

この使用説明書をよく読んでから使用してください

## 研究用試薬

## スィフトジーン® 肺炎マルチ5「カインス」

## 【はじめに】

肺炎は、病原微生物が肺に侵入することで生じる炎症性疾患であり、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, Sp)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*, Hi)、マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*, Mp)、レジオネラ (*Legionella pneumophila*, Lp)、及びクラミジア (*Chlamydia pneumoniae*, Cp)は、市中肺炎の主要な原因菌とされています。

本製品は、Multiplex NASBA-核酸クロマトグラフィーに基づき、上記5菌種を約3時間で一度にスクリーニングする遺伝子検出キットです。独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の大学発事業創出実用化研究開発事業における共同研究成果を基に開発されました。

## 【一般的な注意】

- 1) 本製品は研究用試薬です。診療上の診断に用いることはできません。
- 2) 使用説明書に記載以外の使用方法については保証を致しません。
- 3) 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。詳細は機器メーカーにお問い合わせください。
- 4) 本製品は核酸 (RNA) を対象とし、大量のRNAを生成し、検出する試薬です。試料や増幅産物の取り扱いを誤ると検査結果に大きく影響しますので、遺伝子操作に関する一般的な注意をよく理解して実施してください。

## 【形状・構造等(キットの構成)】

1. 抽出・増幅試薬
  - 1) 核酸抽出試液
  - 2) NASBA試薬 (NASBA Reaction Buffer):  
dNTPs, NTPs
  - 3) プライマー溶液:  
Sp, Hi, Mp, Lp, Cp 特異的プライマー
  - 4) NASBA酵素試薬 (NASBA Enzyme):  
AMV-RT, RNase H, T7 RNA polymerase
  - 5) NASBA酵素溶解液
  - 6) 反应用チューブ
2. 検出試薬
  - 1) 検出ストリップ
  - 2) 展開液
  - 3) プレートシール

## 【測定原理】

## 1. 原理

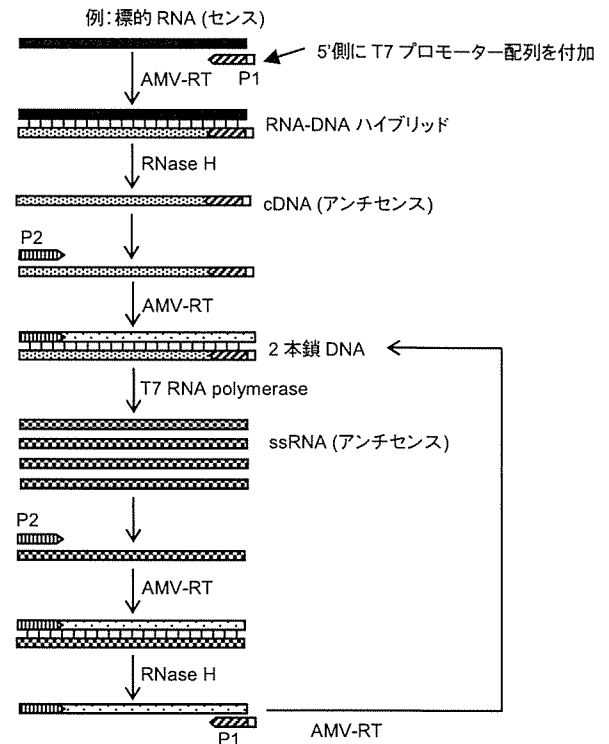
本製品はNASBA法<sup>1)</sup> (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) による核酸増幅及び核酸クロマトグラフィー<sup>2)</sup>を用いて、肺炎原因菌5種に特異的なRNAを検出します。

## A. 抽出

核酸抽出試液と熱により菌体を破壊して核酸を抽出し、EXTRAGEN II等の核酸精製キットを用いて核酸を得ます。

## B. 核酸増幅法 (Multiplex NASBA)

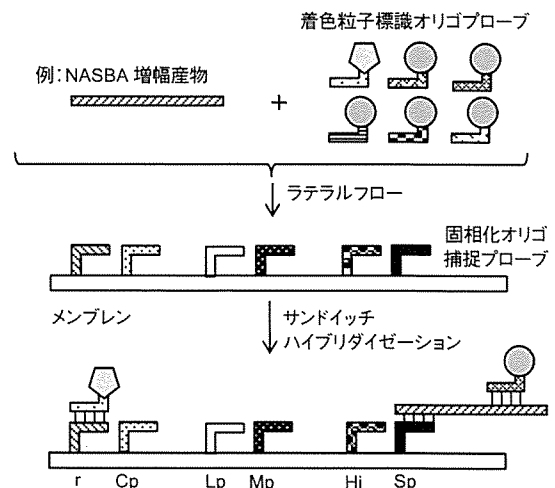
Sp、Hi、Mp、Lp、及びCpそれぞれに特異的なRNAを鋳型とし、45°Cの一定温度で、3種類の酵素 (逆転写酵素 (AMV-RT)、リボヌクレアーゼH (RNase H)、RNAポリメラーゼ (T7 RNA polymerase))、プライマー溶液 (リバース5種 (P1)、フォワード 5種 (P2)) 及び基質の存在下で、途中合成される二本鎖DNAを介し、鋳型に相補的な配列の1本鎖RNA (ssRNA) を増幅します (下図参照)。プライマー溶液には5菌種それぞれに特異的なプライマーが含まれています。



