

RiboNAT™ Rapid Sterility Test 取扱説明書

2025 年 9 月作成（第 1 版）

目次

1. 概要	P.1
2. ご使用の前に	P.2
3. 試験に必要なキットと保存条件	P.2
4. キット以外に必要なもの	P.3
5. キット内容	P.5
6. 試験ガイドライン	P.6
7. 操作方法	
Part 1. Pre-treatment	P.7
Part 2. RNA isolation	P.9
Part 3. Measurement	P.12
8. 結果の判定方法・解釈	P.14
9. 注意事項	P.15
10. 微生物添加サンプルの調製	P.15
11. 操作法動画	P.17
（Appendix）判定チェック表	P.18

【1. 概要】

本品は対象サンプル内の微生物の存在を迅速に検出するために設計された製品です。本試験で使用する試薬は、以下の3つの製品で構成されています。

- ・ RNA Isolation Kit 1：微生物の活性化と混入核酸を PCR 増幅不能な状態にします。
- ・ RNA Isolation Kit 2：微生物から RNA を抽出・精製します
- ・ Detection Kit：精製 RNA を One-step Reverse Transcription Real-time PCR（One-step RT-PCR）により検出します。

全体の操作は図1の通り3ステップからなります。Step 1 は、微生物を好気性と嫌気性の条件化で活性化させると共に、死菌由来 DNA および遊離 DNA を PCR 増幅不能な状態にします。続いて、Step 2 で、Enzyme Mix により、真菌や細菌の細胞壁を分解し、Proteinase K Solution により不要なタンパク質を分解します。本キットには精製、抽出工程で使用する DNase が入っており、この DNase を使用して中間と最終溶液に対して、二段階で DNA 分解処理を行います。RNA Isolation Kit 2 はヨウ化ナトリウム法をベースにした方法で試料中のタンパク質を変性させ、疎水性分子の水溶性を高めることで、核酸を溶液中に可溶化し、磁性粒子によって Total RNA の精製を行います。精製作業は室温で実施します。Step 3 では蛍光プローブ法を原理とした One-step RT-PCR によって Ribosomal RNA を検出します。本キットには抽出コントロール用の Internal Control RNA 溶液が梱包されています。これを抽出・精製工程で使用することにより、抽出・精製操作の成否を判定できます。

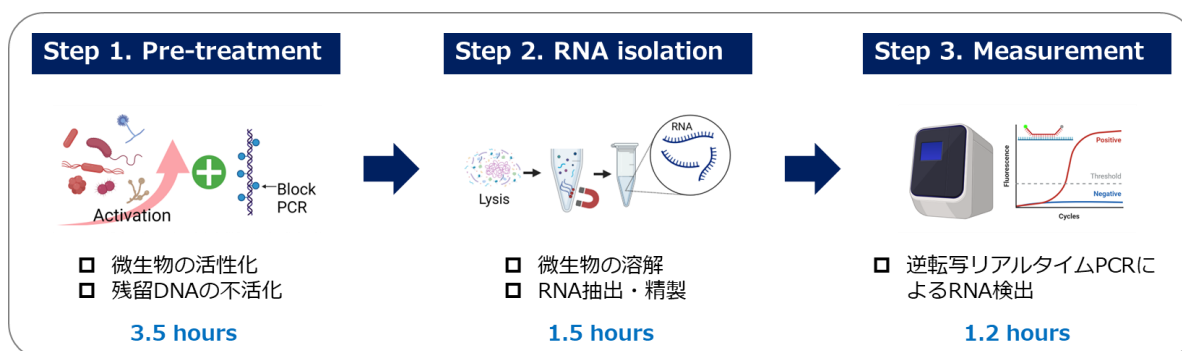


図 1. RiboNAT™ Assay Flow

Illustrations were created with BioRender.

RiboNAT™ の特長

- 微生物の Total RNA を抽出し Ribosomal RNA を検出
- 1 assay で細菌、真菌を広範囲に検出可能（定性試験）
- 短時間（7 時間）かつ高感度（9 CFU/mL）
- 偽陽性の抑制

【2. ご使用の前に】

- 現地の規制要件を遵守し、実験施設の取り決めに従い、安全性に留意して実験を行って下さい。
- 試験は手袋や保護メガネなどの保護具を着用して実施して下さい。
- 試験前には安全キャビネット内やピペットを RNase 除去剤および核酸除去剤を含むクリーンワイプでしっかりと拭いて徹底的に菌や核酸を除いてから行って下さい。
- 操作を行う際は、出来るだけコンタミネーションのリスクが低い場所を選んで作業を行って下さい。（抽出操作は安全キャビネット、PCR プレーットの調製はクリーンベンチもしくは安全キャビネットなど無菌環境で実施して下さい。別々の作業場所を設定できない場合、クロスコンタミネーションのリスクに留意して実験を行って下さい）
- 無菌操作技術を用いて試験を行って下さい。
- 操作時に安全キャビネット内に手や備品を入れる場合は RNase 除去剤および核酸除去剤で良く拭いてから行って下さい。
- RT-PCR 完了後の反応プレートはシールを剥がして開封しないで下さい。使用されている環境を著しく核酸で汚染するリスクがあります。
- 操作法動画を公開しています。操作法動画を確認後、実験を行って下さい。

