

取扱説明書

シカジーニクス® 毒素遺伝子検出キット (C. difficile用)
Cica Genus® Toxin Gene Detection KIT (for C. difficile)

1. はじめに

Clostridium difficile (*Clostridioides difficile*) は、抗菌薬関連下痢症・腸炎の主要な原因菌であり、医療関連感染の点から重要です。本菌が産生する toxin A および toxin B は、その病原性に大きな役割を果たしています。加えて、PCR-ribotype 027 (BI/NAP1/027) 株や PCR-ribotype 078 株などの binary toxin 産生株は欧米では高病原性株として知られ、binary toxin の臨床的意義が注目されています。本キットは、*C. difficile* 分離菌株から抽出した DNA を鋳型として、毒素遺伝子を検出するための PCR に必要な試薬類や陽性コントロール等をキット化したものです。本キットは、(1) toxin B 産生株 (toxigenic culture) の推定同定 (PCR-1)、(2) toxin A 陽性 toxin B 陽性株か toxin A 陰性 toxin B 陽性株かの推定同定 (PCR-2)、(3) binary toxin 産生株の推定同定 (PCR-3) に用います (図 1)。

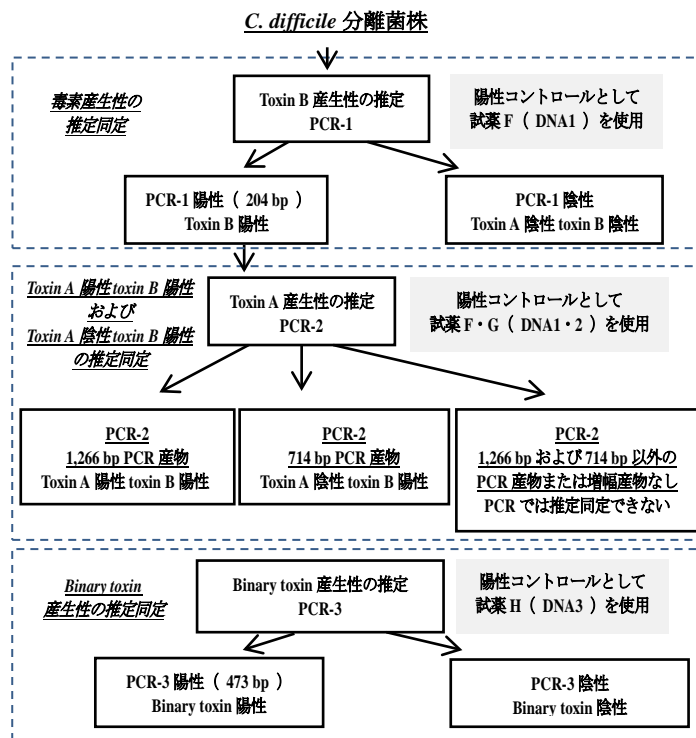


図 1 PCR のフローチャート

2. 製品形態

製品名	シカジーニクス® 毒素遺伝子検出キット (C. difficile 用) Cica Genus® Toxin Gene Detection KIT (for C. difficile)
製品番号	08115-96
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) AptaTaq DNA Master (5 × Conc.) ^{*1}	500 μL × 1 本
試薬 B (ラベル緑) PCR サプリメント	1,300 μL × 1 本
試薬 C (ラベル赤) プライマーミックス 1 (toxin B 遺伝子検出用)	200 μL × 1 本
試薬 D (ラベル青) プライマーミックス 2 (toxin A 遺伝子検出用)	300 μL × 1 本
試薬 E (ラベル黄) プライマーミックス 3 (binary toxin 遺伝子検出用)	200 μL × 1 本
試薬 F (ラベル赤) 陽性コントロール DNA1 ^{*2}	50 μL × 1 本
試薬 G (ラベル青) 陽性コントロール DNA2 ^{*3}	30 μL × 1 本
試薬 H (ラベル黄) 陽性コントロール DNA3 ^{*4}	30 μL × 1 本
試薬 I (ラベル紫) 陰性コントロール (TE 緩衝液)	100 μL × 1 本
試薬 J (ラベル白) 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。

^{*2}Toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性の *C. difficile* より抽出した DNA

^{*3}Toxin A 陰性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性の *C. difficile* より抽出した DNA

^{*4}Toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陽性の *C. difficile* より抽出した DNA