## C. 核酸クロマトグラフィー

NASBA増幅産物が着色ラテックス標識オリゴプローブ及びメンブレン上の捕捉プローブ (固相化オリゴDNA) とサンドイッチハイブリダイゼーションすることにより、メンブレン上に着色ラテックスのラインが形成されます (下図参照)。

肺炎原因菌5種のラインはそれぞれ異なる位置に形成されますので、目視で確認することにより、試料中の5菌種の存在有無を識別判定します。



## 2. 特徴

- 1) 肺炎原因菌5種を一度にスクリーニングする遺伝子検出キットです。
- 2) 検出対象は、Sp、Hi、Mp、Lp、Cpの肺炎原因菌5種です。
- 3) 核酸抽出・増幅・検出までに要する時間は約3時間です。
- 4) 核酸クロマトグラフィー法により5菌種の検出ラインを目視で識別判定するキットです。

## 【操作上の注意】

- 1) RNase等による核酸分解防止のため、試料からのRNA抽出操作を含めた操作全般にわたって、必ずマスク及びグローブを着用してください。
- 2) 検出操作は室内温度 (20~30°C) で実施してください。

## 【用法・用量(操作法)】

## 1. 試薬の調製方法

- 1) NASBA反応溶液:  
NASBA試薬にプライマー溶液 55 µLを加え、直ちにボルテックスミキサーを用いて十分に溶解してください。調製後は、氷上に置かずに常温で静置してください。  
溶解後は遠心しないでください。チューブ壁面に液滴がある場合は手でチューブを振り落とす程度にしてください。  
調製後に長期保存する場合は、-70°C以下で保存してください。
- 2) NASBA酵素液:  
NASBA酵素試薬をスピンドウンした後、NASBA酵素溶解液 30 µLを加え、10秒程度待ってからタッピングにより溶解してください。  
ボルテックスミキサー等による激しい混和は、酵素が失活するため行わないでください。  
調製後に長期保存する場合は、-70°C以下で保存してください。
- 3) 核酸抽出試液、検出ストリップ、展開液:  
室内温度 (20~30°C) に戻した後、そのまま使用してください。  
検出ストリップは検出操作の直前に開封してください。

## 2. 必要な器具・器材・試薬等

- 1) マイクロピペット (10, 200, 1000 µL)、フィルターチップ
- 2) 1.5 mL チューブ
- 3) ヒートブロック (45°C、65°C、90°C)
- 4) ボルテックスミキサー
- 5) 遠心機
- 6) スプタザイム (極東製薬工業株式会社)
- 7) EXTRAGEN II (東ソー株式会社)
- 8) PBS

## 3. 操作法

## A. 核酸抽出

- 1) 喀痰試料を用いる場合、スプタザイムの使用方法に従って均質化してください。
- 2) 均質化した喀痰100 µLを15,000 rpmで3分間遠心した後、上清を除去してください。
- 3) PBS 1.0 mLを添加し、ボルテックスミキサーで10秒間混和して沈殿物を分散させます。
- 4) 15,000 rpmで3分間遠心した後、上清を除去してください。
- 5) 核酸抽出試液 200 µLを添加し、ボルテックスミキサーで5秒間混和して沈殿物を分散させます。
- 6) 95°Cで5分加熱し15,000 rpmで3分間遠心します。
- 7) 上清部分を核酸精製キットに使用します。EXTRAGEN II等の核酸精製キットを用いて核酸溶液を得ます。

注1: EXTRAGEN IIを用いて核酸精製する場合、各構成試薬の推奨使用量は以下のとおりです。

試薬 1	2.0 µL
試薬 2	1.0 mL
試薬 3	400 µL
RNase free water	500 µL
(核酸溶解)	

