研究用試薬

2023 年 5 月作成（第 1 版）

Legionella pneumophila 血清型別マルチプレックス PCR 用試薬

GenCheck® *Legionella* SG pre-mix primer set	商品コード：5-0002
GenCheck® *Legionella* SG control set	商品コード：5-0003
GenCheck® *Legionella* SG pre-mix primer ＆ control set	商品コード：5-0004

取扱説明書

Ⅰ 製品説明

L. pneumophila は 15 血清群に分けられるが、血清群特異的配列プライマーを用いたマルチプレックス PCR（M-PCR）により、血清群をグループ分けすることができる。この M-PCR は 2 段階から成り、1 段階目の M-PCR で、血清群 1、血清群 2、血清群 3/15、血清群 5、血清群 6/12、血清群 7、血清群 8、血清群 9、血清群 11、血清群 13、血清群 14 の判定ができる（血清群 3 と 15、血清群 6 と 12 は区別することができない）。いずれの血清群のバンドも得られなかった場合は、血清群 4/10 プライマーを用いた 2 段階目の PCR を行い、バンドを確認する（バンドが得られた場合、血清群 4 または 10 と判定される。血清群 4 と 10 は区別できない）。供試菌株が *L. pneumophila* である場合には、1 段階目か 2 段階目のいずれかで血清群特異的なバンドが確認できる。M-PCR には *Legionella* 属特異的プライマーも加えてあり、供試菌株が *Legionella* 属菌であることを確認するとともに、PCR 反応が正しく行われているか確認できる。

Ⅱ 製品内容

	名　　称	数量
Ⅰ	GenCheck® *Legionella* SG pre-mix primer set 商品コード：5-0002	Primer set1（1 段階目 M-PCR 用）　40 反応分（100 μL × 2 本） （SG4/10 primer 以外、及び *Legionella* 属特異 5SrRNA primer） Primer set2（2 段階目 M-PCR 用）　40 反応分（35 μL × 1 本） （SG4/10 primer 及び *Legionella* 属特異 5SrRNA primer）
Ⅱ	GenCheck® *Legionella* SG control set 商品コード：5-0003	PTC1　20 反応分（20 μL × 1 本） （5SrRNA＝108 bp、SG8= 166 bp、SG1= 249 bp、SG3/15= 408 bp、SG2= 543 bp、SG6/12= 698 bp、S14= 986 bp） PTC2　20 反応分（20 μL × 1 本）） （5SrRNA＝108 bp、SG5= 205 bp、SG11= 314 bp、SG13= 461、SG9= 634 bp、SG7= 835 bp、SG4/10= 235 bp）
Ⅲ	GenCheck® *Legionella* SG pre-mix primer & control set 商品コード：5-0004	Primer set1（1 段階目 M-PCR 用）　40 反応分（100 μL × 2 本） （SG4/10 primer 以外、及び *Legionella* 属特異 5SrRNA primer） Primer set2（2 段階目 M-PCR 用）　40 反応分（35 μL × 1 本） （SG4/10 primer 及び *Legionella* 属特異 5SrRNA primer） PTC1　10 反応分（10 μL × 1 本） （5SrRNA＝108 bp、SG8= 166 bp、SG1= 249 bp、SG3/15= 408 bp、SG2= 543 bp、SG6/12= 698 bp、S14= 986 bp） PTC2　10 反応分（10 μL × 1 本）） （5SrRNA＝108 bp、SG5= 205 bp、SG11= 314 bp、SG13= 461、SG9= 634 bp、SG7= 835 bp、SG4/10= 235 bp）

Ⅲ 保存方法

－20°C

Ⅳ 使用期限

外装に記載

Ⅴ 本製品以外に必要な試薬および機器類

試薬　QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix（Qiagen, Hilden, Germany）
アガロースゲル（濃度 2.0%～2.5%）
ゲルローディングバッファー
電気泳動用バッファー（0.5×～1.0× TAE buffer）
DNA 分子量マーカー
ゲル染色液（エチジウムブロミド溶液、 または同等の結果が得られるもの）

