

検査試料の調製方法例

1 汚染菌数が少ない場合（増菌培養方法）

1) 食品の検査

試料10～25gに9倍量の食塩加トリプトソイブイオンを加え、ストマッカー等で細断し、35～37℃で24～48時間培養する。

培養液を検体として本キットで検査する。

本キットが陽性の場合、必要に応じて卵黄加マンニット食塩培地に培養液を塗抹し、黄色ブドウ球菌を分離する。

2) 食品の製造・調理環境の検査

ふき取り材料（ガーゼタンポン等）に食塩加トリプトソイブイオン10～100mlを加え、ストマッカー等で細断し、35～37℃で24～48時間培養する。

培養液を検体として本キットで検査する。

本キットが陽性の場合、必要に応じて卵黄加マンニット食塩培地に培養液を塗抹し、黄色ブドウ球菌を分離する。

2 汚染菌数が多い場合（直接検査法）

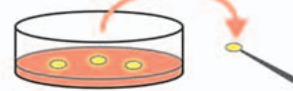
（例：食中毒が疑われる食品など）

試料に9倍量のりん酸緩衝希釈水を加えたもの（10%乳剤）を検体として、本キットで検査する。

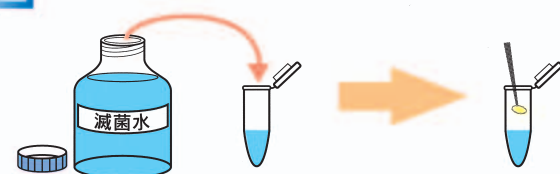
本キットが陽性の場合、必要に応じて卵黄加マンニット食塩培地に培養液を塗抹し、黄色ブドウ球菌を分離する。

寒天培地からの溶菌液調製方法

1 卵黄加マンニット食塩培地に生えた黄色ブドウ球菌と疑わしいコロニー（マンニット分解性：黄色化、集落周辺：白濁環）を滅菌爪楊枝又は白金耳で掻き取る。



2 マイクロチューブに滅菌水150μlを入れ、掻き取ったコロニーを懸濁する。



3 ①変性液25μlを加え、35℃～37℃で15分間放置後、②中和液25μlを加えて溶菌液とし、50μlを使用する。



取扱上の注意

- ロットの異なる試薬等を混合しないで下さい。
- 冷蔵保存（2～8℃）をして下さい。
尚、⑥conjugate濃縮液と⑦conjugate希釈液の混合液（BufferB）は、冷蔵で2ヶ月程度安定です。2ヶ月以上の保存（使用期限内まで）を希望される場合には、混合後は分注して冷凍保存して下さい。
- 試薬が目・手・皮膚についた場合、すばやく水道水で洗い流して下さい。
異常があれば医師の手当てを受けて下さい。
- 使用期限は箱の側面に記載しております。
- 本キットは臨床診断用ではありません。

操作方法に関するお問い合わせ先

株式会社 ファスマック
TEL 046-295-8787
FAX 046-294-3738

培地

1 食塩加トリプトソイブイオン

トリプトソイブイオン培地（栄研）30gと塩化ナトリウム75gを蒸留水1000mlに加え加温溶解後、121℃で15～20分オートクレーブ滅菌する。

2 卵黄加マンニット食塩培地

マンニット食塩培地（栄研）112gを蒸留水900mlに加え加温溶解後、121℃で15～20分オートクレーブ滅菌する。約50℃に保温し、50%卵黄液を100ml加え、滅菌シャーレに約20mlずつ分注する。

*50%卵黄液：鶏卵表面を逆性石けんやアルコール綿で消毒して、無菌的に卵黄のみ約20gを滅菌シリンダーか滅菌ビーカーに入れ、滅菌生理食塩水（0.85%NaCl）を約20ml（等量）加えてよく混合して均等液にする。

希釈液

リン酸緩衝希釈水

無水リン酸－カリウム34gを蒸留水500mlに溶解し、1N水酸化ナトリウムでpH7.2に調節する。蒸留水を足して総量を1000mlにする。121℃で15～20分オートクレーブ滅菌し、希釈原液として保存する。

保存している希釈原液1.25mlを蒸留水1000mlに加え、121℃で15～20分オートクレーブ滅菌し、希釈液として使用する。

製造元

株式会社 ファスマック

〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘5-1-3
TEL 046-295-8787
FAX 046-294-3738
E-mail: kakusan@fasmac.co.jp
http://www.fasmac.co.jp/

