

foodproof® Salmonella Detection Kit (-5' Nuclease-) [R 302 27]

Ver.3, 10/2010

3216R30227 foodproof サルモネラ検出キット 取扱説明書 抄訳

ご注意: 原文および内容を確認してください。取扱方法、仕様等は予告なく変更されます。原文には、この抄訳に含まれていない図表などがありますので必ず参照するようにしてください。この抄訳とキット同梱の原文とで相違ある場合には原文を優先してください。抄訳 by 株式会社 プラクティカル (2017/07)

1. 内容

試験数

25 μ L での PCR 反应用として 96 反応分。(陽性および陰性コントロール各 1 とした場合、最大 94 反応)

保管と安定性

- 暗所、-15~-25°C 冷凍保管。有効期限はラベルに記載。
- 開封後は下記キット内容表に記載のとおり保管。

キット内容

①黄	foodproof Salmonella Master Mix マスターミックス	3 x 600 μ L サルモネラ DNA 用プライマー & プローブミックスおよびサルモネラ用内部コントロール(調整済み) -15~-25°C 冷凍保管 凍結・解凍の繰り返しは避けること。遮光すること
②赤	foodproof Salmonella Enzyme Solution 酵素液	3 x 32 μ L TaqDNA ポリメラーゼおよびキャリアオーバー防止用の Uracil-DNA グリコシラーゼ(=易熱性)を含む -15~-25°C 冷凍保管
③白	foodproof Salmonella Internal Control 内部コントロール	3 x 32 μ L DNA プラズミド溶液および視認用黄色染料を含む 内部コントロールとして使用 -15~-25°C 冷凍保管。最初の溶解後 2~8°C で 1 カ月有効。
④紫	foodproof Salmonella Control Template コントロールテンプレート	1 x 50 μ L DNA プラズミド溶液含む 陽性コントロールとして使用 -15~-25°C 冷凍保管。最初の溶解後 2~8°C で 1 カ月有効。
⑤透明	H ₂ O, PCR-grade PCR グレード H ₂ O 陰性コントロール	1 x 1mL PCR グレード水、ヌクレアーゼフリー 陰性コントロールとして使用 -15~-25°C 冷凍保管。

他に必要な試薬・資器材

FAM および VIC/HEX を同時検知するリアルタイム PCR 装置、同対応 PCR 用チューブ、ストリップ、プレート類
 foodproof シリーズ前処理試薬キット (StarPrep One か ShortPrep I か Sample Preparation Kit I)
 ヌクレアーゼフリー、エアロゾル対応ピペットチップおよびマイクロピペット
 PCR ミックス調製・希釈用容器としての滅菌チューブ類

適用範囲

foodproof® Salmonella Detection Kit はサルモネラ汚染が有りうる様々な食品において、適切な方法で培養され抽出されたサルモネラ DNA を迅速に検出することを目的としています。

foodproof® Salmonella Detection Kit – Hybridization Probes (LightCycler® 1.x, 2.0)は、以下を含む様々な食品において AOAC-RI および NordVal の性能認証を受けています。

chicken breast, cocoa powder, coconut, cumin, dough, dry pet food, egg, powder, food dye, Frankfurter sausage, ice cream, Lyoner sausage, milk chocolate, milk powder and minced meat

foodproof® Salmonella Detection Kit は foodproof® Enterobacteriaceae plus E. sakazakii Detection Kit, the foodproof® StarPrep One Kit の併用により、以下において RIVM による MicroVAL の性能認証を受けています。

infant formula, probiotic culture powders/pre-blends and ingredients

(probiotics、sugar については特別な培養方法が必要です。参照 MicroVal Certificate No. 2011SA39)

ハーモナイズド MicroVal/AOAC-RI バリデーションでは foodproof® Magnetic Preparation Kit I や the foodproof® StarPrep One Kit の併用により、以下の食品において性能認証を受けています。

beef meat, chocolate and bakery products, egg products, feed samples, meat and meat products, milk and dairy products and primary production samples.

診断目的で用いてはいけません。

このキットは、FAM および VIC/HEX を同時検知するリアルタイム PCR 装置用に開発されてきました。このキットの性能は以下の機器でテストされました。

LightCycler® 480 (Roche Diagnostics), ABI 7500 and StepOnePlus (Applied Biosystems), Mx3005P®QPCR System(Stratagene), iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), Mastercycler ep realplex4 (Eppendorf)

2. 使用方法

2.1 はじめに

注意

この方法では PCR による DNA 増幅を行います。このキットには PCR に必要な試薬は全て含まれています。信頼性のある結果を得るために、全てのアッセイ操作はヌクレアーゼフリーの状態で行う必要があります。ヌクレアーゼ、キャリアオーバー、クロスコンタミを防ぐため、下記に従ってください。

- 必要な量だけの試薬を調製し、試験室内の他の試薬とは隔離しておくこと。
- ヌクレアーゼフリーの試験器具を用いること。 ■グローブを着用すること。
- 試料や試薬のクロスコンタミを防ぐため、エアロゾル対応のピペットチップを用いること
- ボトルから直接ピペットせず、必要量だけを新しいチューブに移しておくこと
- DNA 抽出、PCR 準備、PCR 機器は物理的に別の場所に隔離すること
- ピペット操作は PCR 用ベンチ内で行うこと。

