

レジオネラ属菌 比色系パルサー法迅速検出検査キット

取扱説明書

株式会社ファスマック

〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘5-1-3

<http://www.fasmac.co.jp/>

目次

I.	キットの構成	2p
II.	キットの特徴	2p
III.	測定する際の注意事項	3p
IV.	その他必要な器具・装置	3p
V.	測定の原理	4p
VI.	検体サンプルの集菌・溶菌方法	4p
VII.	比色系パルサー法操作手順	5p
VIII.	測定フローチャート	6p
IX.	使用上の注意	7p

I. キットの構成

	品名	容量
①	変性液	900 μ L
②	中和液	300 μ L
③	1st ハイブリバッファー	900 μ L
④	アシストプローブ	300 μ L
⑤	プレハイブリバッファー	4.4mL
⑥	陰性コントロール(NTC)	800 μ L
⑦	陽性コントロール(PTC)	800 μ L
⑧	2nd ハイブリバッファー	3.8mL
⑨	ハニカムプローブ 1	300 μ L
⑩	ハニカムプローブ 2	300 μ L
⑪	洗浄液(10x濃縮)	25mL
⑫	抗体希釈液	4.4mL
⑬	抗体液	90 μ L
⑭	発色液	1.8mL
⑮	発色基質液(遮光)	450 μ L
	オリゴ固相化 8 ウェルストリップ	3 ストリップ
	ストリップ用フレーム・フタ(初回のみ)	1 セット

★オリゴ固相化 8 ウェルストリップを含めてすべての試薬は 2~8°C 保存です。

II. キットの特徴

1. 8 ウェルストリップを使用したパルサー法を用いているため、37°Cで迅速にレジオネラ属菌測定できるという特徴があり、特別な施設・設備等を必要とせず、目視で判定できることから、通常の実験室での測定が可能です。
2. このキットは検体中のレジオネラ属菌の増殖・生存に関与する 16SrRNA を検出します。PCR 等による遺伝子増幅を必要としません。また、培養公定法と同等以上検出感度を有しており、約 10CFU/100mL 以上のレジオネラ属菌を測定可能です。
3. 単純温泉、浴槽水、貯湯槽水、冷却塔水などの検体も測定可能です。