発売元

株式会社 科学飼料研究所

〒104-0032 東京都中央区八丁堀3-3-5
http://www.kashiken.co.jp/

【お問い合わせ先】

TEL 027-347-3223 FAX 027-347-4577

● 試薬リスト

DNA固相化ウェル	48ウェル
① 変性液	5ml×1
② 中和液	5ml×1
③ 陰性コントロール液	0.5ml×1
④ 陽性コントロール液	0.5ml×1
⑤ プローブ液	2.5ml×1
⑥ Conjugate 濃縮液	0.1ml×1
⑦ Conjugate 希釈液	5ml×1
⑧ 発色原液A	5ml×1
⑨ 発色原液B	1.5ml×1
⑩ ×200洗浄液	5ml×2

● 器具・器材の準備

- 保温器（35℃～37℃）
- 接着用テープ
- ウェル固定用フレームが浸かる洗浄用容器
- マイクロチューブ（PP製が望ましい）
- マイクロピペット：20～200μlがとれるもの
- マイクロチップ（滅菌済みが望ましい）

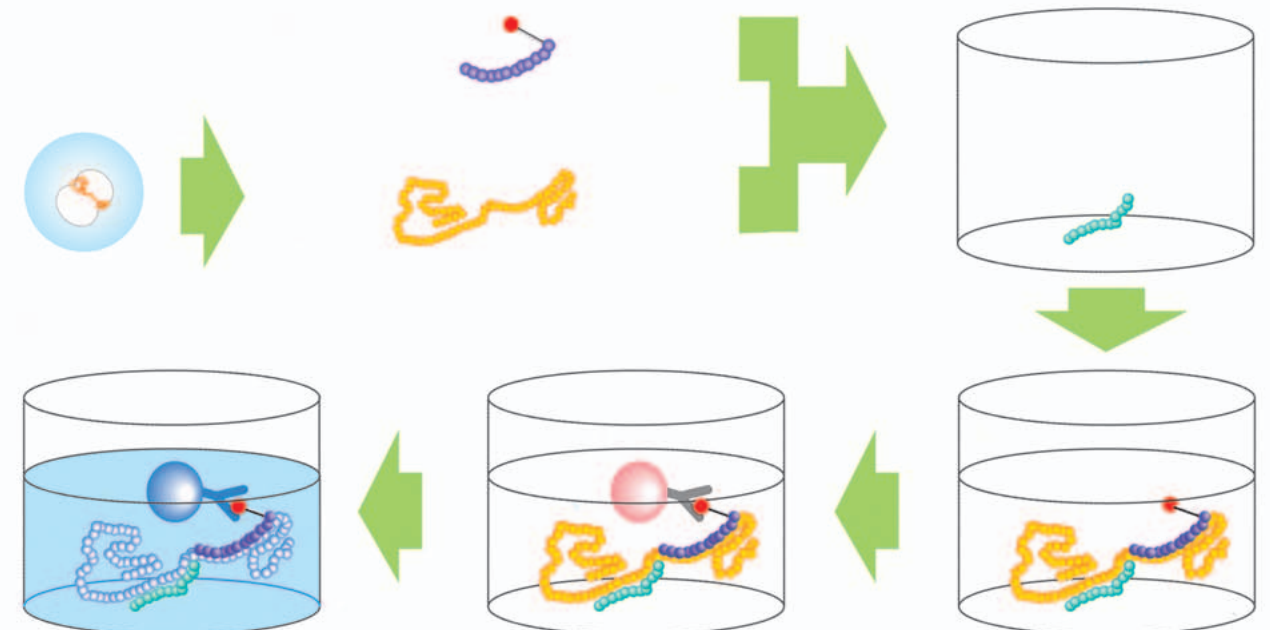
! ガラス製の試験管及び、ガラス製のピペットを用いると感度が下がりますので、使用しないで下さい。

使用前に必ず説明書を読み、
取り扱い上の注意・操作手順を守って使用してください。
異なるロットの試薬は使用しないでください。

核さんテスト
黄色
ブドウ球菌

食品検査用

DNAプローブ法による迅速黄色ブドウ球菌検査キット



操作手順

溶菌液の調製操作(操作1~4)の際に使用したマイクロチップは、消毒液に浸けるかオートクレーブ処理を行い、滅菌してから捨ててください。

ただし、調製後の操作(操作6以降)で使用したマイクロチップ等は滅菌の必要がありません。

また、同一試薬を固相化ウェルに分注するとき、ウェルの側面・底面等にマイクロチップの先が触れた場合は、新しいマイクロチップに換えて操作を続けてください。

操作 1 ①変性液をよく溶かし、マイクロチューブに50 μ lを入れる。



湯沸かし器などのお湯を使用し、完全に沈殿を溶解させて下さい。(完全に溶解すると透明な赤になります。) 使用後は冷蔵保存して下さい。

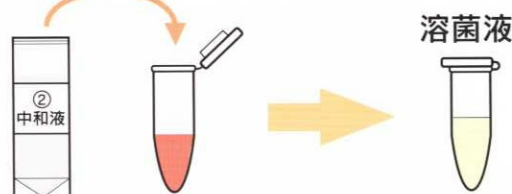
操作 2 よく攪拌した培養液を300 μ l採取してマイクロチューブ(操作1)に加える。



