

## カネカ 食中毒菌検出キット（リステリア・モノサイトゲネス）

## 注意

- 本品は研究用途としてのみ使用して下さい。尚、ヒト、動物への医療、臨床診断等に使用しないでください。
- 本品の各種試薬は、本取扱説明書に記載する保存方法の内容を厳守して保存してください。保存する際にはコンタミネーションに注意してください。
- 本品の仕様は予告なく変更する場合があります。
- PCR 反応液の調製や反応に使用する器具や機器、試薬類（培地等を含む）は、本取扱説明書や各々の製造元・販売元が指定する使用方法に従って、使用してください。
- 本品によって得られた結果の判断や利用について、お客様の責任のもと実施してください。実施した結果、お客様に生じた損害や損失について、当社はなんら責任を負いません。
- 本取扱説明書に記載のない操作手順や各々の食品における検出結果の妥当性についてはお客様にて検証してください。

## 特徴・内容物

本品は、食中毒の原因菌として知られているリステリア・モノサイトゲネスを迅速・簡便に検出するキットです。本品には増幅酵素ミックス、プライマーミックス、テストストリップ（2ライン）、展開バッファーが含まれております。培地、DNA抽出試薬（必要に応じて）は別途ご準備ください。

内容物	内容量（24テスト分）
増幅酵素ミックス	240 $\mu$ L $\times$ 1本
プライマーミックス	192 $\mu$ L $\times$ 1本
テストストリップ（2ライン）	24本
展開バッファー	4 mL $\times$ 1本
取扱説明書	1部

## 保存方法／使用期限

## ■ 保存方法

直射日光を避けて保存してください。

- ・増幅酵素ミックス：-20℃保存
- ・プライマーミックス：-20℃保存
- ・テストストリップ（2ライン）：常温保存
- ・展開バッファー：常温保存

## 【注意事項】

テストストリップ(2ライン)は湿気を含む状態で長時間放置すると検出性能が低下する恐れがありますので、開封後も容器(乾燥剤含む)に入れ、蓋をしっかりと閉じて保管し、吸湿には十分ご注意ください。増幅酵素ミックス及びプライマーミックスについては、凍結・融解を繰り返すと検出性能が低下する恐れがありますので、1回で使い切れない場合は、できるだけ分注して保存し、凍結・融解の回数を極力少なくすることをお奨めします。

### ■ 使用期限

本品外袋に記載しております。

## 使用方法

### <必要な道具>

1. ピペット
2. ピペットチップ
3. サーマルサイクラー(推奨機器: Life ECO Thermal Cycler (Bioer Technology 社製))
4. 1.5 mL チューブ
5. 0.2 mL チューブ
6. 小型インキュベーター(1.5 mL 用、95°C以上の加熱が可能)
7. 卓上型遠心機

### ■ 培養工程

厚生労働省通知食安発 1128 第 3 号「リステリア・モノサイトゲネスの検査について」などに記載されている培地等を用いて、所定の温度で所定の時間、検体を培養します。

### ■ 培養液からの DNA 抽出工程

市販の DNA 抽出キット又は熱抽出法などに従って、培養液から核酸を抽出してください。熱抽出法の場合は以下の手順に従います。

- ① 1.5 mL チューブに培養検体 100  $\mu$ L を取り、滅菌水あるいは TE バッファー(10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0)を 900  $\mu$ L 添加します。
- ② 95 °C 以上で 10 分間熱処理します。
- ③ 室温になるまで冷却後、遠心(遠心条件: 12,000 ~15,000 rpm で 1 分間)し、上清を検体として使用します。

## ■ PCR 工程

- ① 凍結しているプライマーミックス、増幅酵素ミックスを氷上等で穏やかに融解させてください。
- ② 表 1 に従い、PCR 反応液を調製します。0.2 mL チューブに 1 の試薬(プライマーミックス)から順番に添加し、数回ピペティングし、PCR 反応液を調製します。

表 1. PCR 反応液の試薬組成

1. プライマーミックス	8 $\mu$ L
2. 増幅酵素ミックス	10 $\mu$ L
3. 検体(核酸抽出液)	2 $\mu$ L

- ③ 表 2 の PCR 条件に従い、PCR を行ないます。

表 2. PCR 条件

Step	温度/時間	サイクル数
Step 1	25 $^{\circ}$ C/10 min	1
Step 2	95 $^{\circ}$ C/2 min	1
Step 3	98 $^{\circ}$ C/10 sec	37
	60 $^{\circ}$ C/30 sec	
	72 $^{\circ}$ C/30 sec	