【3. 試験に必要なキットと保存条件】

コード No.	製品名	容量	保存条件
291-98401	RiboNAT™ Rapid Sterility Test – RNA Isolation Kit 1	50 回用	-20℃
297-98001	RiboNAT™ Rapid Sterility Test – RNA Isolation Kit 2	50 回用	室温 ($\leq 30^{\circ}\text{C}$)
293-98101	RiboNAT™ Rapid Sterility Test – Detection Kit	100 回用	-20℃

*1：アッセイには 3 製品全てが必要です。

*2：RNA Isolation Kit 1 に含まれる Enzyme Enhancer、1st-DNase Buffer (1)、Detection Kit に含まれる Water は室温で保管しても問題ありません。

<細胞懸濁液サンプルを使用する場合>

RNA Isolation Kit 1、2 は下記細胞種と細胞数で評価されています。異なる細胞種や、より多くの細胞を含む検体を使用する場合は、プロトコルの最適化が必要な場合があります。

参考値としてご使用ください。

- HEK293： 0.25×10^6 cells/mL (0.5×10^6 cells / 2 mL / assay)
- Mesenchymal stem cell (MSC)： 0.5×10^6 cells/mL (1.0×10^6 cells / 2 mL / assay)
- T-cell： 1.0×10^6 cells/mL (2.0×10^6 cells / 2 mL / assay)

【4. キット以外に必要なもの】

<機器>

- 卓上遠心機 (1.5 mL, 0.2 mL tube)
 - ブロックヒーター (37 - 95°C)、必要ソケット : 15 mL, 1.5 mL, 0.2 mL tube
 - ボルテックスミキサー
本書では Scientific Industries, Inc. の Vortex-Genie 2 を用いた場合で記載しています。
 - Magnet Stand (富士フイルム和光純薬 #299-36421 または同等品)
 - 遠心機と 1.5 mL tube ローター (必要遠心力 1,200 x g, 16,000 x g)
 - プレート遠心機 (上記遠心機でプレート遠心用ローターがあれば不要)
 - インキュベーター (60°C) もしくはウェーターバス (37°C)
 - Real-Time PCR 装置 (3 波長の検出フィルターが必要)
 - ① 515 - 530 nm (代表色素 : FAM)、② 675 - 690 nm (代表色素 : Cyanine 5)、
 - ③ 560 - 580 nm (代表色素 : HEX or VIC)
- 例) CFX96 System (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
Quant Studio® 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.)

<ピペット、消耗品>

- 電動マイクロピペット
本書では Eppendorf 社製の Xplorer® (50 - 1,000 µL, ブルー, #4861000040) の使用を想定して記載しています。操作に熟練すれば、4 チャンネルタイプ (Eppendorf Xplorer® plus Move It®, 4 チャンネル 50 - 1,200 µL, #4861000833) を推奨します。
- 電子式多機能ディスペンサーピペットとチップ (推奨)
例) Multipette® E3 電動連続分注器 (Eppendorf #4987000010)
 - Combitips® advanced 0.5 mL Biopur® (Eppendorf #0030 089 634)
 - Combitips® advanced 1.0 mL Biopur® (Eppendorf #0030 089 642)
 - Combitips® advanced 2.5 mL Biopur® (Eppendorf #0030 089 650)
 - Combitips® advanced 5.0 mL Biopur® (Eppendorf #0030 089 669)
- マイクロピペット (2 - 200 µL, 100 - 1000 µL, 1 - 10 mL の 3 サイズが必要)
- ピペットチップ / Nuclease フリー / フィルター付き
(参考サイズ : 1 - 20 µL, 20 - 200 µL, 1000 µL, 10 mL)
- Real-Time PCR プレートとプレートシール
例) <Bio-Rad 社 Real-Time PCR 装置 CFX96 適応>
 - プレート : Hard-Shell® ウェルスカート付き PCR Plates (#HSP9645)
 - シール : Microseal® B' シーリングフィルム (#MSB1001)<Thermo Fisher Scientific 社 Real-Time PCR 装置 QuantStudio 適応>
 - プレート : MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (#N8010560)
 - シール : MicroAmp™ Optical Adhesive Film (#4311971)
- RNase および核酸除去剤 : RNase Knockout (富士フイルム和光純薬 #181-03381) もしくは Sterile ProChlor (Stabilised Hypochlorous acid in purified water) (富士フイルム和光純薬 #636-47721)
- クリーンワイプ等

<保護具>

- ディスポーザブルラボコート
- ディスポーザブルグローブ
- ディスポーザブルマスク
- 保護メガネ
- ディスポーザブルキャップ

<設備>

- 安全キャビネット
推奨性能
 - ・ JIS 規格（JIS K3800）適合機種
 - ・ 集塵効率：0.3 μm 粒子（PAO）にて 99.99%以上
- 部屋の清浄度：ISO クラス 7 以下（推奨）

【5. キット内容】

RiboNAT™ Rapid Sterility Test - RNA Isolation Kit 1 (ik1)

構成品	キャップ色	容量
Proteinase K Solution	緑	700 µL×1
Enzyme Mix	赤	750 µL×1
DNase Solution	紫	380 µL×1
1st-DNase Buffer (1)	-	23 mL×1
2nd-DNase Buffer (2)	黄	180 µL×1
Activator Solution 1 (SCDM)	-	50 mL×1
Activator Solution 2 (TG)	-	50 mL×2
Enzyme Enhancer	-	50 mL×1
Nucleic Acid Inactivator	-	60 µL×1

RiboNAT™ Rapid Sterility Test - RNA Isolation Kit 2 (ik2)

