参考資料

サルモネラの増菌方法例

1　食品からの増菌方法

試料25gにリン酸緩衝ペプトン水等225*ml*を加えストマッカー等で細断し、35℃で18～24時間培養する。培養後よく混和し、培養液1.5*ml*をハーナテトラチオン酸塩培地等15*ml*に加え、42℃で20～24時間培養する。

2　サルモネラの損傷の少ない食品からの増菌方法

試料25gにハーナテトラチオン酸塩培地等225*ml*を加えストマッカーなどで細断し、42℃で20～24時間培養する。

培　地

1　リン酸緩衝ペプトン水

BUFFERED PEPTONE WATER 20gを蒸留水1000*ml*に加え加温溶解後、10%Tween80水溶液60*ml*を加え121℃で15分オートクレーブ滅菌する。

2　ハーナテトラチオン酸塩培地

ハーナテトラチオン酸塩基礎培地79.5gを滅菌水1000*ml*に加え加温溶解後、45℃以下に冷却しヨード溶液40*ml*を加える。

＊ヨード溶液：ヨウ化カリウム8gを蒸留水40*ml*に溶解後、ヨード（ヨウ素）5gを加えて溶解する。

寒天培地からの溶菌液調製方法

マイクロチューブに適当なコロニーを白金耳で掻き取り、150 μ*l*の滅菌水に懸濁する。
⑮変性液1Sを50 μ*l*、②変性液2を25 μ*l*加え35～37℃で10分間放置する。
溶菌液として50 μ*l*を使用する。

特異性試験

130以上の血清型のサルモネラについて本キットを用いて試験したところ、いずれも10^5～10^6個／*ml*以上で反応し陽性を示しました。
一方、サルモネラ類縁菌を含む多数の菌種について同様に試験を行いました。その結果、サルモネラに非常に類縁である*Citrobacter freundii*の中に10^{10}個／*ml*以上で非常に弱い反応を示すものがありましたが、それ以外のほとんどの細菌は10^{10}個／*ml*以上でも反応せず、本キットでは陰性でした。
　従って、本システムはサルモネラに特異的であると言えます。

取扱上の注意

- ロットの異なる試薬等を混合しないで下さい。
- 冷蔵保存(2～8℃)をして下さい。
  尚、⑥conjugate濃縮液と⑦conjugate希釈液の混合液(BufferB)は、冷蔵で2ヶ月程度安定です。2ヶ月以上の保存(使用期限内まで)を希望される場合には、混合後は分注して冷凍保存して下さい。
- 試薬が目・手・皮膚についた場合、すばやく水道水で洗い流して下さい。
  異常があれば医師の手当てを受けて下さい。
- 使用期限は箱の側面に記載しております。
- 本キットは臨床診断用ではありません。
- 本キットは公定法との100%一致を保証するものではございません。

操作方法に関するお問い合わせ先

株式会社 ファスマック
TEL 046-295-8787
FAX 046-294-3738

製造元
株式会社 ファスマック
〒243－0041 神奈川県厚木市緑ケ丘5－1－3
TEL 046-295-8787
FAX 046-294-3738
E-mail:gmo@fasmac.co.jp
http://www.fasmac.co.jp/

発売元
株式会社 科学飼料研究所
〒104－0032 東京都中央区八丁堀3－3－5（住友不動産八丁堀ビル7F）
http://www.kashiken.co.jp/

【お問い合わせ先】
TEL 027-347-3223　FAX 027-347-4577

2019.10.18

試薬リスト

DNA固相化ウェル	48ウェル/24ウェル
① 変性液1	5*ml*×1
⑮ 変性液1S	5*ml*×1
② 変性液2	5*ml*×1
③ 陰性コントロール液	0.5*ml*×1
④ 陽性コントロール液	0.5*ml*×1
⑤ プローブ液	2.5*ml*×1
⑥ Conjugate 濃縮液	0.1*ml*×1
⑦ Conjugate 希釈液	5*ml*×1
⑧ 発色原液A	5*ml*×1
⑨ 発色原液B	1.5*ml*×1
⑩ ×200洗浄液	5*ml*×2

器具・器材の準備

- 保温器(35℃～37℃)
- 接着用テープ
- ウェル固定用フレームが浸かる洗浄用容器
- マイクロチューブ(PP製が望ましい)
- マイクロピペット:20～200 μ*l* がとれるもの
- マイクロチップ(滅菌済みが望ましい)