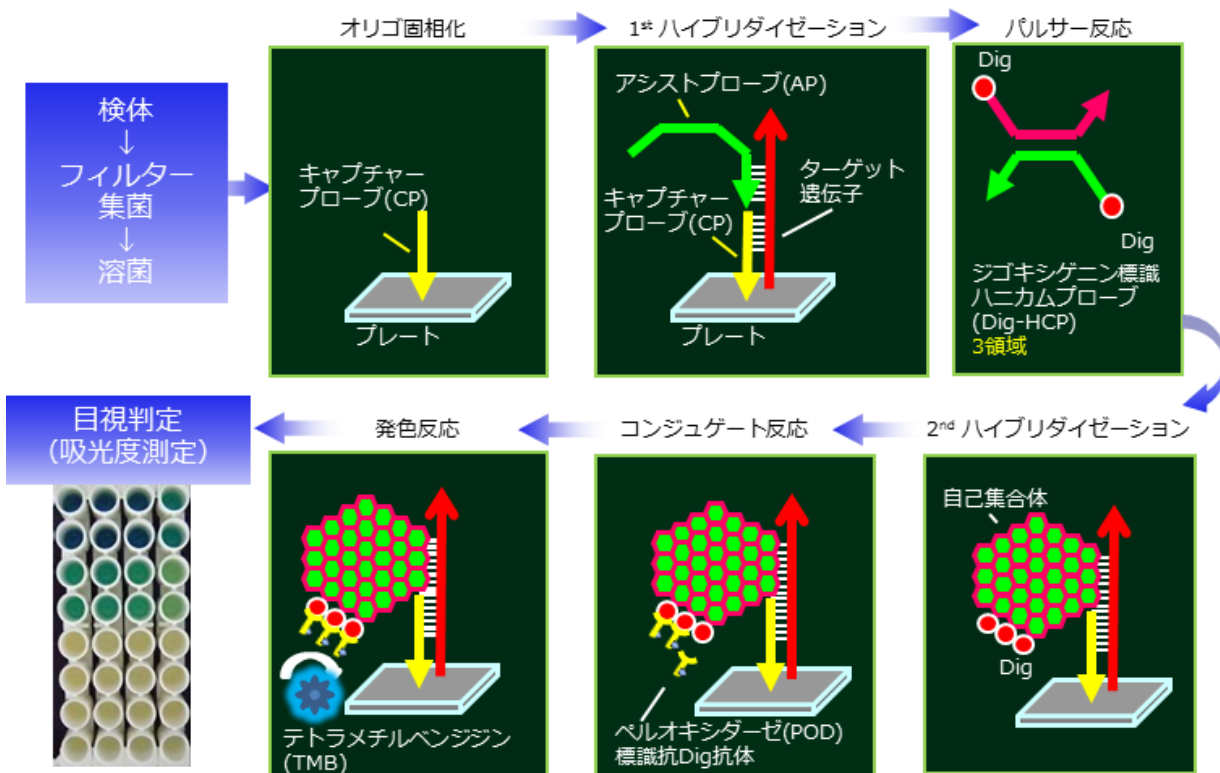
III. 測定する際の注意事項

1. 試薬は全て室温(20~25°C)に戻してからご使用ください。
★結晶または沈殿が生じている場合は加温溶解してからご使用ください。
2. 反応時間を厳守して測定してください。
3. 試薬を分注する際、ピペッティング容量にばらつきが生じないように注意してください。マイクロピペット等のピペッティング器具は、定期的に点検してください。
4. 実験に用いる器具類は汚染が無いよう、使用前に十分洗浄してください。またウェルへの分注の際に用いるピペットチップは、フィルター付きのものをお勧めします。
5. 本キットによる測定は非常に高感度なため、清潔な環境で行ってください。汚染を防ぐため、マイクロプレート操作後は必ず付属のプレート用ふたをしてください。
6. 実験中はマスクや使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。
7. 各反応終了後の洗浄操作は非常に重要です。洗浄不十分な場合、バックグラウンドが高くなる可能性があります。ウェル内に液が残存していないことを十分確認しながら洗浄操作を行ってください。ペーパータオルなどの使用をお勧めします。発色反応は遮光下で行ってください。

IV. その他必要な器具・装置

1. マイクロピペット及びチップ
10 μ L~5,000 μ L の範囲の溶液を扱えるものがが必要です。
2. ポリプロピレン製チューブ
1.5mL~5.0mL の範囲の溶液を扱えるものがが必要です。
3. 8連マルチピペットを使用する場合には、リザーバーが必要です。
4. インキュベーター
5. ボルテックス及び小型遠心機
6. 13mm ポアサイズ 0.22 μ m または 0.45 μ m 滅菌フィルター及び 13mm フィルター用ホルダー
7. 滅菌ピンセット
8. ロックタイプ滅菌シリンジ
5mL