構成品	キャップ色	容量
Lysis Buffer	-	6 mL×1
Lytic Enhancer	-	3 mL×1
Magnetic Beads	黒	1.5 mL×1
Binding Buffer	-	16 mL×1
1st-Wash Buffer (1)	-	45 mL×1
2nd-Wash Buffer (2)	-	45 mL×1
Elution Buffer	半透明	1.7 mL×3
Sample Tube	-	50 個×2
Elution Tube	-	10 個×1

RiboNAT™ Rapid Sterility Test - Detection Kit (dk)

構成品	キャップ色	容量
Detection Mix	-	1 mL×2
Water	青	1 mL×1
Positive Control RNA	-	400 µL×1
Internal Control RNA	白	1 mL×1

【6. 試験ガイドライン】

表 1. 試験項目

項目	内容	抽出数	PCR well 数
検査対象サンプル	プロトコルに従って RNA 抽出・検出を実施。 (好気性・嫌気性培養、各 1 mL 必要)	1	2
Positive Extraction Control (PEC)	全ての検体に Internal Control RNA (IC) を添加し、RNA 抽出・検出を実施。 <目的：RNA 抽出操作の適切性の確認>	-	-
Negative Extraction Control (NEC)	未使用の培地・洗浄液に IC を添加して、RNA 抽出・検出を実施。(好気性・嫌気性培養、各 1 mL 必要) <目的：RNA 抽出作業中のコンタミネーションが無いことの確認>	1	2
No-Template Control (NTC)	Detection Kit の Water を 4well に入れて測定。	0	4
PCR Positive Control (PC)	Detection Kit の Positive Control RNA を 4 well に入れて測定。	0	4
Full Run-Control* (任意)	検体に標準菌をスパイクして、RNA 抽出・検出を実施。 (好気性・嫌気性培養、各 1 mL 必要)	1	2
Total well			12*

*Full Run Control の実施は任意です。試験の実施形態によって設定して下さい。

【7. 操作方法】

- 操作法動画も参照して実験を行って下さい。
- 手順に初めて登場する試薬名の後ろに記載されている (ik1)、(ik2)、(dk) は、それぞれその試薬が含まれているキットを示しています。
 - ・ ik1 : RNA Isolation Kit 1
 - ・ ik2 : RNA Isolation Kit 2
 - ・ dk : Detection Kit

Part 1. Pre-treatment

<1-1: Medium preparation>

■試薬の溶解

- (1) Activator Solution 1 (SCDM) (ik1) (以下 SCDM と表記) と Activator Solution 2 (TG) (ik1) (以下 TG と表記) を 60°C のインキュベーターに 30 分置き融解して下さい。
- (2) 30 分後に転倒混和を 3 回行い、完全に融解されているか確認して下さい。

<ノート>

- ・ 融解が不十分な場合、再度 60°C インキュベーターに置き、10 分間隔で確認し、完全に融解させて下さい。
- ・ 60°C インキュベーターが無い場合、37°C のウォーターバスにて溶解して下さい。ウォーターバスを使用する場合、汚染防止のためパウチ等に入れて、ボトルが直接水に接触しないようにして下さい。

■Activator Solution 1 (SCDM) の調製

- (3) 溶解後、氷上で 20 分以上冷却して下さい。
- (4) 融解した SCDM は必要分を 15 mL 遠沈管に取り分けて、下記表 2 を参照して Nucleic Acid Inactivator (ik1) を所定量加えて下さい。
- (5) 3 回以上転倒混和を実施後に使用して下さい。

表 2. SCDM と Nucleic Acid Inactivator の混合例

	サンプル数			
	1	3	6	9
Activator Solution 1 (SCDM)	1.0 mL	3.0 mL	6.0 mL	9.0 mL
Nucleic Acid Inactivator	0.5 µL	1.5 µL	3 µL	4.5 µL

■Activator Solution 2 (TG) の調製

- (6) 溶解後、15 mL 遠沈管に使用量だけ取り分けて下さい
- (7) 遠沈管のキャップを緩めた状態で 95°C 10 分間加熱して下さい (脱気)。
- (8) その後、キャップを閉めて氷上にて 20 分以上冷却して下さい。
- (9) 下記表 3 を参照し、Nucleic Acid Inactivator を所定量添加し (Nucleic Acid Inactivator は 95 度加熱前に加えないこと)、3 回以上転倒混和後に使用して下さい。

※未加熱の溶液は再度-20℃で保存して下さい。

表 3. TG と Nucleic Acid Inactivator の混合例

	サンプル数			
	1	3	6	9
Activator Solution 2 (TG)	1.7 mL	5.1 mL	10.2 mL	15.3 mL
Nucleic Acid Inactivator	0.5 µL	1.5 µL	3 µL	4.5 µL

15 mL 遠沈管 1 本で作製できるのは 9 サンプル分。

<1-2: Test sample preparation>

- (10) 1 検体に対して Sample Tube (ik2) を 2 本準備して下さい (好気性、嫌気性培養用)。
Sample Tube の 0.2 mL 目盛りの所に油性ペンでラインを書いて下さい (図 2 参照)。
- (11) 検体をボルテックスした後、マークをした Tube に検体を 1 mL ずつ分注して下さい。
- (12) 油性ペンでラインをつけた側 (目盛りがある側) を遠心ローターの内側になるようにセットして下さい (図 3 参照)。
- (13) 集菌のため 1,200 x g、10 分、室温 (20 - 27℃) の条件で遠心して下さい。
- (14) ゆっくり遠心ローターごと安全キャビネット内に移して下さい。その後、マーカラインを手前に向けて Magnet Stand にゆっくり移し替えて下さい。(15) の操作が行いやすいため、Magnet Stand を使用することを推奨します。
- (15) Magnet Stand にセットしたまま、スクリーキャップを外して、電動マイクロピペットを用いて 0.8 mL 上清を除去して下さい。
※微生物を吸わないよう、マーカラインより下にチップがいかないように注意して下さい (図 4 参照)。電動ピペットの吸引速度は最も遅い設定を使用して下さい。