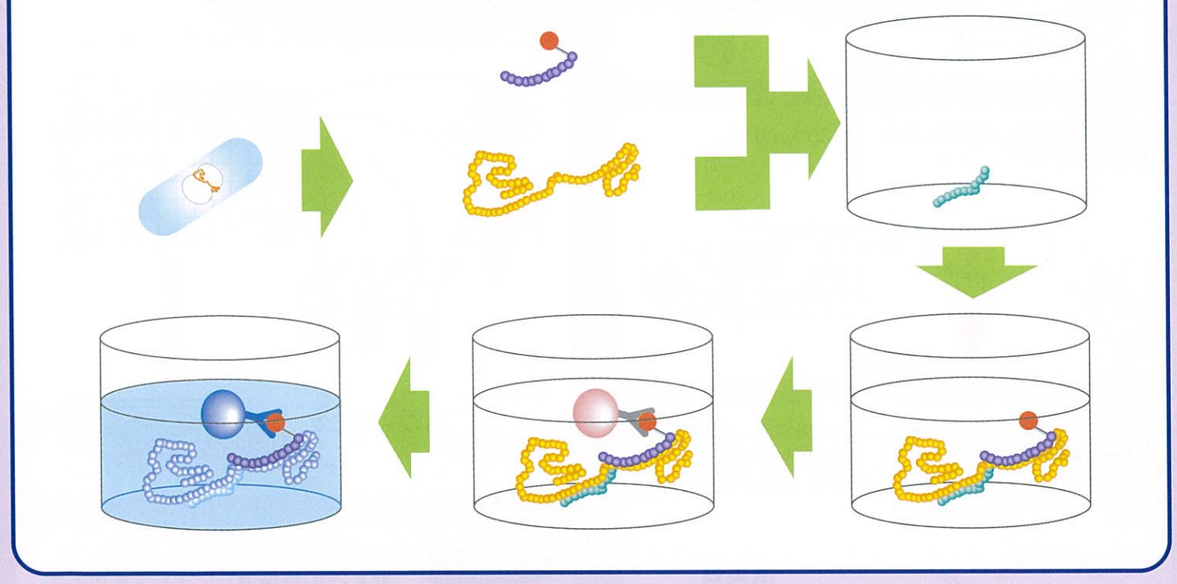
ガラス製の試験管及び、ガラス製のピペットを用いると感度が下がりますので、使用しないで下さい。

使用前に必ず説明書を読み、
取扱い上の注意・操作手順を守って使用してください。
異なるロットの試薬は使用しないでください。

核さんテスト
サルモネラ

食品検査用

DNAプローブ法による迅速サルモネラ検査キット



FASMAC

操作手順

溶菌液の調製操作（操作1～4）の際に使用したマイクロチップは、消毒液に浸けるかオートクレーブ処理を行い、滅菌してから捨てて下さい。
ただし、調製後の操作（操作6以降）で使用したマイクロチップ等は滅菌の必要がありません。
また、同一試薬を固相化ウェルに分注するとき、ウェルの側面・底面等にマイクロチップの先が触れた場合は、新しいマイクロチップに換えて操作を続けて下さい。

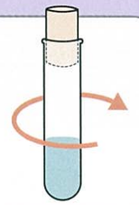
操作 1

マイクロチューブに**①変性液1**を100μl入れる。

- ただし、亜セレン酸ナトリウムを含有する選択増菌培地を使用した場合には①の代わりに**⑮変性液1S**を100μl入れる。
- 試薬の中に沈殿物や浮遊物が存在する場合がありますが、そのまま使用して頂いて検査に全く問題はありません。

操作 2

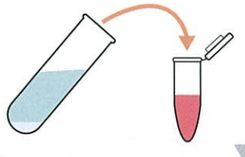
選択増菌培養液をよく撹拌する。



- 図はハーナテトラチオン酸塩培地を使用した時のものです。培地の種類や培養するサンプルによって色が異なる場合があります。

操作 3

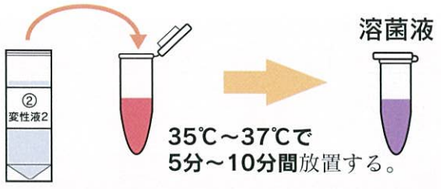
培養液（操作2）を300μl採取してマイクロチューブ（操作1）に加え、よく混ぜる。



