

取扱説明書

シカジーニース® コアグララーゼ検出セット(黄色ブドウ球菌用)
Cica Geneus® Staph Coagulase Detection Set

1. はじめに

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)が産生する血液凝固酵素のコアグララーゼ(COA)はその酵素活性を阻害する特異的な抗血清の種類によって I ~ X 型に分類されることが知られており、重要な疫学マーカーとして利用されております。本製品では培地から単離した黄色ブドウ球菌を検体として、2本の反応チューブを用いてマルチプレックス PCR 法を行ない、増幅された PCR 産物を電気泳動により確認することで、簡便に I ~ VIII 型のコアグララーゼ型を判別することができます。

2. 製品形態

製品名	シカジーニース® コアグララーゼ検出セット (Cica Geneus® Staph Coagulase Detection Set)
製品番号	08179-96
容量	50 回分
保管温度	冷凍(-20 °C~-25 °C)

3. 構成試薬 (50 回)

個別名称	容量
試薬 A プライマーミックス A (III, IV, VII, VIII 型, <i>femA</i>)	100 µL × 1 本
試薬 B プライマーミックス B (I, II, V, VI 型, <i>femA</i>)	100 µL × 1 本
試薬 C 6 × ローディングバッファー	1,000 µL × 1 本
EagleTaq Master Mix ^{※1}	1,000 µL × 1 本

※1 EagleTaq Master Mix は、Roche Diagnostics K. K. の商品です。

4. 原理

黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ I ~ VIII 型の遺伝子領域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 で遺伝子増幅を行ない、その増幅産物サイズを電気泳動で確認することで、黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型を判別します。

5. 適用範囲

黄色ブドウ球菌における I ~ VIII 型のコアグララーゼ型判別

6. 標準プロトコール

1) DNA 抽出

単離した黄色ブドウ球菌をトリプトン ソーヤブイオン等で一晚増菌培養し、フェノール/クロロホルムやスピカラムなどを利用して DNA 抽出を行なって下さい。

もしくは、簡便な DNA 抽出方法として、別売のシカジーニース DNA 抽出試薬を用いて DNA 抽出を行なうことができます。この場合は、下記の手順で行って下さい。

シカジーニース DNA 抽出試薬の使用方法

- 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。
- コロニーを釣菌し、1. のマイクロチューブに懸濁させて下さい。または、液体培養の場合は培養液の原液 10 µL をマイクロチューブに入れて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。
- 遠心分離(15,000 rpm または 12,000 × *g* 以上、1 分間)し、その上清をテンプレート DNA として下さい。

2) PCR

1 検体あたり下記の条件で 2 種類の PCR を行なって下さい。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。本製品は 2 種類のプライマーミックスを使用するため、1 検体あたり 2 種類の反応溶液を調製する必要があります。

PCR 反応溶液組成	容量
鑄型 DNA 溶液	2.0 µL
プライマーミックス (試薬 A もしくは試薬 B)	2.0 µL
EagleTaq Master Mix	10.0 µL
滅菌水	6.0 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: 4 分	} 30 回繰返し
94 °C: 30 秒	
52 °C: 90 秒	
72 °C: 60 秒	
72 °C: 7 分	

3) アガロースゲル電気泳動

- TBE 緩衝液を用いて、3 % アガロースゲルを調製して下さい。
- PCR 反応後のチューブに 4 µL の試薬 C (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、ミニゲル電気泳動装置の場合、100 V、30 分間程度が電気泳動の目安になります。また、対照として 100 bp DNA Ladder の分子量マーカーを同時に電気泳動して下さい。

4) 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浸し、約 30 分間染色して下さい。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。

5) データ解析

増幅された DNA のサイズからコアグララーゼ型を判別して下さい(図 1 参照)。

7. 使用上の注意事項

- 被検菌株は同定済みの純粋培養菌を使用して下さい。
- テンプレート DNA 溶液に精製 DNA を使用する場合は 10 ng/µL ~ 100 ng/µL 程度に調製して下さい。
- 菌株によって非特異的な DNA 断片の増幅が認められる場合があります。表 1 に記載したサイズの DNA のみを判定基準として下さい。
- 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。
- 各試薬は凍結融解の繰返しにより性能が劣化する可能性があります。繰返し使用する場合は、小分けして保存して下さい。
- 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