<電動マイクロピペットの設定>

- ・ Mode : Pip
- ・ 吸引スピード : 1 (最も遅い)
- ・ 排出スピード : 8 (最も早い)

<1-3: Pre-culture>

- (16) 各 Sample Tube に TG 1.5 mL もしくは SCDM 0.8 mL を加えて下さい。添加後に転倒混和を 3 回実施して下さい。*細胞懸濁液を使用する場合は、細胞塊が分散するように vortex して下さい。
- (17) ヒートブロックで 37℃、180 分以上インキュベーションして下さい。遮光するために安全キャビネット内のライトを OFF にして下さい。
- (18) Part 2 で使用する Enzyme Mix (+)の調製をします。Enzyme Mix Tube (ik1、キャップ色 : 赤) に Nucleic Acid Inactivator (ik1) を 8 µL 加えて下さい。37 度で 3 時間反応させ、反応後は氷上に置いて下さい。使用後は、-20℃以下で保存して下さい。使用前には転倒混和を 10 回行い、卓上遠心機でスピンドウンしてからご使用下さい。一度 Enzyme Mix(+)を調製したら、使い切るまで Nucleic Acid Inactivator を新たに足す必要はありません。(Enzyme Mix に

Nucleic Acid Inactivator を添加するのは一回のみ)

- (19) インキュベーション終了後に、マーカーラインを遠心ローターの内側になるようにセットして下さい。
- (20) 16,000 x g、2 分、室温 (20 - 27°C) の条件で遠心して下さい。
- (21) ゆっくり遠心ローターごと安全キャビネット内に移して下さい。その後、マーカーラインを手前に向けて Magnet Stand にゆっくり移し替えて下さい。(22) の操作が行いやすいため、Magnet Stand にセットします。
- (22) 電動マイクロピペットを用いて SCDM 添加 Sample Tube からは 0.8 mL、TG 添加 Sample Tube からは 1.5 mL 上清を除いて下さい。
- ※微生物を吸わないよう、マーカーラインより下にチップがいかないように注意して下さい (図 4 参照)。電動ピペットの吸引速度は最も遅い設定を使用して下さい。

<電動マイクロピペットの設定>

- ・ Mode : Pip
 - ・ 吸引スピード : 1 (最も遅い)
 - ・ 排出スピード : 8 (最も早い)
- (23) 検体ごとに、2 つの Sample Tube を 1 本にまとめます。SCDM 添加 Sample Tube 内に残った溶液に対してピペッティングを 10 回行った後、TG が入った Tube に溶液を移して 1 本にまとめて下さい。ピペッティングの際は、マーカーラインの反対の壁に菌が集積していることに注意して、吐き出す液をマーカーラインとは反対の壁にかけて、菌を回収するようにして下さい (図 4 参照)。

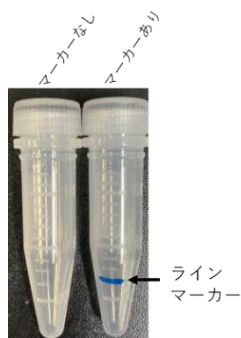


図 2. Sample Tube へのマーキング

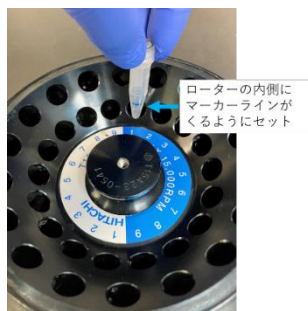


図 3. 遠心ローターへのセット

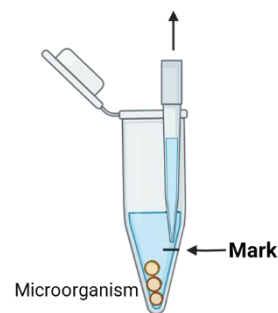


図 4. 菌のペレット

Part 2. RNA isolation

<2-1: Enzyme treatment>

- (24) 1 本に纏めたサンプルに Enzyme Enhancer (ik1) を 1 mL 加え、3 回転倒混和して下さい。
- (25) マーカーラインを遠心ローターの内側になるようにセットして下さい。