- 選択増菌培養液がハーナテトラチオン酸塩培地あるいはサルモシストの場合は、操作2の撹拌後5分～10分間静置してから上清を採取する。

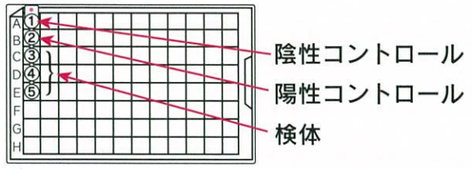
操作 4

マイクロチューブ（操作3）に**②変性液2**を50μl加え、よく撹拌する。
→操作1で①変性液1を使用した場合、検体の溶液の色は赤色から紫色に変化する。



操作 5

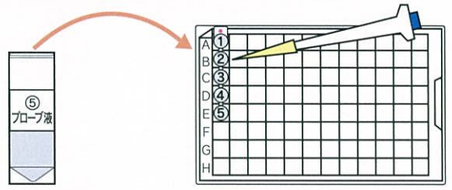
添付のフレームからウェルを一旦取り外す。
必要数のウェル**（陰性コントロール＋陽性コントロール＋検体数）**のみフレームにセットする。



- ウェルのつなぎめを割って、切り離すことができます。
- 複数のレーンを使用する場合、レーンの間隔を必ずあけて下さい。
- 洗浄操作の際にフレームからウェルが外れる危険性があります。どのサンプルがどのウェルにあたるのかが分かる様、あらかじめウェルの縁に印を打っておくとよいでしょう。

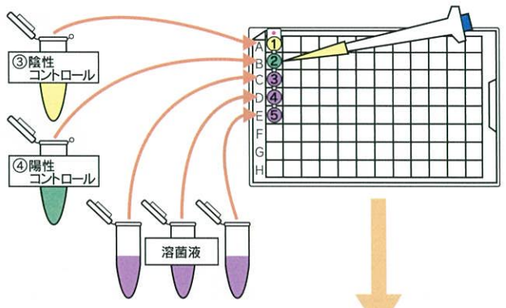
操作 6

セットした各ウェルに**⑤プローブ液**を50μl加える。

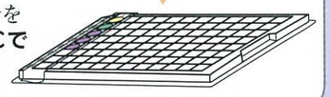


操作 7

1に**③陰性コントロール液** 50μl、
2に**④陽性コントロール液** 50μl、
3-5に**各検体の溶菌液**（操作4）50μlずつを加える。



接着用テープでウェルをシールし、**35℃～37℃で1時間**放置する。



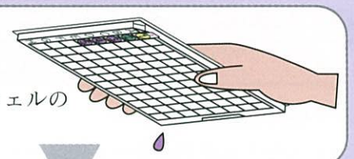
操作 8

生理食塩水（0.85%NaCl）1lに**⑩×200洗浄液**1本分を全量加えて、**Buffer A**を調製する。

- 洗浄液の組成は、0.05% Tween20/0.85% NaClです。
キットには2リットル分入れておりますが、万が一不足した場合には、この組成で調製して下さい。調製後は、室温で3ヶ月安定です。（オートクレーブ等は不要です。）

操作 9

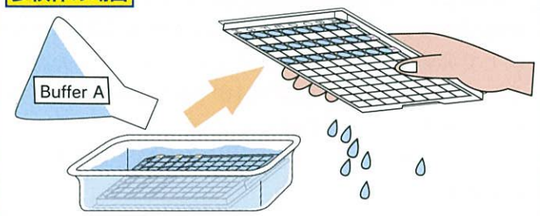
テープをはがし、ウェルの液を排水に捨てる。



操作 10

検体数に合った下記の洗浄操作を選んで、調製した**Buffer A**（操作8）でウェルを洗う。

多検体の場合

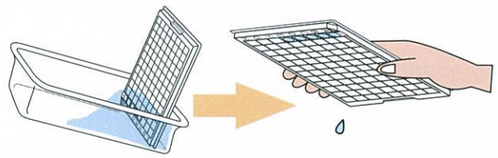


(1) 上図のように、洗浄用容器に調製したBuffer Aを加える。
(2) プレートごと沈めてウェルの中をBuffer Aで満たし、泡立てるように数回揺らして洗う。
(3) ウェルに入ったBuffer Aを排水に捨てる。
(4) この(2)～(3)の操作を**10回程度**繰り返し行う。
(5) 洗浄操作後、ウェルを逆さにして乾いたペーパーなどの上にプレートごと数回叩きつけ、水分を拭き取る。
(6) 操作後、洗浄用容器に残ったBuffer Aは排水に捨てる。

