

取扱説明書

シカジーニース® 牛マイコプラズマハイスクリーニングプラスキット
Cica Geneus® Bovine Mycoplasma HI Screening Plus Kit

1. はじめに

マイコプラズマ属 (*Mycoplasma* spp.)は真正細菌の一種であり、畜産動物や酪農環境などから分離されることがあります。本キットは1回のPCRで、畜産動物や酪農環境などから分離される代表的な7菌種のマイコプラズマ属を *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, *M. californicum*, *M. bovirhinis* と *M. canadense*, *M. alkalescens*, *M. arginini* に分けて検出することができます。本キットは、酪農学園大学 樋口豪紀博士と岩野英知博士の技術指導を受けて開発した、検体によるPCR阻害を抑制するPCRサブプリメントプラスを採用したことで、従来製品より検出感度が向上しています。

2. 製品形態

製品名	シカジーニース® 牛マイコプラズマハイスクリーニングプラスキット (Cica Geneus® Bovine Mycoplasma HI Screening Plus Kit)
製品番号	08079-96
容量	100回分
保管温度	冷凍 (-20℃~-25℃)

3. キット構成 (100回)

個別名称	容量
試薬 A (ラベル白) AptaTaq DNA Master (5× Conc.) ^{*1}	400 μL × 1本
試薬 B (ラベル赤) PCR サプリメントプラス	1,000 μL × 1本
試薬 C (ラベル紫) マイコエース (プライマー溶液)	200 μL × 1本
試薬 D (ラベル緑) ポジティブコントロール 1 (High)	100 μL × 1本
試薬 E (ラベル黄) ポジティブコントロール 2 (Low)	100 μL × 1本
試薬 F (ラベル青) 6×ローディングバッファー	500 μL × 1本

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

4. 原理

畜産動物や酪農環境などから分離される主なマイコプラズマ属を検出するプライマーを用いてPCRを行ない、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マイコプラズマ属を判別する。

5. 適用範囲

牛から分離される主なマイコプラズマ属 (*M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovis genitalium*, *M. bovirhinis*, *M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense*)

6. 標準プロトコール

1) 増菌培養

検体(乳汁の場合は100 μL)をマイコプラズマ用液体培地3 mLに接種し、37℃で2~7日間培養して下さい。

2) DNA抽出

上記培養液から別売のシカジーニース® DNA抽出試薬(製品番号: 08178-96)を用いてDNA抽出を行なって下さい。この他にスピニングカラムやフェノール/クロロホルム抽出などで調製した精製DNAもテンプレートDNA溶液として使用できます。

シカジーニース® DNA抽出試薬の使用方法

- 別途調製したシカジーニース® DNA抽出試薬混合液100 μLをマイクロチューブに入れて下さい。
- 培養液10 μLを1のマイクロチューブに加え軽く混合して下さい。
- 72℃で6分間、94℃で3分間インキュベートして下さい。
- この上清をテンプレートDNA溶液として下さい。また、浮遊物が確認される場合は遠心上清(15,000 rpm または 12,000 × g 以上、1分間)を使用して下さい。

3) PCR

各試薬を室温で融解して下さい。融解後、直ちに転倒混和やタッピングで穏やかに混和してスピンドアウン後、氷冷して下さい。下の表に従って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DおよびE)はテンプレートDNA溶液と置き換えて使用して下さい。

PCR 反応液組成	容量
テンプレート DNA 溶液	5.0 μL
試薬 A (AptaTaq DNA Master)	4.0 μL
試薬 B (PCR サプリメントプラス)	9.0 μL
試薬 C (マイコエース)	2.0 μL
合計	20.0 μL

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

94℃: 30秒	} 40回繰返し
61℃: 30秒	
72℃: 30秒	

4) アガロースゲル電気泳動

- TBE緩衝液を用いて、2%~3%アガロースゲルを作製して下さい。
- PCR後のチューブに4 μL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。
- この混合液をアガロースゲルのウェルに6 μLアプライして下さい。
- 電気泳動条件は、100 V、35分間程度(ミニゲル電気泳動装置の場合)を目安にして下さい。分子量マーカーは100 bp DNA Ladderが好適です。

5) アガロースゲルの染色

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

6) データ解析

増幅されたDNAのバンドの有無とそのサイズからマイコプラズマ属であるかを判別して下さい(裏面参照)。

7. 使用上の注意事項

- テンプレートDNA溶液に精製DNAを使用する場合は1 ng/μL~10 ng/μL程度に調製して下さい。
- 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。1度に使用しない場合は、小分けして保存して下さい。
- 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。
- 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ございます。

8. その他の注意事項

- 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。
- 他メーカーの商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。

9. 関連製品

製品番号	製品名	容量	用途
08178-96	シカジーニース® DNA抽出試薬	120回	テンプレート調製
08093-96	シカジーニース® マイコプラズマボビス検出プラスキット	30回	遺伝子検査
08094-96	シカジーニース® マイコプラズマカリフォルニカム検出プラスキット	30回	遺伝子検査
08095-96	シカジーニース® マイコプラズマボビゲニタリウム検出プラスキット	30回	遺伝子検査
01016-96	AptaTaq DNA Master	500 μL	分子生物学用
01089-23	アガロース KANTO HC	100 g	電気泳動用
01095-23	アガロース KANTO S	100 g	電気泳動用
46510-79	10×TBE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
49881-00	100 bp DNA Ladder	100回	電気泳動用
24080-96	6倍濃縮ローディングバッファー	2 mL × 6本	電気泳動用
(000718) ^{*2}	マイコプラズマ(NK)液体培地	50本	増菌培養用
(000717) ^{*2}	マイコプラズマ(NK)寒天培地	20枚	選択分離用