- (26) 16,000 x g、2 分、室温（20 - 27°C）の条件で遠心して下さい。
- (27) 電動マイクロピペットで 1.2 mL 上清を除去して下さい。1.2 mL 上清を除去した後、液面が 0.2mL のマーカーラインより上部にある場合は、マーカーラインまで上清を除去して下さい。最終サンプル量が 200 μ L -250 μ L になるようにして下さい。
- ※微生物を吸わないよう、マーカーラインより下にチップがいかないように注意して下さい。電動ピペットの吸引速度は最も遅い設定を使用して下さい。
- <電動マイクロピペットの設定>
- ・ Mode : Pip
 - ・ 吸引スピード : 1 (最も遅い)
 - ・ 排出スピード : 8 (最も早い)
- (28) Enzyme Mix (+) (キャップ色 : 赤) 15 μ L を添加し、ボルテックス (目盛り : 8) を 5 秒行っ
て下さい。
- (29) 卓上遠心機でスピンドウンして下さい。
- (30) ヒートブロックで 37°C、15 分処理して下さい。
- (31) 処理後に、以下の試薬を①②③の順に添加して下さい。*事前混合はしないで下さい。
- ① Proteinase K (ik1、キャップ色 : 緑) 13.5 μ L
- ② Lysis Buffer (ik2) 120 μ L
- ③ Lytic Enhancer (ik2) 60 μ L
- (32) ボルテックス (目盛り : 8) を 5 秒行い、卓上遠心機でスピンドウンして下さい。
- (33) ヒートブロックで 56°C、20 分処理して下さい。
- (34) インキュベーション中に、<2-2>で使用する DNase Mixture の調整をします。1st-DNase Buffer
(1) (ik1) と DNase Solution (ik1、キャップ色 : 紫) を下記表 4 に従い、必要量調製し、転倒混和
を 3 回以上行って下さい。使用するまでは室温（20 - 27°C）に静置して下さい。

表 4. DNase Solution と 1st-DNase Buffer (1) の混合例

	サンプル数							
	1	3	6	9	12	15	18	21
1st-DNase Buffer (1)	0.45 mL	1.4 mL	2.7 mL	4.1 mL	5.4 mL	6.8 mL	8.1 mL	9.5 mL
DNase Solution (キャップ色 : 紫)	5.6 μ L	17 μ L	34 μ L	50 μ L	67 μ L	84 μ L	101 μ L	118 μ L

<2-2: RNA isolation>

- (35) インキュベーション終了後に、以下の試薬を①②③の順に添加して下さい
- ① Internal control RNA (dk、キャップ色 : 白) *1 20 μ L
- ② Binding Buffer (ik2) 320 μ L
- ③ Magnetic Beads (ik2、キャップ色 : 黒) *2 30 μ L
- *1 : 室温（20 - 27°C）に 5 分以上置いて融解して下さい。融解後、ボルテックス（目盛り : 8）を 10 秒行い十分に攪拌してからご使用下さい。
- *2 : Magnetic Beads は沈殿しやすいため、使用する直前に転倒混和し、ボルテックス（目盛り : 10）を 20 秒行い十分に攪拌してからご使用下さい。

- (36) ボルテックス（目盛り：8）を 10 秒行って下さい。
- *細胞懸濁液を使用する場合は凝集しやすいため、より注意深く攪拌して下さい。
- (37) 室温（20 - 27°C）、5 分以上静置し、Magnetic Beads に核酸を吸着させて下さい。
- (38) 卓上遠心機でスピンドウンして下さい。
- (39) Magnet Stand にセットして（30 秒静置、集磁）、溶液を除いて下さい。
- (40) 一度 Magnet Stand から外して、卓上遠心機でスピンドウンして下さい。本操作は十分に溶液を除くために実施します。
- (41) Magnet Stand にセットして（15 秒静置、集磁）、溶液を除いて下さい。
- (42) Magnet Stand から Sample Tube を外して、(34)で調整した DNase Mixture 400 µL を加えて、そのまま 4 回以上ピペッティングを行い Magnetic Beads を分散させて、Tube ラックにおいて下さい。Magnet Stand にセットしないように注意して下さい。
- * 細胞懸濁液を使用する場合は、より丁寧にピペッティングしてください。
- (43) Tube ラック上で室温（20 - 27°C）、5 分以上静置して下さい。
- (44) Magnet Stand にセットして（30 秒静置、集磁）、溶液を除いて下さい。
- (45) Magnet Stand を Open（図 5 参照）にして電動マイクロピペット（Mode: P/M）で 1st-Wash Buffer (1) (ik2) 900 µL を添加して、十分に分散するように 4 回以上ピペッティングを行って下さい。
- <電動マイクロピペットの設定>
- Mode: P/M
 - 吸引スピード：4
 - 排出スピード：4
 - Cycle 数：4
- (46) Magnet Stand を Close（図 5 参照）にして（30 秒静置、集磁）、溶液を除いて下さい。
- (47) Magnet Stand を Open にして電動マイクロピペット (Mode: P/M) で 2nd-Wash Buffer (2)(ik2) 900 µL を添加して、十分に分散するように 4 回以上ピペッティングを行って下さい（電動ピペット設定は(45)と同様）
- (48) Magnet Stand を Close にして（30 秒静置、集磁）、溶液を除いて下さい。
- (49) 一度 Magnet Stand から外して卓上遠心機でスピンドウンし、再度 Magnet Stand にセットして 200P ピペットで溶液を除いて下さい。
- (50) 蓋を緩めて、60°Cのヒートブロックに 5 分間静置し、乾燥させて下さい。
- (51) Elution Buffer (ik2、キャップ色：半透明) 50 µL を加えて、ボルテックス（目盛り：10）で 5 秒攪拌して下さい。
- (52) 60°Cのヒートブロックに 5 分間静置し、Magnetic Beads から核酸を溶出して下さい。10 分以上は処理しないで下さい。
- (53) 溶出後に、卓上遠心機でスピンドウンし、Magnet Stand にセットして（30 秒静置、集磁）、溶液を Elution Tube (ik2) に回収して下さい。これを Extracted RNA solution とします。
- （ここで試験を止める場合は、Extracted RNA solution を -80°C以下で保存して下さい。）

