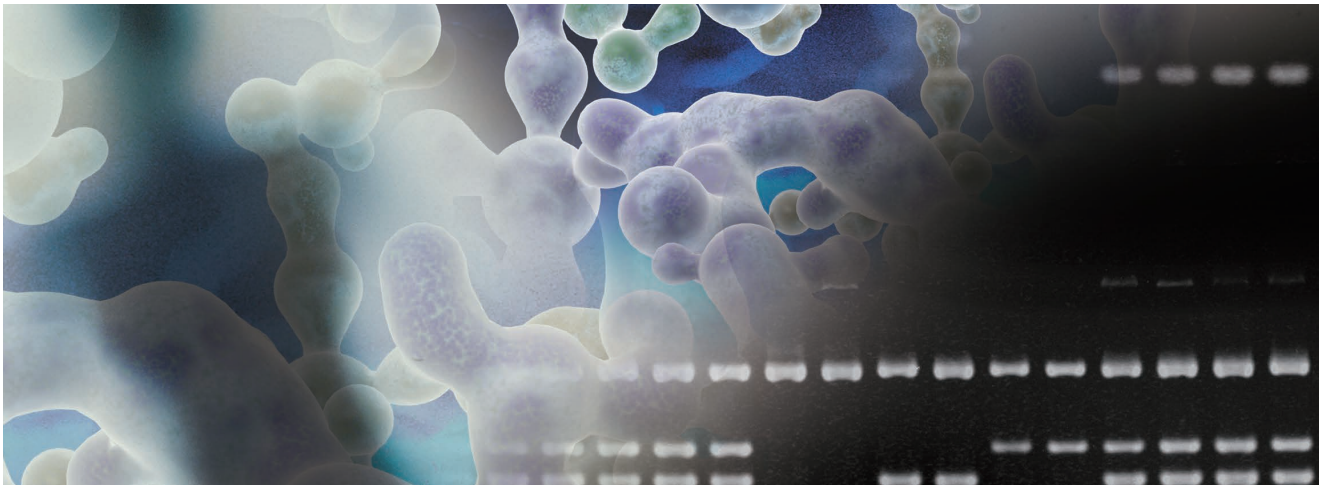
試験研究用試薬

シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（緑膿菌用）

Cica Geneus® Pseudo POT KIT



緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は、自然環境中に存在する代表的な常在菌の一種です。
医療関連感染においては、主要な抗生物質に対して広く耐性を獲得した多剤耐性緑膿菌（Multiple-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*：MDRP）が問題となっています。
藤田医科大学の鈴木匡弘先生と金沢医科大学の飯沼由嗣先生らにより開発されたPCR-based ORF Typing（POT法）は、マルチプレックスPCRを用いて緑膿菌中の複数の特定遺伝子領域を増幅し、アガロース電気泳動で増幅されたバンドパターンを解析し、菌体間の相同性を比較する方法です。

参考文献　厚生労働省科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 新型薬剤耐性菌に関する研究 平成23年度 総括・分担研究報告書 研究代表者 荒川宜親

特長

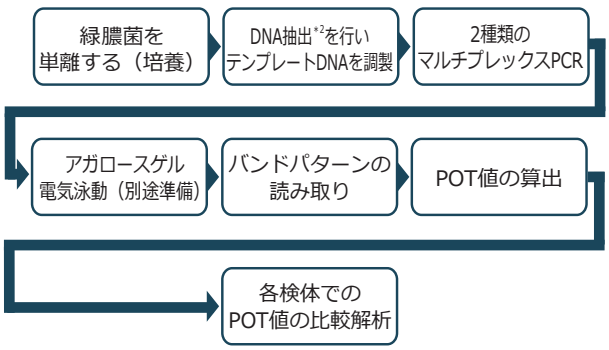
- 最適化したマルチプレックスPCRなので、約4時間以内で分子疫学解析が可能です。
- パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE)のように特殊な装置は不要です。
- 解析結果を数値化（POT値）することで、菌体間の相同性を比較できます。
- PFGEやMultilocus Sequence typing（MLST）と同等の識別能を有しております。

キットの構成（50回分）

個別名称	容量
試薬A　AptaTaq DNA Master（5×Conc.）*1	500μL ×1本
試薬B　PCRサプリメント	500μL ×1本
試薬C　プライマーミックスα	250μL ×1本
試薬D　プライマーミックスβ	250μL ×1本
試薬E　ポジティブコントロール	250μL ×1本
試薬F　6× ローディングバッファー	500μL ×1本