V. 測定の原理



VI. 検体サンプルの集菌・溶菌液の調製

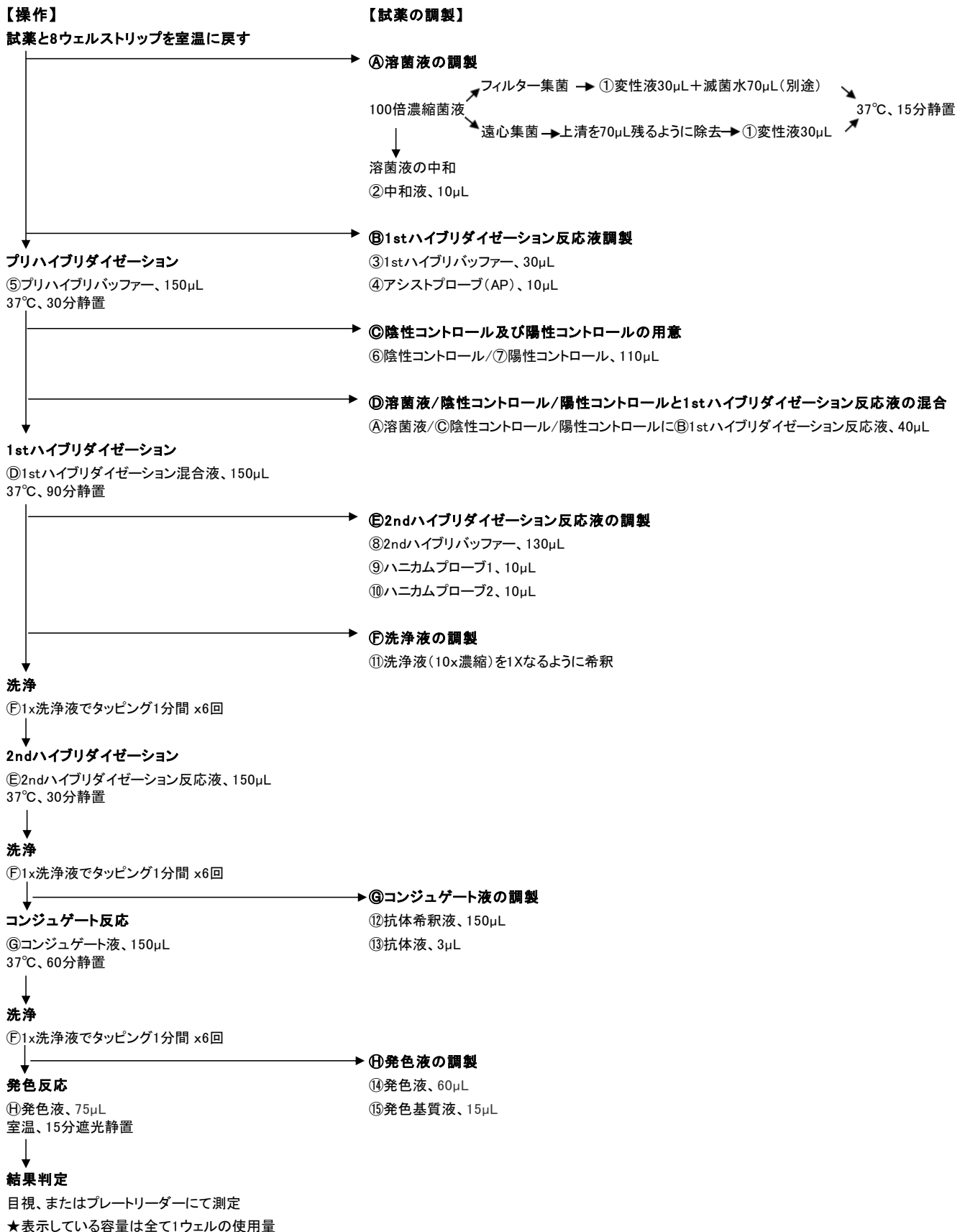
1. ろ過または遠心にて検体を 100 倍濃縮します。
 2. フィルター(2A)または遠心(2B)どちらかの方法にて集菌を行います。
 - 2A. フィルター集菌する場合：
 - (a). ①変性液に 2.1mL の滅菌水(別途)を添加し、混合します。
 - (b). 13mm ポアサイズ 0.22 μ m または 0.45 μ m のフィルターで 100 倍濃縮菌液をろ過集菌します。
 - (c). 滅菌ピンセットで集菌済みフィルターを 1.5mL または 2.0mL チューブの底に入れます。
 - (d). 調製済み①変性液 100 μ L をチューブに加え、ボルテックスで 1 分間混合したのち、小型遠心機でスピンドアウンします。
 - 2B. 遠心集菌する場合：
 - (a). 100 倍濃縮菌液を遠心します。
 - (b). 上清を 70 μ L 残るように除去します。
 - (c). ①変性液 30 μ L をチューブに加え、ボルテックスで 2 秒間混合したのち、小型遠心機でスピンドアウンします。
 3. 37 $^{\circ}$ C で 15 分間静置します。
 4. ②中和液 10 μ L をチューブに加えて、ボルテックスを 2 秒間混合したのち、小型遠心機でスピンドアウンします。
- ★溶菌液はただちに測定することをお勧めします。
 ただちに測定できない場合には、-20 $^{\circ}$ C で保存し、2 週間以内に測定してください。