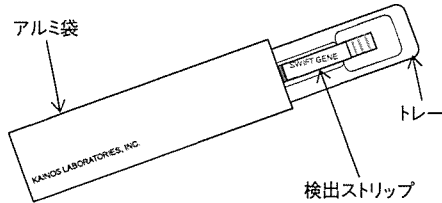
## B. NASBA反応

- 1) NASBA反応溶液及びNASBA酵素液を調製します。  
(調製方法は「1. 試薬の調製方法」を参照)
- 2) 付属の反応用チューブにNASBA反応溶液 5 µLを分注し、常温で静置します。
- 3) 反応用チューブに、A.7) で得られた核酸溶液 2.5 µLを分注し、10回ピペッティングして混合します。  
注2: 反応用チューブ内で液が散った場合は遠心機でスピンドウンしてください。  
衝撃によるRNA分解を防ぐため、ボルテックスミキサー等による混和は行わないでください。
- 4) 65°Cのヒートブロックで5分間加熱します。
- 5) 45°Cのヒートブロックで5分間加熱します。
- 6) 45°Cのヒートブロック上で反応用チューブ内の反応液に直接NASBA酵素液 2.5 µLを添加し、5回ピペッティングして混合します。そのまま45°Cのヒートブロックで90分間加熱してください。  
注3: NASBA酵素液を添加後、最初の5分間はNASBA反応の重要な過程であるため、温度低下を招く遠心等の操作は行わないでください。
- 7) 反応終了後、直ちに検出操作に移ります。(「C. 核酸クロマトグラフィー」を参照)  
注4: NASBA増幅産物を保存する場合、増幅反応終了後の反応用チューブを-70°C以下で保存してください。  
検出操作前に常温に戻してから使用してください。

C. 核酸クロマトグラフィー

- 1) 検出ストリップは室内温度 (20~30°C) に戻してからアルミ袋を開封し、検出ストリップをトレーごと取り出した後、さらにトレーから取り出します。

注5: アルミ袋の開封は検出操作の直前に行ってください。

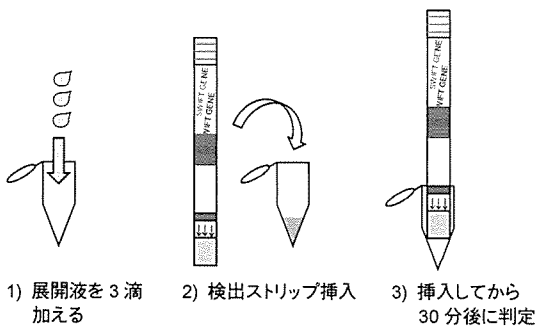


- 2) 増幅反応終了後の反应用チューブ (NASBA増幅産物) に展開液を3滴 (約90 μL) 加えます。
- 3) 反应用チューブに検出ストリップを矢印が下になるように挿入し、検出ストリップの先端を展開液に浸します。

注6: 反应用チューブの底に強く押しつけないように注意し、検出ストリップの下端がチューブの底にあたるまで挿入してください。

注7: 検出ストリップを入れた際、矢印の下端ラインを超えて展開液に浸してしまうと展開不良を起こすことがあるので注意してください。

- 4) 反应用チューブにストリップを挿入してから30分後に判定します。  
(【測定結果の判定法】を参照)



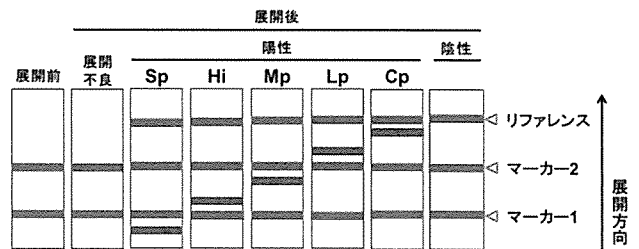
【測定結果の判定法】

1. 判定法

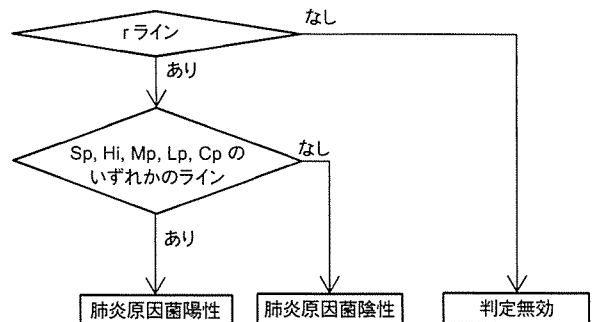
以下のラインの有無により判定してください。

ライン	色・位置	判定内容
Sp	青・マーカー1の下	陽性・陰性の確認
Hi	青・マーカー1の上	
Mp	青・マーカー2の下	
Lp	青・マーカー2の上	
Cp	青・rラインの下	
リファレンス (r)	赤	検出フローの確認