4. 原理

C. difficile の毒素遺伝子領域をシングル PCR で増幅し、電気泳動に供して増幅産物のサイズを確認します。

5. 適用範囲

C. difficile が保有する toxin A 遺伝子、toxin B 遺伝子、binary toxin 遺伝子の検出

6. プロトコール

① DNA 抽出

C. difficile 菌株を嫌気性菌用平板培地で 1~3 日間嫌気培養し、得られたコロニーから DNA を抽出して下さい。DNA の抽出方法としては、TES 緩衝液 (50 mM Tris hydrochloride [pH 8.0], 5 mM EDTA, 50 mM NaCl) を使用した加熱処理 (95 °C, 10 分間) や、フェノール/クロロホルム法、スピニング法を用いた方法などが使用できます。また、別売のシカジーニクス® DNA 抽出試薬 ST (製品番号: 08210-96) を用いて抽出した DNA もプレート DNA として利用できます。ただし、滅菌水を使用した熱水抽出法は増幅産物が得られない場合があります (9. 使用上の注意事項 1~3)。

② PCR

本キットは、目的 (図 1) に応じて、プライマーミックス (試薬 C~E、表 1) と陽性コントロール DNA (試薬 F~H、表 2) を用いて PCR を実施します (PCR-1~PCR-3)。

表 1 プライマーミックス

PCR-1	試薬 C プライマーミックス 1 (toxin B 遺伝子検出用)
PCR-2	試薬 D プライマーミックス 2 (toxin A 遺伝子検出用)
PCR-3	試薬 E プライマーミックス 3 (binary toxin 遺伝子検出用)

表 2 陽性コントロール DNA

PCR-1	試薬 F 陽性コントロール DNA1
PCR-2 ^{**5}	試薬 F 陽性コントロール DNA1
	試薬 G 陽性コントロール DNA2
PCR-3	試薬 H 陽性コントロール DNA3

^{**5}PCR-2 では、陽性コントロール DNA が 2 種類必要です。

各試薬は、室温で融解後氷冷して下さい。試薬の使用時には、転倒もしくはタッピングで穏やかに混和した後スピンドアウンして下さい。表 3 に従って PCR 反応液を調製し、PCR チューブに入れて下さい。なお、PCR 反応液の室温放置は避けて下さい。

表 3 PCR 反応液の調製

試薬	容量 (μL)
テンプレート DNA 溶液 (DNA 濃度: 1 ng/μL ~ 10 ng/μL)	
試薬 F~H 陽性コントロール	1.0
試薬 I 陰性コントロール	
試薬 A AptaTaq DNA Master	4.0
試薬 B PCR サプリメント	11.0
試薬 C~E プライマーミックス 1~3 (表 1)	4.0
合計	20.0

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。

• PCR-1 および PCR-3 の条件

94 °C: 20 秒
55 °C: 120 秒 } 35 回繰返し

• PCR-2 の条件

94 °C: 20 秒
64 °C: 120 秒 } 35 回繰返し

• 電気泳動例 (ミニゲル電気泳動装置使用)

- 1 × TAE 緩衝液を用いて、2 % アガロースゲルを作製します。
- PCR 反応後の PCR チューブに 4 μL の試薬 J (6 × ローディングバッファー) を加え、良く混合します。
- 混合液をアガロースゲルのウェルに 6 μL アプライします。
- 100 V、30 分間程度電気泳動を行いません。分子量マーカーは、100 bp DNA Ladder が好適です。
- 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、DNA を染色します。
- 染色後のゲルを、UV トランスイルミネーターを用いて観察します。



取扱説明書

シカジーニクス® 毒素遺伝子検出キット (C. difficile用)
Cica Geneus® Toxin Gene Detection KIT (for C. difficile)

7. 判定

陽性コントロール DNA で得られた増幅産物のサイズを基準として判定します(図 2、表 4)。

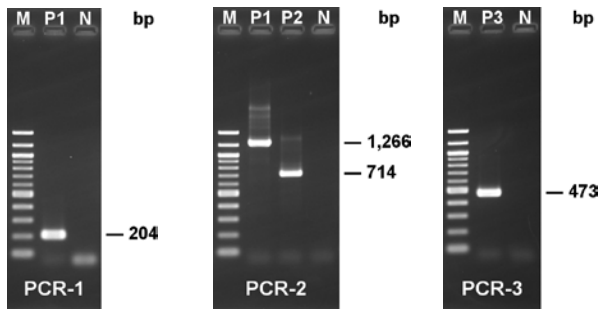


図 2 電気泳動例

M: 100 bp ラダー、P1: 陽性コントロール DNA1 (試薬 F)、P2: 陽性コントロール DNA2 (試薬 G)、P3: 陽性コントロール DNA3 (試薬 H)、N: 陰性コントロール (試薬 I)
泳動条件は、2% アガロース KANTO LE (1×TAE 緩衝液) で、Mupid-2plus を用いて 100 V で 30 分間としました。Mupid シリーズのトレイ、17 穴のコームを使い、サンプルを 6 μL アプライし、泳動しました。

