

取扱説明書

シカジーニクス® AmpC遺伝子型検出キット
Cica Geneus® AmpC Genotype Detection KIT

1. はじめに

AmpC 型 β -ラクタマーゼは、主にセファロスポリン系抗菌薬を分解する酵素です。多くのグラム陰性桿菌は染色体上に AmpC 遺伝子を保有しており、抗菌薬の曝露等によって AmpC の過剰産生が誘導されます(染色体性 AmpC)。また、染色体上に AmpC 遺伝子を保有しない菌種でも、AmpC をコードするプラスミドを獲得することがあります(プラスミド性 AmpC)。染色体性 AmpC の過剰産生菌やプラスミド性 AmpC 産生菌は、第三世代セファロスポリン系やセファマイシン系抗菌薬を含む多くの β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示します。また、プラスミド性 AmpC 遺伝子は菌種を超えて広がる危険性があり、日常的な対策・監視の必要性が高まっています。本キットは、広島大学院内感染症プロジェクト研究センター 鹿山鎮男先生、原稔典先生、菅井基行先生、大毛宏喜先生との共同研究の成果を用いて開発されたもので、1 検体につき 2 種類のマルチプレックス PCR を行なうことで、代表的な AmpC 型 β -ラクタマーゼ遺伝子ファミリー 6 種類を検出することができます。

2. 製品形態

製品名	シカジーニクス® AmpC 遺伝子型検出キット Cica Geneus® AmpC Genotype Detection KIT
製品番号	08143-96
容量	30 回分
保管温度	冷凍保存 (-20 °C ~ -25 °C)

3. キット構成 (30 回)

個別名称	容量
試薬 A (ラベル白) AptaTaq DNA Master (5 × Conc.) ^{※1}	240 μ L × 1 本
試薬 B (ラベル赤) PCR サプリメント	420 μ L × 1 本
試薬 C (ラベル紫) プライマーミックス α (CIT, FOX, ACT)	120 μ L × 1 本
試薬 D (ラベル緑) プライマーミックス β (DHA, ACC, MOX)	120 μ L × 1 本
試薬 E (ラベル黄) ポジティブコントロール	100 μ L × 1 本
試薬 F (ラベル青) 6 × ローディングバッファー	240 μ L × 1 本

^{※1}AptaTaq DNA Master は、Roche Diagnostics K. K. の商品です。

4. 原理

AmpC 遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いて、マルチプレックス PCR で標的配列を増幅します。増幅産物を電気泳動で分離し、目的サイズのバンドの有無で AmpC の遺伝子型を判定します。

5. 適用範囲

AmpC 型 β -ラクタマーゼ遺伝子ファミリー 6 種類 (CIT, FOX, ACT, DHA, ACC, MOX)

6. プロトコール

① DNA 抽出

選択分離培地(クロモアガー mSuper CARBA/C3GR 分画培地(製品番号: 72150))などを用いて AmpC 産生が疑われる菌株を単離し、別売のシカジーニクス® DNA 抽出試薬(製品番号: 08178-96)で菌体から DNA を抽出して下さい。また、別売の DNA 精製キットであるシカジーニクス® トータル DNA プレップキット(製品番号: 08204-96)やフェノール/クロロホルム法などを用いて調製した精製 DNA (1 ng/ μ L) もテンプレート DNA として利用できます。

・シカジーニクス® DNA 抽出試薬の使用法

- 1) 別途調製したシカジーニクス® DNA 抽出試薬の混合液 100 μ L をマイクロチューブに入れて下さい。
- 2) 分離培養によって得られたコロニーを滅菌生理食塩水に懸濁し、マクファーランド比濁法を用いて濁度標準液 第 1~3 番程度となるように菌液を調製して下さい。調製した菌液 10 μ L を 1) のマイクロチューブに入れて軽く混和して下さい。菌濃度は濃すぎないようにご注意ください。
- 3) 72 °C で 6 分間、94 °C で 3 分間インキュベートして下さい。
- 4) 遠心分離 (15,000 rpm 又は 12,000 × g 以上、1 分間) した上清をテンプレート DNA として下さい。

