

Technical Data

ベンチトップ型リアルタイムPCR装置における FastGene™ VT1/VT2 Detection Kit 評価試験

評価製品

 FastGene™ VT1/VT2 Detection Kit
 (Cat.No. FG-VT-16, FG-VT-96)

メーカー名

FastGene™



実験概要

FastGene™ VT1/VT2 Detection Kitは、モバイル リアルタイムPCR装置 PicoGene® PCR1100と組み合わせることで、食中毒の原因となる腸管出血性大腸菌の毒素（ペロ毒素（Vero toxin: VT））であるVT1、VT2を迅速に検出することができるキットである。

PicoGene® PCR1100向けに開発したキットではあるが、他のリアルタイムPCR装置でも使用することが可能であれば、サンプルをチューブに入れるだけで測定することができるため、検出の時間短縮が可能になると考えられる。

そこで、本資料ではFastGene™ VT1/VT2 Detection Kitをベンチトップ型リアルタイムPCR装置であるLightCycler96、QuantStudio5にて使用可能か検証を行った。

検証方法

- 使用キット : FastGene™ VT1/VT2 Detection Kit (FastGene / Cat.No. FG-VT-16, FG-VT-96)
- サンプル : VT1・VT2 遺伝子検出用セット（陽性 Ctrl 付）（日本遺伝子研究所 / Cat.No. 200203）の陽性Ctrlと同じ配列で合成したDNA（以下陽性コントロール）
弊社ラボで培養、DNA抽出を行ったDH5αコンピテントセルのゲノムDNA（以下gDNA）
- サンプル調製方法 : 陽性コントロールを、それぞれ10,000 copies/μL、1,000 copies/μL、100 copies/μL、10 copies/μLになるよう希釈し使用した
DH5αコンピテントセルのgDNAは、20,000 copies/μL、2,000 copies/μL、200 copies/μL、20 copies/μLになるよう希釈し使用した
- 使用装置 : LightCycler® 96 System（ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社 / Cat.No. 05815916001、以下LC96）
QuantStudio 5（Thermo Fisher SCIENTIFIC、以下QS5）
- 操作方法 : FastGene™ VT1/VT2 Detection Kitのチューブに、VT1・VT2陽性コントロール各1 μL、gDNA 0.5 μLの計2.5 μLを加え、合計17 μLとした
その後、キットのチューブのまま、それぞれの機器にてPCRを行った

反応プログラム

Step	Temp (°C)	Time (sec)	
Preincubation	95	15	• LightCycler 96 Channel : FAM / Red 610 / Cy5
Amplification	95	5	
	62	20	

x 45 cycles

※ QuantStudio 5は、解析時Passive Referenceを「Non」に設定する

製品紹介

FastGene™ VT1/VT2 Detection Kit (FastGene / Cat.No. FG-VT-16, FG-VT-96)