表 4 検出対象遺伝子とその増幅サイズ

PCR	増幅産物のサイズ (bp)	判定結果
PCR-1	204 bp の増幅産物 (陽性コントロール DNA1 と同じサイズ)	Toxin B 陽性
	増幅産物なし	Toxin A 陰性 toxin B 陰性
PCR-2	1,266 bp の増幅産物 (陽性コントロール DNA1 と同じサイズ)	Toxin A 陽性 toxin B 陽性
	714 bp の増幅産物 (陽性コントロール DNA2 と同じサイズ)	Toxin A 陰性 toxin B 陽性
	上記以外または増幅産物なし	Toxin A 推定不能**
PCR-3	473 bp の増幅産物 (陽性コントロール DNA3 と同じサイズ)	Binary toxin 陽性
	増幅産物なし	Binary toxin 陰性

**PCR-1 で toxin B 陰性と判定された場合は、toxin A 陰性と推定されます。

①PCR-1

- 陽性コントロール DNA1 (試薬 F) と同じ 204 bp の増幅産物が得られた場合、*C. difficile* 分離菌株は毒素産生性 *C. difficile* 培養 (toxigenic culture) 陽性と推定されます。
- 204 bp の増幅産物が認められない場合、toxin A 遺伝子と toxin B 遺伝子が位置する pathogenicity locus を持たないと推定され、分離菌株は toxin A 陰性 toxin B 陰性株であると推定されます (10. 参考文献 1)。

②PCR-2

- 陽性コントロール DNA1 (試薬 F) と同じ 1,266 bp の増幅産物が得られた場合、*C. difficile* 分離菌株は toxin A 陽性 toxin B 陽性株と推定されます。
- Toxin A 陰性 toxin B 陽性株の多くは、PCR-2 で陽性コントロール DNA2 (試薬 G) と同じ 714 bp の増幅産物が得られます。したがって、714 bp の産物が得られた場合、*C. difficile* 分離菌株は toxin A 陰性 toxin B 陽性株であると推定されます (10. 参考文献 2)。
- 1,266 bp および 714 bp 以外のサイズの増幅産物が認められた場合、または増幅産物が確認できない場合、toxin A の産生性は推定できません。ただし、PCR-1 で toxin B 陰性の場合には、toxin A 陰性と推定されます。

③PCR-3

PCR-ribotype 027 株や PCR-ribotype 078 株などの binary toxin 産生株は、高病原性株として欧米で問題視され、binary toxin の臨床的意義が注目されています (10. 参考文献 3)。一方で、binary toxin 陰性 *C. difficile* による重症例や、アウトブレイク事例も多く報告されています。

- 陽性コントロール DNA3 (試薬 H) と同じ 473 bp の増幅産物が得られた場合、*C. difficile* 分離菌株は binary toxin 陽性と推定されます。
- 473 bp の増幅産物が認められない場合、分離菌株は binary toxin 陰性と推定されます。

8. 関連試薬 (別売)

製品番号	製品名	容量	用途
08210-96	シカジーニクス® DNA 抽出試薬 ST	120 回	テンプレート調製
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
49899-45	Quick-Load Purple 100 bp DNA Ladder	125 回	電気泳動用
717598-1	C. Diff 選択分離培地	10 枚	分離培地

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、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 (必ず使用されるサーマルサイクラーにに合わせて、推奨されたものをお選び下さい)、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. 使用上の注意事項

- DNA の抽出には滅菌水を使用した熱水抽出法は適用できない場合があります。
- TES 緩衝液やシカジーニクス® DNA 抽出試薬 ST の試薬 a・b 混合液にコロニーを懸濁して DNA を抽出する場合、マクファーランド比濁法を用いて濁度標準液 第 1~4 番程度を目安に懸濁して下さい。
- テンプレートに精製 DNA を使用する場合、1 ng/μL ~ 10 ng/μL 程度に調製して下さい。
- PCR-1 については、*Clostridium sordellii* の lethal toxin (LT) 遺伝子が toxin B 遺伝子とほぼ同じサイズの増幅産物として検出され、区別できない可能性があります。
- PCR-3 については、*Clostridium perfringens* E 型の iota toxin 遺伝子が binary toxin 遺伝子とほぼ同じサイズの増幅産物として検出され、区別できない可能性があります。
- PCR 反応液は最大 50 μL 程度までスケールアップすることができます。
- 各試薬は、凍結融解を繰り返すと活性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。
- 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ございます。

10. 参考文献

- Kato, H. et al. *J. Clin. Microbiol.* **36** (8): 2178 - 2182, 1998.
- Kato, H. et al. *FEMS Microbiol. Lett.* **175** (2): 197 - 203, 1999.
- Gerding, D. N. et al. *Gut Microbes* **5** (1): 15 - 27, 2014.

11. その他

- 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。
- 本キットは、国立感染症研究所との共同研究の成果から開発されました。また、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。
- 製品の仕様は、製品の改良等のため変更する場合がございます。あらかじめご了承ください。