- 1) 肺炎原因菌 陽性 :  
rライン (赤) と Sp, Hi, Mp, Lp, Cpのいずれかのライン (青) が認められる。
- 2) 肺炎原因菌 陰性:  
rライン (赤) が認められ、Sp, Hi, Mp, Lp, Cpのいずれのライン (青) も認められない。
- 3) 判定無効:  
rライン (赤) が認められない (展開不良)。



判定フロー:



2. 判定上の注意

- 1) 判定は60分以内に行ってください。
- 2) 検出ストリップを挿入してから30分経過後、rライン (赤) が認められない場合、再検査してください。
- 3) メンブレン上にラテックスの着色が全体的に残っていても、rライン (赤) が認められていれば核酸クロマトグラフィーの反応は有効です。
- 4) 試料中の目的成分以外の物質との反応や妨害反応を生じることがあります。結果に疑問がある場合は、再検査や他の検査方法により確認してください。
- 5) 検査結果を保存する場合は、検出ストリップをトレーに戻し、添付のプレートシールで密閉保存してください。

## 【性能】

## 1. 性能

## 1) 最小検出感度

Sp : 250 cfu/test  
 Hi : 50 cfu/test  
 Mp : 250 cfu/test  
 Lp : 100 cfu/test  
 Cp : 0.5 ifu/test

※cfu : Colony Forming Unit  
 ifu : Inclusion Forming Unit

## 2) 交差反応性

以下の菌種との交差反応は認められません。

*Staphylococcus aureus*  
*Staphylococcus haemolyticus*  
*Staphylococcus epidermidis*  
*Staphylococcus intermedius*  
*Staphylococcus hominis*  
*Staphylococcus warreri*  
*Staphylococcus capitis*  
 MRSA  
*Enterobacter cloacae*  
*Streptococcus mitis*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Pseudomonas fluorescens*  
*Pseudomonas putida*  
*Moraxella catarrhalis*  
*Moraxella lacunata*  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Klebsiella pneumoniae sub sp. Ozaenae*  
*Klebsiella pneumoniae sub sp. Rhinoscleromatis*  
*Escherichia coli*  
*Haemophilus parainfluenzae*

## 【使用上又は取扱い上の注意】

## 1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- 1) 検査にあたっては使い捨て手袋を着用してください。
- 2) 試薬が誤って眼や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当を受けてください。
- 3) 本製品にはアジ化ナトリウムが含有されています。誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当等を受けてください。

## 2. 使用上の注意

- 1) 各試薬は保存温度を厳守してください。調製した試薬の保存にあたっては、コンタミネーション防止に注意してください。
- 2) 増幅反応に使用する試液は2種類ありますので、調製時及び操作時に取り違えないように注意してください。
- 3) NASBA増幅産物は-70℃以下で保存してください。
- 4) ラベルに記載されている使用期限内に使用してください。
- 5) ロットの異なる試薬を混合して使用しないでください。

## 3. 廃棄上の注意

- 1) 検査終了後の検出ストリップや増幅産物は、キャリアオーバーコンタミネーションを起こす可能性がありますのですぐに廃棄してください。
- 2) 本製品を廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。
- 3) 検査に使用した器具や試薬等は感染の危険があるものとして適切に処理してください。
- 4) 本製品が漏出又は飛散した場合は、少量のときは吸水紙等で拭き取り、大量のときは水で洗い流してください。
- 5) 本製品にはアジ化ナトリウムが含有されています。アジ化ナトリウムは鉛、銅等と反応して爆発性の高いアジ化金属を形成することがあるので、廃液等は大量の水で流すよう注意してください。
- 6) 本製品の容器等は他の目的に転用しないでください。

## 【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法 : 2~10℃

有効期間 : 12ヵ月 (使用期限は容器ラベル及び外箱に表示)

## 【包装単位】

	製品名	管理コード	包装
抽出・増幅 試薬	核酸抽出試液	GP-8100	4 mL × 2
	NASBA試薬		10回分 × 2
	プライマー溶液		110 μL × 1
	NASBA酵素試薬		10回分 × 2
	NASBA酵素溶解液		60 μL × 1
	反应用チューブ		20本
検出試薬	検出ストリップ	GP-8200	1本 × 20
	展開液		2 mL × 1
	プレートシール		20枚

## 【主要文献】

- 1) Compton J : Nature, 350:91-92 (1991)
- 2) 宇治家武史 : 臨床化学, 36:19-24 (2007)

## 【問い合わせ先】

株式会社カイノス 学術部

〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18

☎ 03 (3816) 4480 FAX 03 (3816) 6544

製造販売元



株式会社カイノス

〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18 ☎ 03 (3816) 4485