- ウェル周辺に泡立ちが多い場合は、フレームからウェルが外れやすいので、精製水（蒸留水、イオン交換水）で泡を軽く洗い流してから上記の(5)と同様の操作を行って下さい。

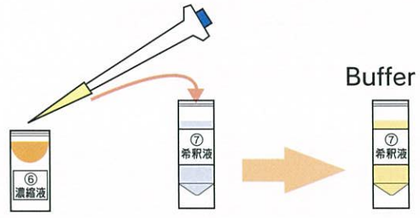
少検体の場合

洗浄用容器に調製したBuffer Aを少量加えて、洗浄用容器を傾けて上記の方法と同じように泡立てるように洗浄する。



操作 11

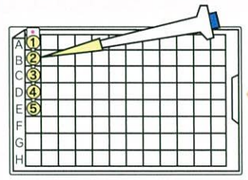
⑥ Conjugate濃縮液を
⑦ Conjugate希釈液に全量加え、
Buffer Bを調製する。
→⑦に⑥を加えると黄色に変化する。



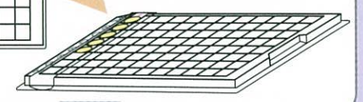
- ⑥の液量は少ないため、⑦に加える時はマイクロピペットを使用して下さい。
- ⑥の液量が少ない場合は、容器の蓋に試薬が残っていることがありますので確認をして下さい。
また、濃縮が起こり液量が減る場合もあります。この場合、⑦の液で⑥の容器をとも洗いして使用して下さい。
- Buffer Bは、4℃で2ヵ月安定です。
なお、凍結融解を繰り返さないように分注して冷凍保存を行えば、6ヶ月安定です。

操作 12

調製した**Buffer B**（操作11）100μlを各ウェルに加える。



接着用テープでウェルをシールし、**35℃～37℃で1時間**放置する。



操作 13

テープをはがし、ウェルの液を捨て洗浄操作を行う。
（洗浄方法は、**操作9、10**に同じ）

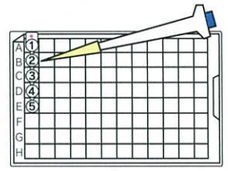
操作 14

⑧発色原液Aと**⑨発色原液B**を**4:1**で混合する。（容器、チップ共にPP製を使用する。ガラス製の容器、ピペットでも代用可）

- 使用直前に、使用のウェル数に必要量
<1ウェルあたり100μlが分注できる量>
だけ調製してください。

操作 15

使用直前に調製した**発色液**100μlを各ウェルに加え、添付の紙板を載せる。

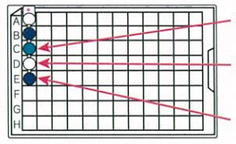


直射日光を避けるため添付の紙板をウェル上に載せ、**室温で15分間**放置する。

- 余った調製済みの発色液は捨てて下さい。

判　定

ウェルを添付の白紙板上に置き、目視で判定する。
陰性コントロールより青色を呈するものを陽性とする。
（下図の場合、検体3番と5番が陽性です。）



検体3番：陽性
検体4番：陰性
検体5番：陽性

なお、マイクロプレートリーダーを用いて、630nm～660nmの吸光度を測定し、判定することも可能です。この場合、陰性コントロールのOD測定値と検体のOD測定値の差が0.05以上を陽性とします。

- 直射日光があたらない場所で判定して下さい。
- 判定後のウェル中の発色液は、排水等に捨てます。
また、使用したウェルはフレームから外し、一般用ゴミ又はプラスチック専用ゴミに捨てて下さい。
- 未使用のウェルがある場合は、使用したフレームを水道水で軽く洗い、水分を拭き取ってから再使用して下さい。