VII. 比色系パルサー法操作手順

1. オリゴ固相化 8 ウェルストリップ必要本数を袋から取り出して、フレームにセットし、フタをして、室温に戻します。
2. 全ての試薬を使用前に室温に戻して、よく混合してください。
3. ③1st ハイブリバッファー 30 μ L と④アシストプローブ 10 μ L を 1.5mL また 2.0mL チューブに入れ、ボルテックスを 2 秒間かけて混合し、小型遠心機でスピンドアウンした後、室温放置します。
4. ⑤プレハイブリバッファー 150 μ L を各ウェルに添加、フタをします。タッピングで気泡を抜いた後、37 $^{\circ}$ C インキュベーターで 30 分間静置します。
5. 静置を行っている間に、⑥陰性コントロール、⑦陽性コントロール 110 μ L をそれぞれ 1.5mL チューブに入れ、室温放置します。
6. 4. の 30 分間静置の後、ウェル内の溶液を完全に除去します。
7. 3. で調製した 1st ハイブリダイゼーション反応液 40 μ L を 5. で準備した陰性コントロールチューブ、陽性コントロールチューブ、及び VI で調製した溶菌液に加え、ボルテックスを 2 秒間かけて混合し、小型遠心機でスピンドアウンした後、全量を 8 ウェルストリップの各ウェルに添加します。
8. フタをし、タッピングで気泡を抜いた後、37 $^{\circ}$ C インキュベーターで 90 分間静置します。
9. 8. の静置開始直後に、2nd ハイブリダイゼーション反応液を調製します。⑧2nd ハイブリバッファー 130 μ L を 1.5mL、2.0mL または 5.0mL チューブに入れ、⑨ハニカムプローブ 1 と⑩ハニカムプローブ 2 各 10 μ L をチューブに加え、ボルテックスを 2 秒間かけて混合し、小型遠心機でスピンドアウンした後、室温放置します。
10. ⑪洗浄液 (10x濃縮) 全量を 250mL メスシリンダーに入れ、蒸留水で 250mL にメスアップします (10 倍希釈)。
11. 8. の 90 分間静置の後、各ウェル内の溶液を除去し、10. で調製した 1x 洗浄液を各ウェルあたり 250~300 μ L 加え 1 分間タッピングし、洗浄液を捨てます。同様の操作を 6 回繰り返します。
12. 各ウェル内の洗浄液を完全に除去し、9. で調製した 2nd ハイブリダイゼーション反応液 150 μ L を各ウェルに添加します。
13. フタをし、タッピングで気泡を抜いた後、37 $^{\circ}$ C インキュベーターで 30 分間静置します。
14. 30 分間静置の後、各ウェル内の溶液を除去し、11. と同様に、6 回洗浄します。
15. 各ウェル内の溶液を完全に除去します。この際に、プレートをペーパータオルに強く打ち付ける操作は行わないでください。
16. ⑫抗体希釈液 150 μ L を 1.5mL、2.0mL または 5.0mL チューブに入れ、⑬抗体液 3 μ L を加え、ボルテックスを 2 秒間かけ混合し、150 μ L を各ウェルに添加します。
17. フタをし、タッピングで気泡を抜いた後、37 $^{\circ}$ C インキュベーターで 60 分間静置します。
18. 60 分間静置の後、各ウェル内の溶液を除去し、11. と同様に、6 回洗浄します。
19. 各ウェル内の溶液を完全に除去します。この際に、プレートをペーパータオルに強く打ち付ける操作は行わないでください。
20. ⑭発色液 60 μ L を 1.5mL、2.0mL または 5.0mL チューブに入れ、⑮発色基質液 15 μ L を加え、ボルテックスを 2 秒間かけ混合し、75 μ L を各ウェルに添加します。
21. フタをし、タッピングで気泡を抜いた後、室温遮光下で 15 分間静置して発色反応させます。
22. 目視で判定：青色に発色すれば陽性、発色がなければ陰性と判定します。
★透明プレートを利用した場合、プレートリーダーを用い波長 620~650nm で各ウェルの吸光度を測定します。

注) 表示している容量は洗浄液を除く全て 1 ウェルの使用量です。まとめて調製する場合、各ウェルの反応液を正確に調製するために、ウェル数プラス α で調製することをお勧めします。

VIII. 測定フローチャート



IX. 使用上の注意

1. 本製品はレジオネラ属菌を検出するためのキットです。その他の目的にはご使用になれません。
2. 試薬についての基礎的な知識のある方以外は、取り扱いしないでください。
3. 本製品の使用にあたっては、取扱説明書の記載内容通りに行ってください。
4. 取扱説明書記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。
5. 本製品各試薬のラベルには使用期限が表示されております。使用期限を守ってご使用ください。
6. 廃棄方法は、国または地方自治体の条例に従ってください。
素材：ストリップ(PS)、チューブ(PP)、ボトル(PP)、ラベル(PET)、箱(紙)、マニュアル(紙)
7. 本品に含まれる①変性液、②中和液、④発色液、⑤発色基質液は、法規制物質である SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、水酸化ナトリウム、塩化水素、過酸化水素、N-N-ジメチルホルムアミドを含有しております。十分ご注意ください。

【製造・販売元】

株式会社ファスマック 遺伝子検査事業部
〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3
TEL: 046-295-8787 FAX: 046-294-3738
E-mail: gmo@fasmac.co.jp