*1 AptaTaq DNA Master（5×Conc.）は、Roche Diagnostics K.Kの商品です。

操作手順



*2 シカジーニアス® DNA抽出試薬は別売です。

関東化学株式会社

解析例

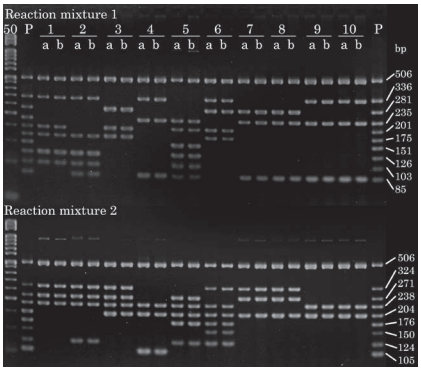


図1 電気泳動パターンの実例（各n=2）

50: 50 bpラダー、P: positive control、1: ATCC 27853、2: ATCC 35554、3: PAO1、4: IMP陽性臨床分離株、5: VIM陽性臨床分離株、6: 臨床分離株、7,8: 集団感染事例1から得られた臨床分離株、9,10: 集団感染事例2から得られた臨床分離株

泳動条件は4%アガロースKANTO HC（0.5×TBE緩衝液）で、電気泳動装置を用いて、120Vで50分間としました。25穴のコームを使い、サンプルを3μlアプライし泳動しました。

表1 検出ORFの種類（ターゲット領域）とPCR増幅産物サイズ

	POT No.	増幅サイズ (bp)	POT 係数	ターゲット領域
Reaction mixture 1	PCR PC	506		*P. aeruginosa* positive control
	POT 1-1	336	512	Genomic Islet-1
	POT 1-2	281	256	Genomic Islet-2
	POT 1-3	235	128	Genomic Islet-3
	POT 1-4	201	64	Genomic Islet-4
	POT 1-5	175	32	Genomic Islet-5
	POT 2-1	151	64	VIM
	POT 2-2	126	32	プロファージ -1
	POT 2-3	103	16	プロファージ -2
	POT 2-4	85	8	プロファージ -3
Reaction mixture 2	PCR PC	506		*P. aeruginosa* positive control
	POT 1-6	324	16	Genomic Islet-6
	POT 1-7	271	8	Genomic Islet-7
	POT 1-8	238	4	Genomic Islet-8
	POT 1-9	204	2	Genomic Islet-9
	POT 1-10	176	1	Genomic Islet-10
	POT 2-5	150	4	プロファージ -4
	POT 2-6	124	2	プロファージ -5
	POT 2-7	105	1	IMP

①2 つのマルチプレックス PCR の電気泳動結果（図 1 ）からバンドパターン（表 1 ）を読み取ります。
②この電気泳動のバンドの有無の結果を用いて、POT 値解析用の計算シートに二進法で入力し、 3 つのカテゴリーの POT 値を算出します。
ⅰ PCR PC が陽性の場合、その検体は緑膿菌であることが確認できます。POT1 の値は Sequence Type（ST 型）と関係します。
また、MDRP が疑われる場合、POT 2 の値は 64 以上または奇数になります。
ⅱ 検体間の POT 値を比較することで、菌体間の相同性を客観的に推測出来ます。
ⅲ 集団感染から得られた菌体は POT 1 ～ 2 の POT 値が全て同一になります。（例：図 1 の 7 と 8、9 と 10）

解析結果

カテゴリー	図1におけるサンプル番号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
POT1	636	572	382	646	207	887	410	410	646	646
POT2	48	58	0	9	122	6	8	8	8	8

● POT値解析用の計算シートは弊社製品ホームページに掲載しております。

製品情報

製品名	包 装	保 存	製品番号
シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（緑膿菌用）	50回分	冷凍（-25～-20 ℃）	08187-96
シカジーニアス® DNA抽出試薬	120回分	冷蔵（2 ℃～8 ℃）	08178-96

その他POTキットシリーズ

製品名	包 装	製品番号
シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（黄色ブドウ球菌用）	120回分	08180-96
	30回分	08180-97
シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（アシネトバクター属菌用）	30回分	08062-96
シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（大腸菌用）	30回分	08362-97

製品名	包 装	製品番号
シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（C. ディフィシル用）	30回分	08106-97
シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（E. クロアカ complex用）	30回分	08376-97

●上記の他に必要な機材などがございますので、弊社営業所もしくは販売店へお問合せください。
●藤田医科大学　鈴木匡弘先生のご厚意により、電気泳動パターンの実例データをご提供いただきました。
●性能評価は、京都大学大学院の長尾美紀先生と国立国際医療研究センターの切替照雄先生にご協力頂きました。
●本キットは愛知県と金沢医科大学から特許許諾を得て、製造販売しております。他メーカーの商品に関するライセンスについては、各メーカーにご確認ください。

製品の価格につきましては、弊社ホームページ「Cica-Web」をご確認ください。
右記の二次元バーコードからもご覧いただけます。→

● 本記載の製品は、試薬 (試験、研究用として用いる化学薬品) としての用途にご利用ください。
● 本記載の製品情報は予告なく変更する場合があります。 最新情報は、弊社ホームページ「Cica-Web」をご確認ください。

関東化学株式会社
試薬事業本部

〒103-0022　東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

TEL：03-6214-1090
HP：https://www.kanto.co.jp