^{*2} この製品群に関してはミヤリサン製薬株式会社にお問合わせ下さい。

[製品に関するお問合せ: Tel 03-3917-1191]

[ご注文に関するお問合せ(株式会社共済薬事): Tel 03-3265-2767]

機器類は、ヒートブロック、1.5 mL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、電気泳動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、1.5 mL マイクロチューブ、20 μL および 200 μL 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。



10. 実施例

畜産動物や酪農環境などから分離される主な菌種の増幅サイズは以下の通りです。

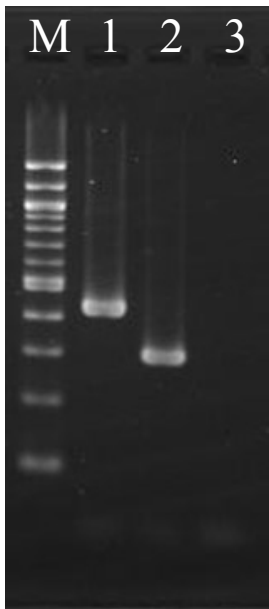
菌種	増幅サイズ
ポジティブコントロール 1 (High)	
<i>Mycoplasma bovis</i>	
<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	約 400 bp
<i>Mycoplasma californicum</i>	
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	
ポジティブコントロール 2 (Low)	
<i>Mycoplasma canadense</i>	
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	約 300 bp
<i>Mycoplasma arginini</i>	
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	
<i>Mycoplasma dispar</i>	検出されないか
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	上記以外の非特異的な DNA 断片
<i>Staphylococcus aureus</i>	

M. bovis 等のサンプルは、約 400 bp の位置に単一の DNA 断片が検出されます。

一方、*M. canadense* 等のサンプルは、約 300 bp の位置に単一の DNA 断片が検出されます。

M. bovis と *M. canadense* の混合サンプルは、これら 2 種の特異的な DNA 断片の他に 1 つの非特異的な DNA 断片が検出されます。

検体中に複数の菌種が存在する場合は、非特異的な DNA 断片が認められる場合があります。



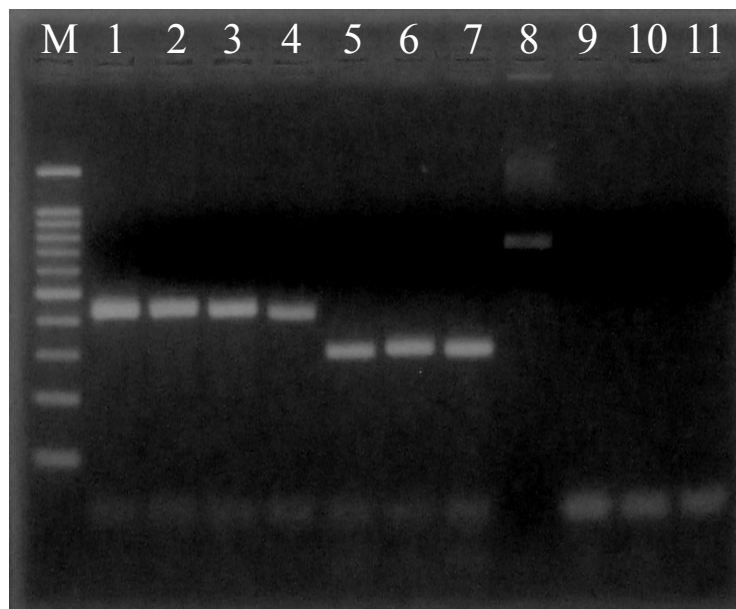
PCR の実施例 1 (コントロール)

M: マーカー (100 bp DNA Ladder)

1: ポジティブコントロール 1 (High)・・・(試薬 D)

2: ポジティブコントロール 2 (Low)・・・(試薬 E)

3: ネガティブコントロール (TE 緩衝液)



PCR の実施例 2 (様々な菌種の検出例) ※3

M: マーカー (100 bp DNA Ladder), 1: *M. bovis*, 2: *M. bovigenitalium*, 3: *M. californicum*,

4: *M. bovirhinis*, 5: *M. canadense*, 6: *M. alkalescens*, 7: *M. arginini*, 8: *M. dispar*,

9: *Acholeplasma laidlawii*, 10: *Staphylococcus aureus*, 11: ネガティブコントロール (滅菌水)

※3 本データは日本動物特殊診断株式会社にご提供いただきました。

参考文献:

- 樋口豪紀, 岩野英知, 安富一郎, 伊藤暢彦, 河合一洋, 菊池直哉, 小岩政照, 永幡肇, マイコプラズマ性乳房炎診断におけるアコレプラズマ (*Acholeplasma laidlawii*) の判別とその重要性, 北海道獣医師会雑誌, 54, pp1-3 (2010).
- Higuchi H, Iwano H, Kawai K, Ohta T, Obayashi T, Hirose K, Ito N, Yokota H, Tamura Y, Nagahata H (2011) A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. J. Vet. Sci. 12(2), 191-193
- Higuchi H, Gondaira S, Iwano H, Hirose K, Nakajima K, Kawai K, Hagiwara K, Tamura Y, Nagahata H (2013) Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. Vet. Rec. May 25;172(21):557.