② PCR

各試薬を室温で融解して下さい。融解後、直ちに転倒混和もしくはタッピングで穏やかに混和してスピンドダウン後、氷冷して下さい。表 1 に従って、1 検体あたり Reaction mixture 1 と 2 の 2 種類の PCR 反応液を PCR チューブに調製して下さい。ポジティブコントロール(試薬 E)を検体にする場合は、テンプレート DNA と置き換えて使用して下さい。なお、調製した PCR 反応液の室温放置は避けて下さい。

表 1 PCR 反応液の調製

試薬	Reaction mixture 1	Reaction mixture 2
テンプレート DNA 溶液	5.0 μ L	5.0 μ L
試薬 A (AptaTaq DNA Master)	4.0 μ L	4.0 μ L
試薬 B (PCR サプリメント)	7.0 μ L	7.0 μ L
試薬 C (プライマーミックス α)	4.0 μ L	—
試薬 D (プライマーミックス β)	—	4.0 μ L
合計	20.0 μ L	20.0 μ L

PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、下記の条件で PCR を行なって下さい。反応終了後は 4 °C で保存して下さい。

94 °C: 15 秒
63 °C: 15 秒
72 °C: 40 秒 } 30 回繰返し

③ アガロースゲル電気泳動

- 1) 1 × TAE 緩衝液を用いて、2 % アガロースゲルを製作して下さい。
- 2) PCR 反応後の PCR チューブに 4 μ L の試薬 F (6 × ローディングバッファー) を加え、良く混合して下さい。
- 3) 混合液をアガロースゲルのウェルに 6 μ L アプライして下さい。
- 4) 100 V で 30 分間程度(ミニゲル電気泳動装置の場合)電気泳動を行なって下さい。分子量マーカーは 100 bp DNA Ladder が好適です。

④ 検出

電気泳動後のゲルを 0.5 μ g/mL の臭化エチジウム溶液に約 30 分間浸し、DNA を染色して下さい。染色したゲルは UV トランスイルミネーターを用いて観察して下さい。

7. 判定

表 2 検出対象遺伝子とその増幅サイズ

	検出対象遺伝子	増幅サイズ(bp)
Reaction mixture 1	<i>bla</i> CIT	576
	<i>bla</i> FOX	364
	<i>bla</i> ACT	213
Reaction mixture 2	<i>bla</i> DHA	619
	<i>bla</i> ACC	403
	<i>bla</i> MOX	266

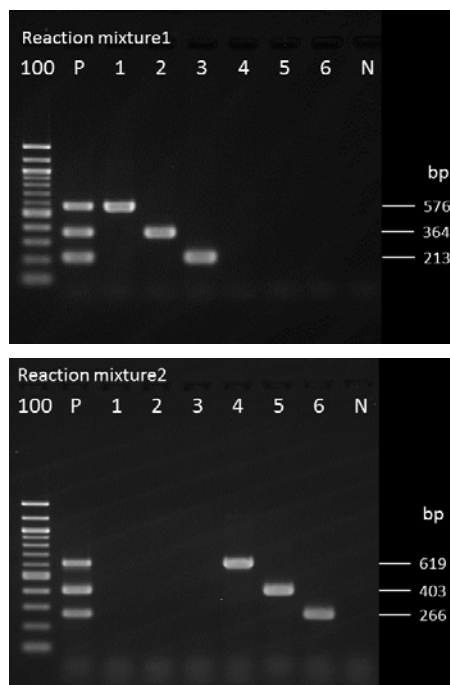


図 1 電気泳動像

下記の菌株を本キットで解析した電気泳動像

100: 100 bp DNA Ladder, P: ポジティブコントロール(試薬 E)、1: CIT 陽性菌株、2: FOX 陽性菌株、3: ACT 陽性菌株、4: DHA 陽性菌株、5: ACC 陽性菌株、6: MOX (人工遺伝子)、N: ネガティブコントロール (TE 緩衝液)