マスターミックス(①黄色)は必ず遮光しておくこと。

廃棄

病原微生物による汚染の恐れがある廃棄物や生物危害物質は適宜の汚染物袋にいれ、部屋名、日付などとともに汚染廃棄物と表記すること。オートクレーブ後に規則に従って廃棄すること。

試料

阻害物のない、純度、濃度など PCR に適した試料を用いること。原料や食品培養物からの DNA 抽出は、適宜の試料調製キットの取扱説明書を参照すること。

増菌

前増菌の培地と温度は ISO6579 や BAM(Chapter5) や USDA 法に従い、20 時間±2 時間行うこと。サブ培養は予熱されたベレインハートインフュージョン培地に 10 倍希釈し、37°C で 3 時間行うこと。他法も可。

DNA 抽出

BIOTECON 社ではあらゆる食品や原料に適した試料抽出キットを提供しています。お問合せください。

陽性コントロール

試料と並行して必ず陽性コントロールを試験すること。試料 DNA に替えて、キット添付のコントロールテンプレート(④紫)、あるいは陽性試料から調製した抽出 DNA を滴下して反応させます。

陰性コントロール

試料と並行して必ず陰性コントロールを試験すること。反応純度やクロスコンタミを監視するため、試料調製時から用います。この抽出コントロールは追加的な陰性コントロールとして用いることができます。

培養法による確認

この PCR 法による暫定陽性試料は ISO6579 法、BAM 法(Chapter 5)、Oxoid DR1108A によるラテックス凝集法や API20E による生化学法などにより確認する必要があります。

2.2 手順

リアルタイム PCR のプログラム

装置のマニュアルを参照のうえ、試料準備の前に、試験プロトコルをプログラム設定してください。

Pre-Incubation	1 cycle
Step 1:	37°C 4分
Step 2:	95°C 5分
Amplification	50 cycles
Step 1:	95°C 5秒
Step 2:	60°C 60秒
Fluorescence Detection : Step 2	

NOTE: いくつかのリアルタイム PCR 装置では、passive reference dye の使用や probe quencher の種類を指定する必要があります。TAMRA quencher を使用しており、passive reference dye は含んでおりません。
Agilent Mx3005P の場合: "Instrument" "Filter Set Gain Settings" をクリックし、同ダイアログボックスで FAM の Filter Set Gain Setting を "x 1" に設定してください。Roche LC480 の場合: 波長設定についてはお問い合わせください。

試料準備

下記のとおり、標準で 25 μL での反応となるようにしてください。PCR チューブやキャップは常にグローブ着用。

1. 試薬を解凍し、内容液を無駄なく採れるよう、開栓前に短時間遠心機にかけてください。さらにマイクロピペットを上下させて丁寧かつ完全に内容を Mix してください。
2. 適宜のチューブに、下記の試薬類を順番どおりに滴下、さらにマイクロピペットを上下させて丁寧かつ完全に内容を Mix して、PCR ミックスを作製します。下記の容量は標準的な反応量を 25 μL としています。調製が必要な総量は下記の各容量に、反応試料数 + ピペットロス分 (1~2) を乗じることで得られます。

PCR ミックス	容量
foodproof Salmonella Master Mix, (①黄) : マスターミックス	18 μL
foodproof Salmonella Enzyme Solution, (②赤) : 酵素液	1 μL
foodproof Salmonella Internal Control, (③白) : 内部コントロール	1 μL
Total volume : 合計 (試料除く)	20 μL

× (試料数 + 1~2)

3. 各反応チューブに下記のように滴下し、マイクロピペットを上下させて丁寧かつ完全に内容を Mix します。ボルテックス振とうはしないでください。

▼ 全反応チューブに 20 μL PCR ミックス

- 試料: 5 μL DNA 抽出試料
- 陰性コントロール: 5 μL PCR グレード H₂O (⑤透明)
- 陽性コントロール: 5 μL foodproof Salmonella Control Template: コントロールテンプレート (④紫)

以上各チューブは合計 25 μL

4. キャップで確実に密封する。
5. 短時間、遠心機にかける。
6. リアルタイム PCR 装置にセットし、上記の設定で試験・解析する。

2.3 結果解釈

サルモネラ DNA の増幅は FAM 標識プローブ用の蛍光チャンネルにより解析されます。
 内部コントロール DNA の増幅は VIC/HEX 標識プローブ用の蛍光チャンネルにより解析されます。
 各試料ごとに、FAM(サルモネラ)と VIC/HEX(内部コントロール)の結果を比較して下記のとおり解釈します。

サルモネラ FAM	内部コントロール VIC/HEX	結果の解釈
+	+	陽性
-	+	陰性
+	-	陽性
-	-	試験無効

NOTE: 曖昧でない判別のためには、FAM および VIC/HEX チャンネルの適切なキャリブレーションが必須です。
 詳しくは機器のマニュアルを参照してください。

以下省略につき原文をご参照ください。

3. Troubleshooting

4. Additional Information on this Product

- How this Product Works
- Test Principle
- Prevention of Carry-Over Contamination
- Background Information
- Product Specifications
- References
- Quality Control

5. Supplementary Information

- 5.1 Ordering Information
- 5.2 License Notice
- 5.3 Trademarks
- 5.4 Contact and Support

6. Change Index