

Kyorin 

製品コード GSC0RC0111

研究用

---

 **GeneSoC**<sup>®</sup> 専用

肺炎マイコプラズマ・百日咳菌 検出キット

---

取扱説明書

管理番号:GSC0RC0111Rv3

肺炎マイコプラズマは、呼吸器感染症の原因微生物として知られており、成人市中肺炎の原因微生物として分離される頻度は、第3位と報告されています<sup>1)</sup>。また、百日咳菌は幼小児を中心とした呼吸器感染症の原因微生物であり、2018年1月から5類感染症の全数把握疾患となっています<sup>2)</sup>。

本製品は、肺炎マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*)、および百日咳菌(*Bordetella pertussis*)を特異的に検出することを目的とした GeneSoC<sup>®</sup>および GeneSoC<sup>®</sup> mini R 専用検出キットです。肺炎マイコプラズマではATP合成酵素をコードする *atpD* 遺伝子を、また、百日咳菌ではゲノム中に50コピー以上含まれる挿入配列である IS481 遺伝子をターゲットとして、リアルタイムPCR法により検出を行います<sup>3)</sup>。本製品には、*atpD* 遺伝子および IS481 遺伝子とは別に、PCR反応を確認するための内部標準遺伝子が含まれております。

【検出対象遺伝子】

検出対象	検出対象遺伝子	レポーター色素/クエンチャー色素
肺炎マイコプラズマ	<i>atpD</i>	Cyanine5 / Black Hole Quencher 3
百日咳菌	IS481	FAM / Black Hole Quencher 1
内部標準	内部標準用人工配列	HEX / Black Hole Quencher 1

【引用文献】

- 1) 日本呼吸器学会成人肺炎診療ガイドライン 2017 作製委員編集. 成人肺炎診療ガイドライン 2017. 東京:一般社団法人日本呼吸器学会; 2017. p10.
- 2) 国立感染症研究所 感染症法に基づく医師届出ガイドライン 百日咳 2021年12月
- 3) 国立感染症研究所 病原体検出マニュアル 百日咳 2020年9月

I. 内容 (40 回分)

PCR 反応試薬

● 1. PCR Reaction Mix *1		480 $\mu$ L
● 2. Primer Probe Mix *2		240 $\mu$ L

陽性コントロールおよび希釈用バッファー

● 3. Positive Control DNA(Mp)*3	$1 \times 10^4$ copies/ $\mu$ L	40 $\mu$ L
● 4. Positive Control DNA(Bp)*4	$1 \times 10^4$ copies/ $\mu$ L	40 $\mu$ L
○ 5. PC Dilution Buffer		1 mL

- \*1 PCR 反応に必要な dNTP Mixture、 $Mg^{2+}$ 、DNA polymerase 等を含む
- \*2 遮光保存のこと
- \*3 *atpD* 遺伝子検出系の増幅領域を含む Positive Control DNA であるため、他の試薬へのコンタミネーション防止に留意すること。
- \*4 *IS487* 遺伝子検出系の増幅領域を含む Positive Control DNA であるため、他の試薬へのコンタミネーション防止に留意すること。

II. 保存

-20°C

III. 本製品以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

【器具】

- ・GeneSoC<sup>®</sup>または GeneSoC<sup>®</sup> mini 専用測定チップ(以下、専用測定チップ)
- ・各種マイクロピペット
- ・マイクロピペット用フィルター付チップ
  - \* マイクロピペットチップの先端形状が専用測定チップの試料導入口に適合することを確認の上ご使用ください。。
- ・試薬調製用マイクロチューブ

【機器】

- ・リアルタイム PCR 装置: マイクロ流路型遺伝子定量装置 GeneSoC<sup>®</sup>
- ・リアルタイム PCR 装置: 超高速リアルタイム PCR 装置 GeneSoC<sup>®</sup> mini R
  - \* 本製品は GeneSoC<sup>®</sup>および GeneSoC<sup>®</sup> mini R 専用検出試薬であり、他のリアルタイム PCR 装置には対応していません。
- ・微量簡易遠心機
- ・ボルテックスミキサー