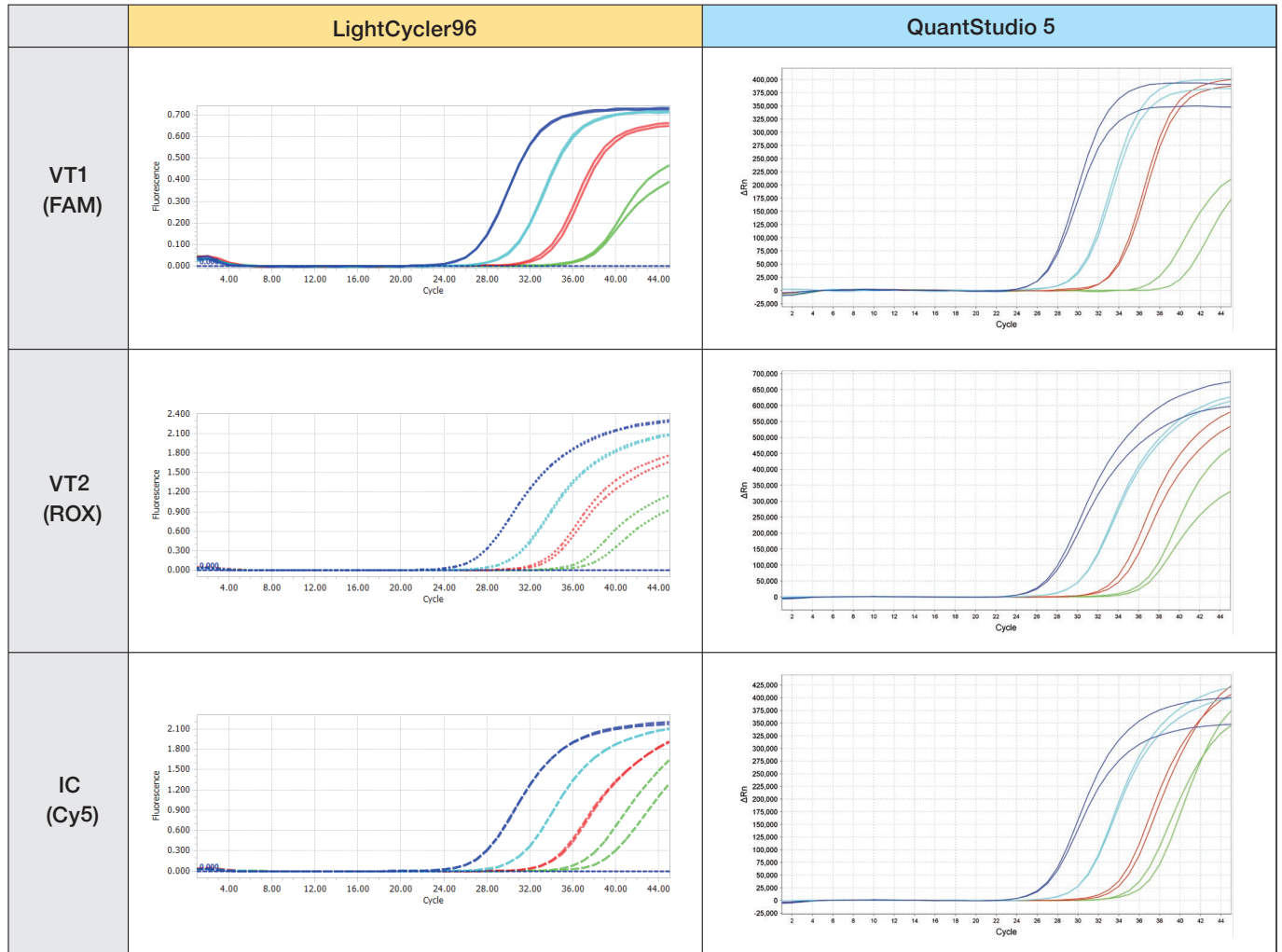
腸管出血性大腸菌による食中毒の原因遺伝子であるペロ毒素遺伝子（VT1、VT2遺伝子）を、リアルタイムPCR（PCR1100だけでなく通常のqPCR装置も含めて）により検出するためのキットです。

プライマー・プローブ配列は通知法通り（厚生労働省医薬食品局食品安全全部監視安全課長通知（平成26年11月20日））の物を使用し、蛍光はVT1をFAM、VT2をROX、ICをCy5で標識したマルチカラーディテクションキットとなります。1反応でペロ毒素遺伝子の検出はもちろん、VT1/VT2のタイピングまで可能です。

マスターミックスにはプライマー・プローブを混ぜて供給する為、ユーザーはDNAサンプルを混ぜるだけで測定可能なReady to Useタイプとなっております。

結果

増幅曲線



— 10,000 copies — 1,000 copies — 100 copies — 10 copies

Ct値

Quantity	VT1		VT2		IC	
	LC96	QS5	LC96	QS5	LC96	QS5
10,000	26.30	26.094	24.94	26.312	25.04	27.064
10,000	26.34	26.064	25.01	26.138	25.15	26.957
1,000	29.76	29.235	28.36	29.397	28.70	30.369
1,000	29.81	29.111	28.46	29.404	28.71	30.340
100	33.41	32.664	31.62	33.416	32.50	33.881
100	33.01	32.616	32.19	32.827	32.28	34.344
10	37.81	39.856	35.37	35.823	35.36	36.775
10	37.53	37.490	36.54	36.386	36.96	35.920

LightCycler 96、QuantStudio 5 とともに、10 copiesまで検出することが出来た

まとめ

FastGene™ VT1/VT2 Detection Kitは、LightCycler 96、QuantStudio 5でも使用できることが確認できた。

また、検出感度も10 copiesまで検出できることが確認できた。

これらより、FastGene™ VT1/VT2 Detection Kitは、PicoGene® PCR1100以外のリアルタイムPCR装置でも使用できると考えられる。