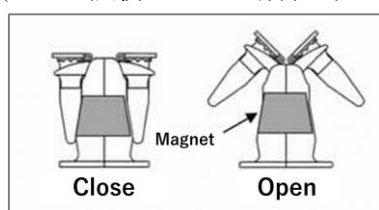


図 5. Magnet Stand の Open と Close の状態

（本図は当社 Magnet Stand（#299-36421）の図）

Part 3. Measurement

<3-1: DNase reaction②>

- (54) Extracted RNA solution に 2nd-DNase Buffer (2) (ik1、キャップ色：黄) 1 μ L と DNase Solution (ik1、キャップ色：紫) 1 μ L を添加して下さい。
(事前に 2nd-DNase Buffer (2)、DNase Solution を混合し、混合物を 2 μ L 添加しても問題ありません。)
- (55) ボルテックス (目盛り：8) を 5 秒行い、卓上遠心機でスピンドウンして下さい。
- (56) PCR 装置で、①37°C 5 分、②65°C 5 分、③4°C 1 分以上を行って下さい。
(本反応時間中に (59) を開始してください。)
- (57) 処理溶液を Final processed RNA solution とします。
- (58) -80°C以下で保存またはすぐに One-step RT-PCR を実施して下さい。

<3-2: Preparing assay plate>

- (59) Detection Mix (dk) を冷凍庫から取り出し、室温 (20 - 27°C) にて 10 分間静置、転倒混和 10 回、十分に融解していることをピペティングで確認後、使用して下さい。
※使用後は氷上には置かず、すぐに-20°C冷凍庫に保管して下さい。
- (60) Real-Time PCR プレートの使用する well に、先に Detection Mix を 20 μ L ずつ添加して下さい。
- (61) 次に、図 6 の番号に従って各溶液を添加して下さい。サンプルと NEC は N=2、NTC と PC は N=4 で測定して下さい。
- ・ Detection Mix 20 μ L
 - ・ サンプル 10 μ L
- Total 30 μ L/well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample		NEC	NEC		NTC	NTC
B	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample					NTC	NTC
C	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample				
D	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample				
E	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample			FRC	FRC
F	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample				
G	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample			PC	PC
H	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample			PC	PC

図 6. サンプルの添加参照図

- ① : No-template control (NTC) : Water (dk、キャップ色：青) : 10 μ L
- ② : Negative extraction control (NEC) : (Final processed RNA solution) : 10 μ L
- ③ : Sample : (Final processed RNA solution) : 10 μ L
- ④ : PCR positive control (PC) : Positive Control RNA (dk、キャップ色：無) : 10 μ L
※Positive control はクロスコンタミネーションを避けるため十分に注意して取り扱って下さい。参考例ではプレート手前の G, H の 11, 12 well を PC に当てています。
- ⑤ : Full run control (FRC) はオプションです。必要に応じて、菌体をサンプルに添加して抽出

した溶液を添加して下さい。

(62) プレートシールを貼り、ボルテックス、プレート遠心機でスピンドウンして下さい。

<3-3: Measurement>

■One-step RT-PCR 条件

1. 37°C 5 分
2. 95°C 10 秒
3. 65°C 10 分
4. 95°C 10 秒
5. 95°C 10 秒
6. 65°C 30 秒、蛍光撮影、5 - 6 を 37 回。

温度の昇降速度はデフォルト設定で行って下さい。

Thermo Fisher Scientific 社の QuantStudio® シリーズなどの機器は Passive reference に ROX を設定して下さい。

■設定波長

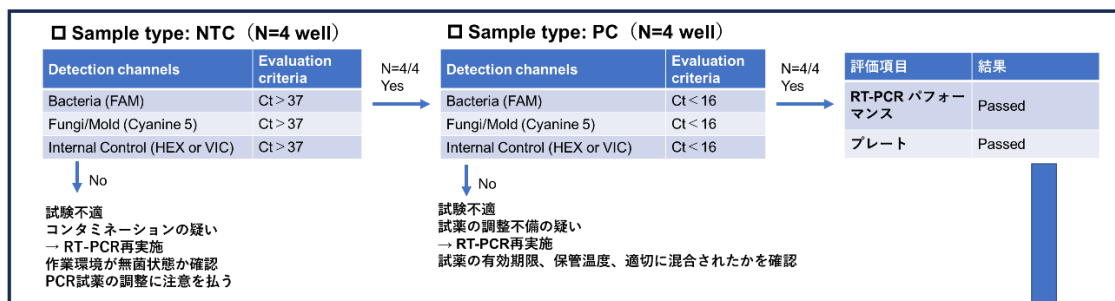
表 5. 各検出波長と遺伝子

検出対象	波長 (nm)	標的配列	色素の代表例
Bacteria	515 - 530	23S rRNA	FAM
Fungi/Mold	675 - 690	28S rRNA	Cyanine 5
Internal Control	560 - 580	Artifact RNA	VIC, HEX