機器類　PCR 増幅反応装置　Veriti［アプライドバイオシステムズ社製］、または同等の結果が得られるもの
電気泳動装置および画像解析装置
マイクロピペット、チップ、チューブ
ボルテックスミキサー
卓上遠心機

Ⅵ 実施例

［試薬調製および PCR 増幅反応］

1. QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix、Primer set1、Primer set2、PTC1、PTC2 及び RNase-Free Water を解凍した後、ボルテックスミキサーで撹拌し、卓上遠心機等でスピンダウンする。
2. 反応液組成表に従い、鋳型 DNA 及び PTC 以外の試薬を必要量調製し、ボルテックスミキサーで混合し、卓上遠心機等でスピンダウンする。
3. 調製した溶液から 19 μL ずつを PCR 用チューブまたは PCR 用プレートのウェルに分注する。
4. 鋳型 DNA または PTC を PCR 用反応チューブまたは PCR 用プレートのウェルに 1.0 μL ずつ加えた後、PCR 増幅反応装置にセットする。
5. PCR 反応条件に従って、PCR を開始する。

※ 反応系へのコンタミネーションがないことを確認するためには、Primer set を加えないもの並びに DNA 溶液を加えないものを陰性コントロールとし、同時に PCR を行なうことを推奨する。

※ 鋳型 DNA 1ng 程度あるいは 10^4～10^6 CFU 相当レジオネラ菌体（滅菌した爪楊枝で平板上のコロニーをつつき、10～100 μL の滅菌水に懸濁し、そのうちの 1 μL を用いる）

［反応液組成表］

1段階目 M-PCR

2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	10 μL
Primer set1	4.8 μL
鋳型 DNA または PTC または RNase-Free Water	1.0 μL
RNase-Free Water	4.2 μL
Total	20 μL

2 段階目 M-PCR

2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	10 μL
Primer set2	0.8 μL
鋳型 DNA または PTC または RNase-Free Water	1.0 μL
RNase-Free Water	8.2 μL
Total	20 μL

［PCR 反応条件］

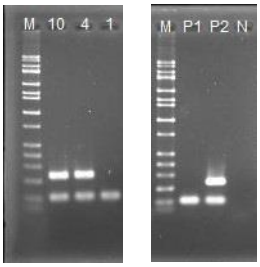
温度	時間	サイクル数
95°C	15 min	1 cycle
94°C	30 sec	28 cycles
60°C	90 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	1 cycle
4°C	∞	

［電気泳動］

1. TAE バッファーを満たした電気泳動槽に 2.5%アガロースゲルをセットし、PCR 増幅反応溶液 2.0～4.0 μL と適当量のゲルローディングバッファーを混合しウェルに全量注入する。
2. 電気泳動を行う。

1段階目

2 段階目



M：marker (Wide-Range DNA Ladder, Takara Bio Inc.), 数字：血清群, P1：PTC1, P2：PTC2, N：No Template Control
1段階目 Primer set1／P1（下から 5SrRNA, SG8, SG1, SG3/15, SG2, SG6/12, S14）, Primer set1／P2（下から 5SrRNA, SG5, SG11, SG13, SG9, SG7）, 2 段階目 Primer set2／P1（5SrRNA のみ）, Primer set2／P2 (下から 5SrRNA、SG4/10)

Ⅶ 使用上の注意

(1) 本製品は PCR をするための試薬です。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、取り扱わないでください。
(3) 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。
(4) 本製品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。
(5) 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 ： 0.5 mL チューブ（PP）、袋（PE）、ラベル（PET）
(6) 本製品は冷凍保存品となります。使用前に氷上等で融解し、良く混ぜてから使用してください。

Ⅷ 参考文献

Nakaue R, Qin T, Morita M, Ren H, Chang B, Murai M, Amemura-Maekawa J, and Ohnishi M: Development of a multiplex-PCR serotyping assay for characterizing *Legionella pneumophila* serogroups based on the diversity of LPS biosynthetic loci. J Clin Microbiol. 59: e00157-21, 2021.

製造販売元 ： FASMAC 株式会社ファスマック
お問い合わせ先 ： 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