- 本製品は研究用として販売しております。ヒトや動物への医療・臨床診断用には使用しないで下さい。
- 本製品は雪印乳業株式会社および順天堂大学から技術供与を受けております。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。

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 回分	テンプレート調製
24308-08	LB 培地(Miller), 造粒タイプ	500 g	前培養培地
711129-5	トリプトン ソーヤブイオン	500 g	前培養培地
01089-23	アガロース KANTO HC	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 回分	電気泳動用

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。

10. 参考文献

Sakai F., Takemoto A., Watanabe S., Aoyama K., Ohkubo T., Yanahira S., Igarashi H., Kozaki S., Hiramatsu K., Ito T., Multiplex PCRs for assignment of *Staphylocoagulase* types and subtypes of type VI *Staphylocoagulase*. *J. Microbiol. Methods*. 2008, 75(2):312-317.



11. 電気泳動実施例

本法によるマルチプレックス PCR の実施例(電気泳動結果例)を示します。

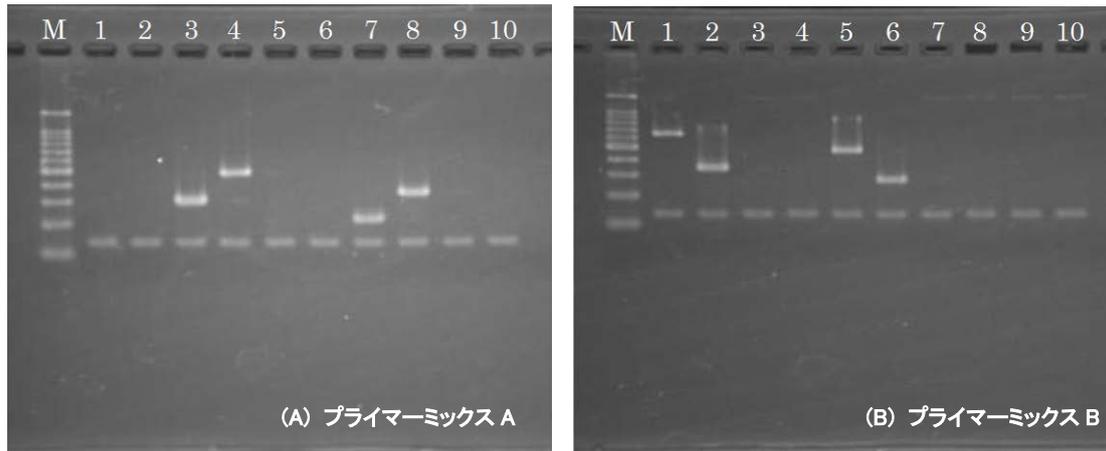


図 1 マルチプレックス PCR の実施例

1~10: 表 1 に示した黄色ブドウ球菌(I ~ X 型)の検体、M: 100 bp DNA ladder

(A) プライマーミックス A (コアグララーゼ III, IV, VII, VIII 型, *femA*)

(B) プライマーミックス B (コアグララーゼ I, II, V, VI 型, *femA*)

表 1 各コアグララーゼ型の標準株と増幅サイズ

NBRC 番号	COA 型	プライマーミックス A	プライマーミックス B
NBRC102135	I		644 bp
NBRC102136	II		342 bp
NBRC102137	III	310 bp	
NBRC102138	IV	490 bp	
NBRC102139	V		482 bp
NBRC102140	VI		269 bp
NBRC102141	VII	217 bp	
NBRC102142	VIII	358 bp	
NBRC102143	IX	-	-
NBRC102144	X	-	-
全菌株	<i>femA</i>	132 bp	132 bp

NBRC は NITE Biological Resource Center の略称です。また、本製品では、コアグララーゼ IX および X 型は検出できません。
femA は黄色ブドウ球菌の PCR ポジティブコントロールになります。

12. 相関性

黄色ブドウ球菌 155 株を用いて本法と対照法(抗血清法)の相関性を調査した結果、一致率は 99.4% (154/155) となりました(表 2)。

表 2 本法と抗血清法との相関性

COA 型	本法(PCR)								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	N.T.
I	3								
II		23							
III			12						
IV				7					1
V					5				
VI						73			
VII							21		
VIII								10	
Total	3	23	12	7	5	73	21	10	1

N.T. は I ~ VIII 型に該当せず。