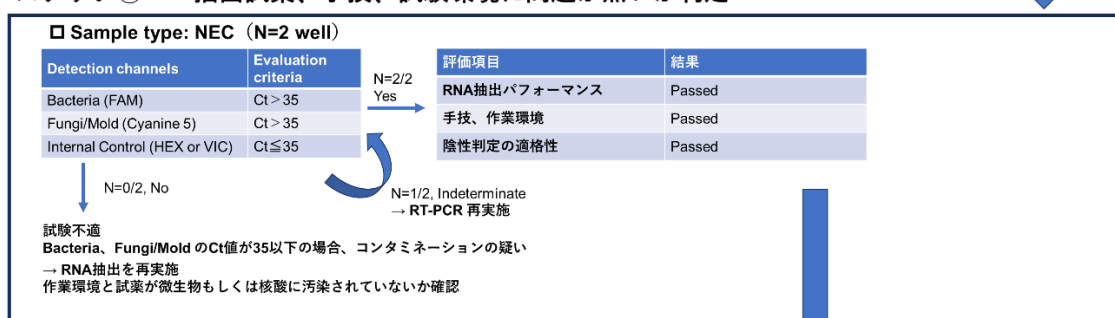
【8. 結果の判定方法・解釈】

以下のフロー図のステップに従い判定を行って下さい。

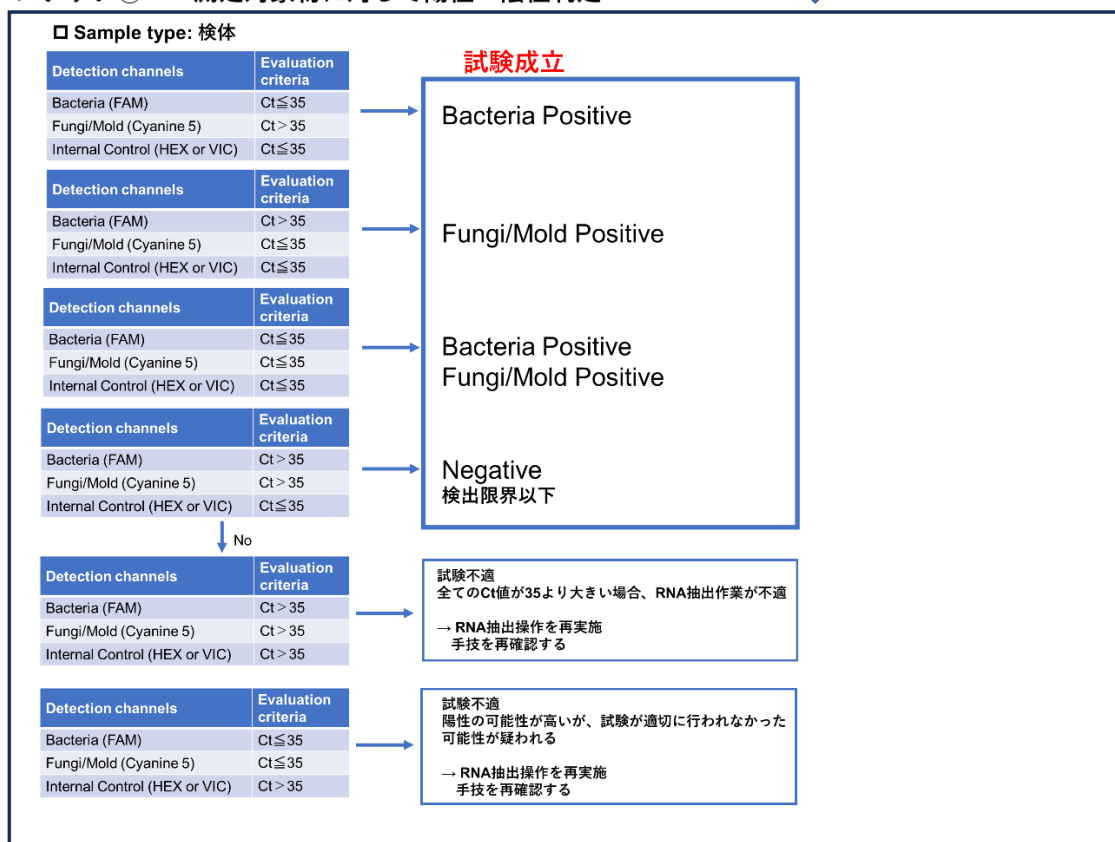
ステップ①： 検出試薬、プレート、手技、試験環境に問題が無いか判定。



ステップ②： 抽出試薬、手技、試験環境に問題が無いか判定



ステップ③： 測定対象物に対して陽性・陰性判定



* Quant Studio®シリーズでは Threshold 値を下記に設定して下さい。

FAM : 0.8、Cyanine5 : 0.8、VIC : 0.2

* 準備したサンプルにつき 2 well 測定しますが、2 well 共に同じ結果にならない場合は再度 RT-PCR を行って下さい。それでも判定できない場合、再度 RNA 抽出・精製から試験を行って下さい。

【9. 注意事項】

＜判定結果について＞

判定基準は下記の Real-Time PCR 装置に対して設定されています。各 Ct 値は使用する Real-Time PCR 装置によって変動するため、ご使用の機器で検証して下さい。検証方法は別途お問い合わせ下さい。

機器名：Quant Studio® 5 Real-Time PCR System

メーカー：Thermo Fisher Scientific Inc.