#### 【試薬】

・DNA 抽出・精製キット

検体に応じて DNA 抽出・精製を行ってください。

#### IV. 使用上の注意

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用目的： 本製品は研究用の製品です。
2. 測定結果： ターゲット遺伝子の Primer および Probe が結合する領域の塩基配列内に変異や欠失/挿入が生じた際には、検出できない場合があります（検査結果判定により発生する問題に関して、杏林製薬株式会社は一切の責任を負いません）。
3. 廃棄： 試料は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って廃棄してください。作業区域は常に清潔に保ち、検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上高圧蒸気滅菌処理、または次亜塩素酸ナトリウム液等で処理を行った上、各施設の感染性廃棄物処理マニュアルに従って処理してください。PCR 反応後の専用測定チップは、高圧蒸気滅菌処理は行わないでください。処理を行うと PCR 増幅産物によるコンタミネーションの原因となりますので、密閉したまま廃棄してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。試薬容器、専用測定チップならびに器具は、廃棄物の処理および清掃に関する法律に従って処理してください。

#### V. 操作上の注意

1. PCR Reaction Mix を使用する際には、泡立てないように穏やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。ボルテックスミキサーによる混和は行わないでください。
2. 試薬の分注を行う際は、必ずディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。
3. 核酸分解酵素の混入にご注意ください。作業過程ごとにディスポーザブルマスクやグローブなどの個人防護具を着用するなど、操作には細心の注意を払ってください。
4. 試薬調製から検体サンプルの添加まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。
  - ① エリア 1: PCR 反応試薬を調製するエリア  
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行います（鋳型となる検体や DNA は持ち込まないでください）。
  - ② エリア 2: 検体を取扱うエリア  
検体の取扱いや DNA 抽出・精製を行います。
  - ③ エリア 3: PCR 反応液に検体サンプルを添加するエリア  
分注された PCR 反応液への検体（鋳型 DNA）の添加を行います。標準 DNA サンプルの希釈もこのエリアで実施します。

※ 本製品では、反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はございません。実験室内の DNA のコンタミネーションの原因となりますので、増幅産物を専用測定チップから取り出すことは避けてください。

5. 測定時の GeneSoC<sup>®</sup>および GeneSoC<sup>®</sup> mini R の操作については、各取扱説明書に従ってください。

## VI. 操作

### VI-1. 検体サンプルの調製（エリア 2 で実施。必要に応じて、安全キャビネット内で実施する）

- ・市販の DNA 抽出・精製キットなどを使用して検体サンプルを調製します。
- ・喀痰を検体とする場合には、スプタザイム(極東製薬工業株式会社)などの喀痰処理剤を用いて均質化させてから DNA 抽出・精製を行ってください。

### VI-2. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

#### 1. PCR 反応液を調製する（エリア 1 で実施）

必要数+ $\alpha$ 分の反応液をまとめて調製し、リアルタイム PCR 用反応チューブに 18 $\mu$ L ずつ分注します。必要本数は、サンプル数に陽性コントロール、陰性コントロール分を加え、定量解析を行う場合には、スタンダード DNA の反応数を追加します。