### 【注意事項】

- PCR 反応液は調製後、すぐにサーマルサイクラーでの反応を行なってください。
- 反応液の調製時には滅菌済みのピペットチップを使用してください。

## ■ 核酸クロマト検出工程

- ① PCR 後の反応液が入った 0.2 mL チューブをサーマルサイクラーから取り出した後、チューブスタンドに立て、反応液に展開バッファーを 160  $\mu$ L 添加してください。
- ② テストストリップを 0.2 mL チューブに挿入し、テストストリップの試料添加部(図 1)が反応液に浸るようにして、そのまま静置してください。
- ③ 10 分後に、コントロールライン及びテストラインを目視で判定してください。

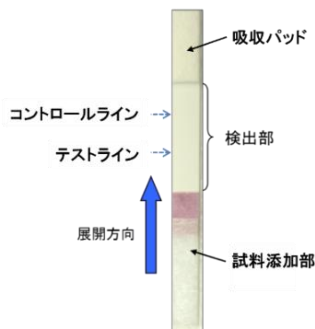


図 1. テストストリップ (2ライン) の概要

### 【注意事項】

- テストストリップを持つ際には、必ず上部の吸収パッドを持つようにしてください。テストストリップの試料添加部や検出部には直接手で触れることや、傷をつけることが無いよう取扱いには十分注意してください。
- テストストリップをチューブに挿入する際、テストストリップの試料添加部下端が 0.2 mL チューブの底に当たるまで十分に挿入してください。

### ■ 検出ライン及び検出例

テストライン: リステリア・モノサイトゲネス検出用ライン

コントロールライン: PCR 反応確認用ライン

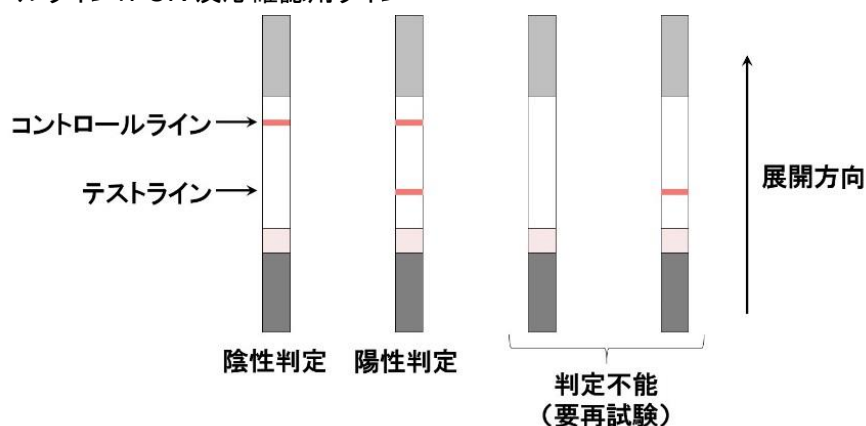


図 2. 判定結果例

### 【注意事項】

コントロールラインは、増幅反応が正常に進行している場合に常時着色します。コントロールラインが着色しない場合は増幅反応が正常に進行していない可能性がありますので、再試験を実施してください。テストラインは陽性の場合のみ着色します。

### 性能

- リステリア・モノサイトゲネスの菌株より抽出したゲノム DNA (5 pg/test 以上) に対して、本取扱説明書に記載された方法に従って検出を行った場合、正常な判定結果を得ることができます。
- 使用するサーマルサイクラーによっては本品の検出感度が異なる場合があります(推奨機器: Life ECO Thermal Cycler (Bioer Technology 社製))。
- DNA 抽出方法によっては検出感度が異なる可能性があります。
- DNA 抽出後の DNA 量が極めて多い場合や培養液の持込み量が多い場合には、PCR 増幅反応が阻害されてテストライン及びコントロールラインが共に検出されない可能性があります。その場合、DNA 抽出液を希釈して PCR に供することで改善されることがあります。

## 保証

- 弊社の責任の範囲は、本品自体に不具合があった場合の代替品への交換のみに限られ、直接・間接を問わずその他一切の損害について弊社はその責任を負いません。あらかじめご了承のうえ、本品を使用してください。

## 取扱方法・廃棄方法

- 本品の取扱いの際には保護具（保護手袋、保護メガネ、マスクなど）の着用をお奨めします。
- 残余廃棄物がある場合、ペーパータオルやウエスに吸収させて焼却処分してください。
- 使用後の容器、包装を廃棄する場合は内容物を完全に除去した後に処分してください。

## お問い合わせ先

株式会社カネカ メディカルデバイス開発研究所

〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8

TEL 079-445-2406 FAX 079-445-2756

お問い合わせ受付時間：平日 9:00～17:00

URL <http://www.kaneka-labtest.com>