機器名：CFX96 System

メーカー：Bio-Rad Laboratories, Inc

＜廃棄上の注意＞

検証試験として微生物をサンプルに添加した際は、使用した Sample Tube などはオートクレーブ処理を行い滅菌して下さい。反応後の PCR プレートはシールを剥がさず密封したまま廃棄して下さい。廃棄物の処理に関する法律に従い、医療廃棄物、産業廃棄物、または感染性廃棄物として処理して下さい。

【10. 微生物添加サンプルの調製】

バリデーション試験、性能試験に使用する微生物懸濁液の作製方法について記載します。

各菌数濃度の溶液を作製する際は段階希釈を行わず、直接、設定する菌数濃度の溶液を作製して下さい。ここでは、バイオメリユー・ジャパン株式会社の BIOBALL®を使用して 3、9、99 CFU/mL 溶液の作製方法例について記載します。使用する菌株はお客様自身でストックされている物でも構いません。市販されている標準菌株の製品例を下記に記載します。

＜市販標準菌株＞

- ・ Microbiologics, Inc. EZ-Accu Shot™, EZ-CFU™ One Step など
- ・ バイオメリユー・ジャパン株式会社 BIO-BALL®

＜調製方法＞

1. 遠沈管に、検体を必要量加えます。
2. 必要菌数の菌量を加えます（表を参照）。
3. 30 秒静置し、ボルテックス（目盛り：8）で 5 秒攪拌して下さい。
4. これを菌添加溶液とします。

*すぐに使用しない場合は、使用直前にボルテックス（目盛り：8）で 2 秒攪拌してから、Sample Tube へ分注して下さい。

試験をする際の組み合わせ例を記載します。

組合せ① *Candida albicans*、*Bacillus subtilis subsp spizizenii*

組合せ② *Clostridium sporogenes*、*Aspergillus brasiliensis*

組合せ③ *Staphylococcus aureus*

組合せ④ *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa はクロスコンタミネーションが生じやすいため、注意して取扱下さい。

■ 表 6. 3 CFU/mL 菌濃度の調液例

抽出数	1	2	3	4	5	6	7	8
必要液量 (mL)	2.2	4.4	6.6	8.8	11	13.2	15.4	17.6
BIOBALL 30 CFU (個)	1	1	1	1	2	2	2	2
菌数 (CFU)	30	30	30	30	60	60	60	60
検体 (mL)	9.8	9.8	9.8	9.8	20	20	20	20
菌数濃度 (CFU/mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
使用する遠沈管サイズ (mL)	15	15	15	15	50	50	50	50

■ 表 7. 9 CFU/mL 菌濃度の調液例

抽出数	1	2	3	4	5	6	7	8
必要液量 (mL)	2.2	4.4	6.6	8.8	11	13.2	15.4	17.6
BIOBALL 30 CFU (個)	1	2	3	3	4	5	5	6
菌数 (CFU)	30	60	90	90	120	150	150	180
検体 (mL)	3.3	6.6	9.9	9.9	13.3	16.7	16.7	20.0
菌数濃度 (CFU/mL)	9	9	9	9	9	9	9	9
使用する遠沈管サイズ (mL)	15	15	15	15	50	50	50	50

■ 表 8. 99 CFU/mL 菌濃度の調液例

抽出数	1	2	3	4	5	6	7	8
必要液量 (mL)	2.2	4.4	6.6	8.8	11	13.2	15.4	17.6
BIOBALL 550 CFU (個)	1	1	2	2	3	3	3	4
菌数 (CFU)	550	550	1100	1100	1650	1650	1650	2200
検体 (mL)	5.6	5.6	11.1	11.1	16.7	16.7	16.7	22.2
菌数濃度 (CFU/mL)	99	99	99	99	99	99	99	99
使用する遠沈管サイズ (mL)	15	15	15	15	50	50	50	50

【11. 操作法動画】

製品 Web ページより操作法動画をご覧ください。下記 URL／QR コードから直接アクセスするか、当社試薬ホームページにて、製品コード No.で検索して下さい。



<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0129-9840.html>

富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号

●北海道営業所 ●東北営業所 ●筑波営業所 ●横浜営業所
●東海営業所 ●中国営業所 ●九州営業所

試薬URL : <https://labchem-wako.fujifilm.com>

【判定チェック表】

結果判定のためのチェック表としてご使用下さい。

No.	ステップ1： PCRの成否、プレート、手技、試験環境の可否を判定	検出色素	N=1： Ct or Cq	N=2： Ct or Cq	N=3： Ct or Cq	N=4： Ct or Cq	基準	チェック
1	Waterを4 well測定し、4 well共に3波長のCt or Cqが基準に適合しているか？	FAM					Ct>37	<input type="checkbox"/>
		Cyanine 5					Ct>37	<input type="checkbox"/>
		HEX or VIC					Ct>37	<input type="checkbox"/>
2	Positive Controlを4 well測定し、4 well共に3波長が増幅し、Ct or Cqが適合しているか？	FAM					Ct<16	<input type="checkbox"/>
		Cyanine 5					Ct<16	<input type="checkbox"/>
		HEX or VIC					Ct<16	<input type="checkbox"/>

No	ステップ2： 抽出試薬、手技、試験環境に問題が無いか判定	検出色素	N=1： Ct or Cq	N=2： Ct or Cq	N=3： Ct or Cq	N=4： Ct or Cq	基準	チェック
3	Negative Extraction Control (NEC) を2 well測定し、2 well共に基準を適合しているか？	FAM					Ct>35	<input type="checkbox"/>
		Cyanine 5					Ct>35	<input type="checkbox"/>
		HEX or VIC					Ct≤35	<input type="checkbox"/>

No.	ステップ3： 測定対象物に対して陽性・陰性判定	検出色素	N=1： Ct or Cq	N=2： Ct or Cq	口細菌陽性	口真菌陽性	口細菌真菌陽性	口陰性
4	測定サンプルを2 well測定し、2 wellのCt or Cq値で判定してください。	FAM			Ct≤35	Ct>35	Ct≤35	Ct>35
		Cyanine 5			Ct>35	Ct≤35	Ct≤35	Ct>35
		HEX or VIC			Ct≤35	Ct≤35	Ct≤35	Ct≤35