##### 【1 反応分の PCR 反応液の組成】

● PCR Reaction Mix	12 $\mu$ L
● Primer/Probe Mix	6 $\mu$ L
Total	18 $\mu$ L

#### 2. サンプルを添加する（エリア 3 で実施）

1で分注した反応チューブに以下のサンプル 2  $\mu$ L を添加し、しっかりふたをします。

- |            |   |   |   |
|------------|---|---|---|
| 陰性コントロール   | ： | ○ | PC Dilution Buffer あるいは PCR グレードの H <sub>2</sub> O 等        |
| 陽性コントロール   | ： | ● | Positive Control DNA (Mp) 1 $\mu$ L と、                      |
|            |   | ● | Positive Control DNA (Bp) 1 $\mu$ L を混合したもの                 |
|            |   |   | あるいは各 Positive Control DNA 1 $\mu$ L と PC                   |
|            |   |   | Dilution Buffer あるいは PCR グレードの H <sub>2</sub> O 1 $\mu$ L を |
|            |   |   | 混合したもの  |
| 検量線用スタンダード | ： |   | Positive Control DNA 等の希釈系列                                 |
| 検体サンプル     | ： |   | DNA 抽出・精製溶液   |

反応チューブを微量簡易遠心機で軽く遠心して、測定に供します。

3. GeneSoC<sup>®</sup>または GeneSoC<sup>®</sup> mini R で測定を開始する（エリア 2 で実施）  
 2 で調製した試料を専用測定チップに注入します。注入時は 20 μL 用マイクロピペットを使用し、専用測定チップの使用方法に従って、18～20 μL を注入します。

【測定条件】

	温度	時間	サイクル数
ホットスタート (HS)	96℃	10 秒	1 サイクル
熱変性 (DN)	96℃	5 秒	50サイクル
伸長 (AE)	66℃	6 秒	

【QR コード】

GeneSoC<sup>®</sup>用    GeneSoC<sup>®</sup> mini R 用



\* 上記 QR コードから測定条件を自動入力できます。

VI-3. 判定

【検出対象遺伝子と蛍光検出の設定】

検出対象	検出対象遺伝子	蛍光検出
肺炎マイコプラズマ	<i>atpD</i> 遺伝子	R: Cyanine5
百日咳菌	<i>IS481</i> 遺伝子	B: FAM
内部標準	内部標準用人工配列	G: HEX

【コントロール反応の確認】

- ・ 陽性コントロール(鋳型 DNA 濃度 10<sup>4</sup> copies/μL)で *atpD*、*IS481* 各遺伝子が検出されない場合には、何らかの原因で PCR 反応や検出が正常に行われていないため、再測定を実施してください。
- ・ 陰性コントロールで内部標準が検出されない場合には、何らかの原因で PCR 反応や検出が正常に行われていません。また、*atpD*、*IS481* 各遺伝子が検出された場合はコンタミネーションの疑いがあります。調製場所や器具類を除染した上で、再測定を実施してください。
- ・ 各検出対象遺伝子のコピー数が非常に多い場合には、内部標準の検出が遅れる、あるいは減弱することがありますが、これはマルチプレックス PCR 反応に基づく事象であり、PCR 反応の不具合ではありません。

VII. 関連製品

- ・ GeneSoC<sup>®</sup>専用 肺炎球菌・インフルエンザ菌 検出キット (製品コード GSC0RC0101)
- ・ GeneSoC<sup>®</sup>専用 MRSA 検出キット (製品コード GSC0RC0121)
- ・ GeneSoC<sup>®</sup>専用 インフルエンザウイルス A/B・A 群β溶血性連鎖球菌 検出キット (製品コード GSC0RC0131)

VIII. 注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物等の医療・臨床診断には使用しないでください。
- ・ 杏林製薬株式会社の承認を得ずに製品を再販・譲渡すること、再販・譲渡のために改変すること、あるいは商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ GeneSoC<sup>®</sup>は杏林製薬株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品に関するお問い合わせ

杏林製薬株式会社 くすり情報センター

TEL: 0120-952956

受付時間: 9:00~17:00 (月~金 ※土日祝除く)

製造販売元: 杏林製薬株式会社

住所: 〒101-8311 東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地

URL: <https://www.kyorin-pharm.co.jp/>

GeneSoC 製品 Web サイト

URL: <https://www.genesoc.jp/>

管理番号: GSC0RC0111Rv3

作成年月: 2023 年 4 月