

取扱説明書

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
Cica Geneus® Mycoplasma bovis Detection 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、約 120 種類が報告されております。本製品はシカジーニース® 牛マイコプラズマ ハイスクリーニングプラスキットの陽性検体を用いて、マイコプラズマ ボビスの特異的なプライマーを用いて PCR を行なうことで、マイコプラズマ ボビスの特異的な遺伝子領域を簡便に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® マイコプラズマ ボビス検出プラスキット (Cica Geneus® Mycoplasma bovis Detection Plus Kit)
製品番号	08093-96
容量	30 回分
保管温度	冷凍 (-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) Aptaq DNA Master (5 × Conc.) ^{*1}	150 μL × 1 本
試薬 B (ラベル赤) PCR サプリメントプラス	400 μL × 1 本
試薬 C (ラベル紫) プライマー溶液 (<i>M. bovis</i> 用)	200 μL × 1 本
試薬 D (ラベル緑) ポジティブコントロール (<i>M. bovis</i>)	50 μL × 1 本
試薬 E (ラベル黄) ネガティブコントロール (<i>M. bovirhinis</i>)	50 μL × 1 本
試薬 F (ラベル青) 6 × ローディングバッファー	200 μL × 1 本

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

4. 原理

マイコプラズマ ボビスの特異的なプライマーを用いて PCR (遺伝子増幅) を行ない、増幅産物サイズを電気泳動で確認することで、マイコプラズマ ボビスの特異的な遺伝子領域を検出できます。

5. 適用範囲

マイコプラズマ ボビスの特異的な遺伝子領域の検出

6. 標準プロトコール

1) 増菌培養

検体 (乳の場合は 100 μL) をマイコプラズマ用液体培地 3 mL に接種し、37 °C 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 °C で 6 分間、94 °C 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 (15,000 rpm または 12,000 × g 以上、1 分間) を使用して下さい。

※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で使用したテンプレート DNA も使用可能です。

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。PCR 反応液組成表に従って 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) およびネガティブコントロール (試薬 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 (Aptaq DNA Master)	4.0 μL
試薬 B (PCR サプリメントプラス)	6.0 μL
試薬 C (プライマー溶液)	5.0 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 °C で保存して下さい。

94 °C: 30 秒	} 40 回繰返し
62 °C: 20 秒	
72 °C: 60 秒	
72 °C: 5 分	

4) アガロースゲル電気泳動

- TBE 緩衝液を用いて、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。染色後のゲルを蒸留水で軽く洗浄し、UV 下でゲルを観察して下さい。

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 ボビス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. 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
08079-96	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	100 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 ポビゲネタリウム検出プラスキット	30 回	遺伝子検査
01016-96	Aptaq 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い合わせ下さい。

【製品に関するお問合せ: Tel 03-3917-1191】

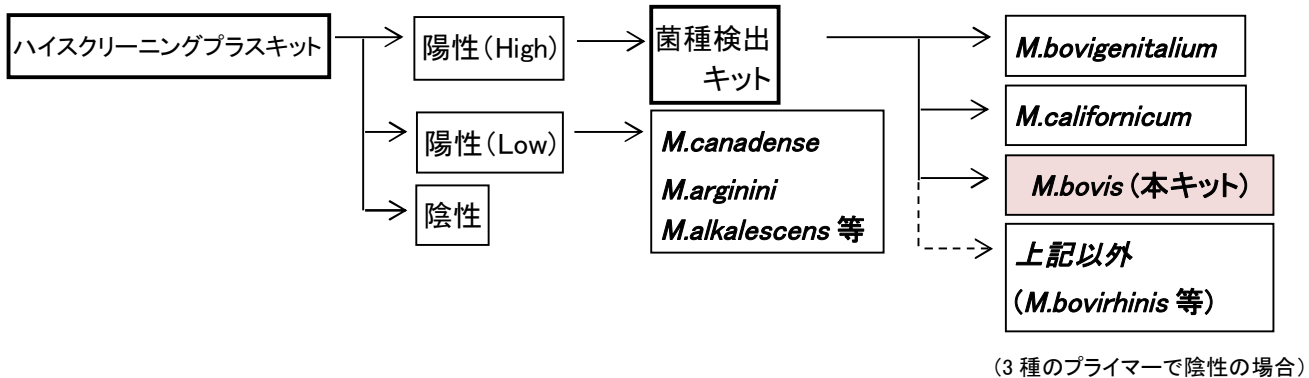
【ご注文に関するお問合せ (株式会社共済薬事): Tel 03-3265-2767】

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 (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ください)、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。

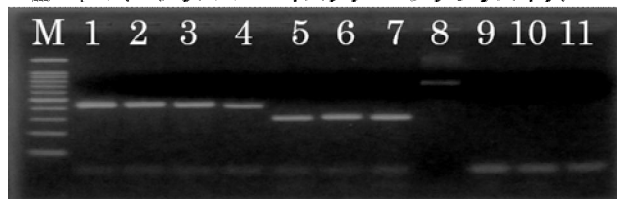


9. 実施例

本試験フローは以下の通りになります。



■ 牛マイコプラズマ ハイスクリーニングプラスキット



PCRの実施例1 (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: No template control (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。

■ マイコプラズマ ボビス検出プラスキット



PCRの実施例2 (コントロール)

M: 100 bp DNA Ladder
P: Positive control (試薬D)
N: Negative control (試薬E)
NT: No template control (TE buffer)

図 マイコプラズマ ボビスの検出例

M. bovis 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。

ネガティブコントロール(試薬 E)は、検出装置やサーマルサイクラーの違いによって、目的のバンド以外の位置に非特異的な DNA 断片がわずかに認められる場合があります。

検体中に複数の菌種や夾雑物が存在する場合、目的のバンド以外に非特異的な DNA 断片が認められる場合があります。

10. その他の注意事項

- 1) 本製品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) 本製品は酪農学園大学 樋口豪紀博士と岩野英知博士から技術指導を受けております。また、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。

参考文献:

- 1) 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).
- 2) Higuchi H, Iwano H, Kawai K, Ohta T, Obayashi T, Hirose K, Ito N, Yokota H, Tamura Y, Nagahata H., A simplified PCR assay for fast and easy screening of *Mycoplasma mastitis* of dairy cattle., *J. Vet. Sci.*, **12**, pp191-193. (2011).
- 3) Higuchi, H., Iwano, H., Kawai, K., Gondaira, T., Nagahata, H., Prevalence of *Mycoplasma* species in bulk tank milk in Japan., *Vet. Rec.*, **169**, pp442 (2011).