取扱説明書 シカジーニアス® コアグラーゼ検出セット(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	シカジーニアス® コアグラーゼ検出セット (Cica Geneus® Staph Coagulase Detection Set)
製品番号	08179-96
容量	50 回分
保管温度	冷凍(-20 ℃～-25 ℃)

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,*femA*)	100 µL×1 本
試薬 B プライマーミックス B (Ⅰ,Ⅱ,Ⅴ,Ⅵ型,*femA*)	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

※1EagleTaq 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 ソーヤブイヨン等で一晩増菌培養し、フェノール/クロロホルムやスピン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、別売のシカジーニアス 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。

シカジーニアス DNA 抽出試薬の使用方法

1. 調製したシカジーニアス 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。
2. 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。
3. 72 ℃で 6 分間、94 ℃で 3 分間インキュベートして下さい。
4. 遠心分離し、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ダウン後、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
鋳型 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 ℃で保存して下さい。

94 ℃: 4 分
94 ℃: 30 秒 ┐
52 ℃: 90 秒 ├ 30 回繰返し
72 ℃: 60 秒 ┘
72 ℃: 7 分

3)アガロースゲル電気泳動

1. TBE 緩衝液を用いて、3 %アガロースゲルを調製して下さい。
2. 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。
3. 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。
4. 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)検出

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ーゼ型を判別して下さい(図 1 参照)。

7. 使用上の注意事項
1) 被検菌株は同定済みの純粋培養菌を使用して下さい。
2) 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。
3) 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。
4) 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。
5) 各試薬は凍結融解の繰り返しにより性能が劣化する可能性があります。繰り返し使用する場合は、小分けして保存して下さい。
6) 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
1) 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。
2) 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	シカジーニアス 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 ソーヤブイヨン	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.

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 (03)6214-1090 https://www.kanto.co.jp

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。

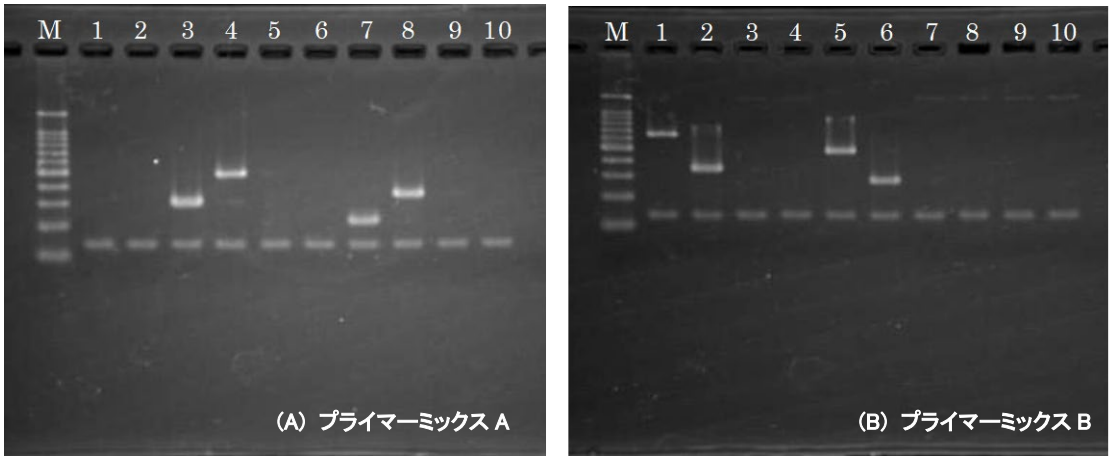

図 1 マルチプレックス PCR の実施例

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

表 1 各コアグ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	*femA*	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.
抗血清法	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。

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 (03)6214-1090 https://www.kanto.co.jp