンプルでの生菌由来 DNA 検出へ進む。

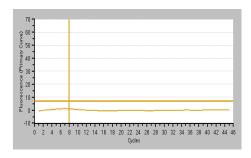
得られた場合 →検体に由来する成分が EMA 反応を阻害した可能性が高い。

検体からの夾雑物の除去あるいは検体の希釈などを検討する。

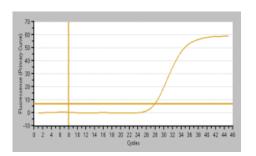
注意) プラスミド DNA と細菌ゲノム DNA とでは、EMA 処理の作用が異なる場合があります。 各菌種に対する EMA 処理の効果については、予め死菌を用いた条件検討により確認してください。

<反応例>

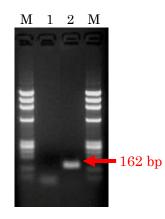
- 1. リアルタイムPCR反応の場合
 - •EMA反応が正常に進んだ場合



•EMA反応が正常に進まなかった場合



2. エンドポイントPCRの場合



- 1:EMA 処理が正常に進んだ場合
- 2:EMA処理が正常に進まなかった場合

M: φX174/*Hae* III digest

2% Agarose L03

Apply volume: 5 µl

Clontech Takara cellortis PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

V. 関連製品一覧

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 処理試薬 キット	各 100 回	7700	各¥74,000			
Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Positive)	グラム陽性菌用 EMA 処理試薬 キット		7705				
EMA 反応確認用試薬							
Control Test Kit (Viable Bacteria Selection)	リアルタイム PCR やエンドポイント PCR 検出で処理の成否を確認	50 回	CY290	¥42,000			
DNA 抽出関連製品							
NucleoSpin® Tissue XS	微量なサンプルからゲノム DNA を効率よく精製可能	10 回	740901.10	¥8,000			
		50 回	740901.50	¥36,000			
		250 回	740901.250	¥156,000			
光照射装置							
LED Crosslinker 30	1.5ml チューブ 30 本を一度に処 理可能な EMA 処理専用装置	一式	EM300	¥200,000			
リアルタイム PCR 装置							
Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC	多波長解析に対応した 96 ウェル のリアルタイム PCR 装置	一式	TP1010	¥4,500,000			
エンドポイント PCR 装置							
Clontech PCR Thermal Cycler GP	安定した温度制御機能と高い操作性を併せ持つコンパクトサーマルサイクラー	一台	WN400	¥580,000			

■特定菌用に最適化した専用試薬 : EMA 処理試薬キットで処理後、表中に記載の各 aPCR 試薬キットで特定菌を検出

レジオネラ属菌用 ★				
Viable <i>Legionella</i> Selection Kit for PCR Ver.2.0	レジオネラ属菌用に最適化した EMA 処理試薬キット	50 回	7714	¥71,000
CycleavePCR [™] <i>Legionella</i> (16S rRNA) Detection Kit	qPCR 専用試薬 ターゲットは 16S rRNA 遺伝子	25 回	CY240S	¥42,000
		50 回	CY240	¥73,000
腸管出血性大腸菌用				
Viable enterohemorrhagic <i>E.coli</i> Selection Kit for PCR	腸管出血性大腸菌用に最適化した EMA 処理試薬キット	50 回	7712 *	¥74,000
CycleavePCR™ O-157 (VT gene)	qPCR 専用試薬 ターゲットは VT1,VT2 遺伝子	50 回	CY217A	¥74,000
Screening Kit Ver.2.0		100 回	CY217B	¥135,000
カンピロバクター用				
Viable <i>Campylobacter</i> Selection Kit for PCR	カンピロバクタ一用に最適化した EMA 処理試薬キット	各 50 回	7713 *	¥74,000
CycleavePCR TM <i>Campylobacter</i> qPCR 専用試 (<i>jejuni/coli</i>) Typing Kit ターゲットは co	gPCR 専用試薬		CY225	¥97,000
	ターゲットは cdtC 遺伝子		(C. jejuni, C. coli 各 25 回)	

[★]レジオネラ属菌用には、「EMA-PCR法」に「液体培養 (Liquid Culture)」を組み合わせることで、より確実な生菌選択性 を実現する「LC EMA-qPCR法」用キットもあります。

^{*}受注生産品になります。

PCR/qPCR による生菌由来 DNA の選択的検出

- ●本冊子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。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社では一切の責任を負いません。
- ◆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。
- ◆本冊子の内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することはご遠慮ください。
- ◆本冊子に記載されている社名および製品名は、特に記載なくても各社の商標または登録商標です。
- ●本冊子記載の価格は2024年12月20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。
- ●ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。

タカラバイオ株式会社

営業部(東京) TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282 営業部(本社) 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 https://www.takara-bio.co.jp

公式X @Takara_Bio_JP / https://x.com/Takara_Bio_JP