取扱説明書

シカジーニアス® AmpC遺伝子型検出キット
Cica Geneus® AmpC Genotype Detection KIT

8. 関連試薬(別売)

製品番号	製品名	容量	用途
08178-96	シカジーニアス® DNA 抽出試薬	120 回	テンプレート調製
本キットは上記シカジーニアス® DNA 抽出試薬の使用を推奨しております。			
72150	クロモアガー mSuper CARBA/C3GR 分画培地	10 枚	スクリーニング
08204-96	シカジーニアス® トータル DNA プレップキット(組織用)	100 回	DNA の精製
01098-23	アガロース KANTO LE	100 g	電気泳動用
46509-79	10×TAE 緩衝液	1 L	電気泳動用
14575-43	臭化エチジウム溶液(2 mg/mL)	10 mL	電気泳動用
49881-60	TriDye 100bp DNA Ladder	125 回	電気泳動用
96930-23	滅菌ディスポループ 1 µL	1000 本	釣菌

機器類は、ヒートブロック、マイクロチューブおよび PCR チューブ対応型遠心機、サーマルサイクラー、電気泳動装置、UVトランスイルミネーター、ゲル撮影装置などが必要です。また、この他 0.2 mL PCR チューブ(必ず使用されるサーマルサイクラーに合わせて、推奨されたものをお選び下さい)、1.5 mL マイクロチューブ、マイクロピペット、マイクロピペット用チップ、アガロースゲル染色用トレイなどが必要です。

9. 使用上の注意事項

- 1) 本キットで AmpC 遺伝子が検出されても、遺伝子の変異や発現等の影響で、抗菌薬に耐性を示さない場合があります。
- 2) 適用範囲の遺伝子ファミリーであっても、亜型によっては検出できない場合があります。
- 3) 染色体上に適応範囲の AmpC 遺伝子を保有する菌種では、染色体上の AmpC 遺伝子も検出されます。
- 4) テンプレート DNA の調製方法によっては遺伝子が検出され難くなる場合があります。テンプレート DNA の調製はプロトコールに従って行なって下さい。
- 5) クロモアガー mSuper CARBA/C3GR 分画培地を使用する場合、mSuper CARBA の培地では、通常、AmpC 過剰産生菌は分離されませんが、外膜タンパク質が変異や欠損した AmpC 過剰産生菌は分離される場合があります。また、C3GR の培地では AmpC 過剰産生菌の他に、ESBL 産生菌やカルバペネマーゼ産生菌も分離されます。
- 6) 菌株によっては、非特異的な増幅産物が検出される場合があります。ポジティブコントロールで検出されるバンドサイズを判定基準として下さい(図 1)。
- 7) 菌株の保管状況によっては、プラスミド上に存在する AmpC 遺伝子が脱落する場合があります。
- 8) 菌株によっては、複数の耐性遺伝子を保有する場合があります。
- 9) 各試薬は、凍結融解を繰り返すと性能が低下する可能性があります。一度に使用しきれない場合は、小分けして -20 °C ~ -25 °C で保存して下さい。
- 10) 本キットを使用する際は、同じロット番号の試薬を組み合わせして下さい。異なるロット番号の試薬を組み合わせた場合の性能は保証しておりません。
- 11) PCR 反応液の室温放置は結果に影響を及ぼす可能性があります。反応液の調製は、氷上または PCR クーラーの使用を推奨します。
- 12) 使用されるサーマルサイクラーによっては、温度制御誤差や昇温スピード等の違いにより、PCR 条件の最適化が必要な場合があります。PCR で 95 °C 以上の加温を行なうと、遺伝子増幅酵素の活性が著しく落ちる場合があります。

10. その他

- 1) 本キットは研究用として販売しております。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。
- 2) 他メーカーの製品に関するライセンス・パテントについては、各メーカーにご確認下さい。
- 3) 製品の仕様は、製品の改良のため変更する場合がございます。あらかじめご了承下さい。