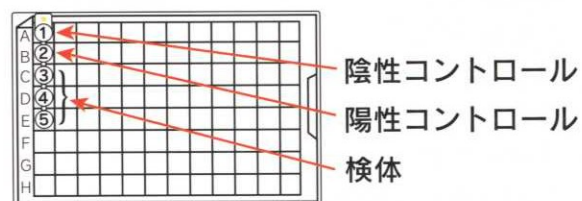
操作 3 マイクロチューブ(操作2)をよく攪拌した後、35 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ Cで15分間放置する。



操作 4 マイクロチューブ(操作3)に②中和液を50 μ l加えよく攪拌する。→この時、検体の溶液の色が多少変化する。

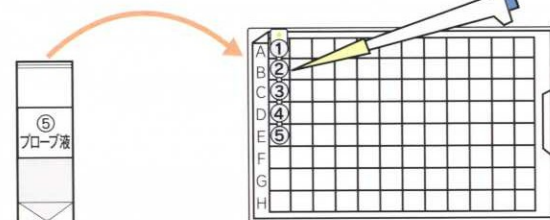


操作 5 添付のフレームからウェルを一旦取り外す。必要数のウェル(陰性コントロール+陽性コントロール+検体数)のみフレームにセットする。



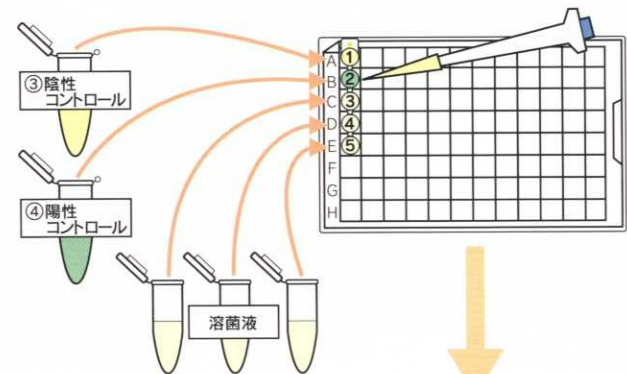
- ウェルのつなぎめを割って、切り離すことができます。
- 複数のレーンを使用する場合、レーンの間隔を必ずあけて下さい。
- 洗浄操作の際にフレームからウェルが外れる危険性があります。どのサンプルがどのウェルにあたるのかが分かる様あらかじめウェルの縁に印を打っておくとよいでしょう。

操作 6 セットした各ウェルに⑤プローブ液を50 μ l加える。



操作 7

- ③陰性コントロール液 50 μ l
- ④陽性コントロール液 50 μ l
- 3-5に各検体の溶菌液(操作4) 50 μ lずつを加える。



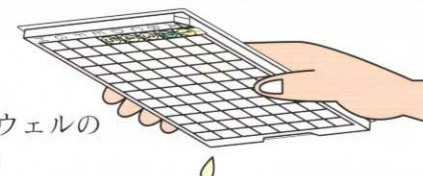
接着用テープでウェルをシールし、35 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ Cで1時間放置する。

操作 8 生理食塩水(0.85%NaCl) 1lに⑩ \times 200洗浄液1本分を全量加えて、Buffer Aを調製する。

- 洗浄液の組成は、0.05% Tween20/0.85% NaClです。キットには2リットル分入れてありますが、万が一不足した場合には、この組成で調製して下さい。調製後は、室温で3ヶ月安定です。(オートクレーブ等は不要です。)

操作 9

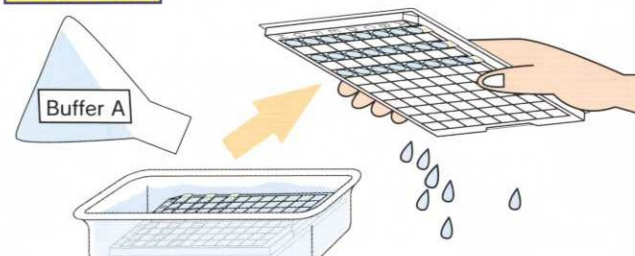
テープをはがし、ウェルの液を排水に捨てる。



操作 10

検体数に合った下記の洗浄操作を選んで、調製したBuffer A(操作8)でウェルを洗う。

多検体の場合

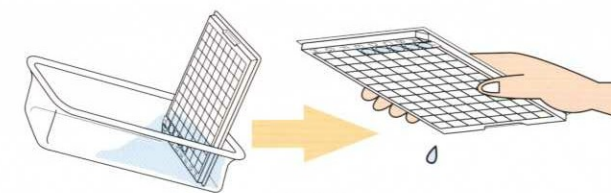


- 上図のように、洗浄用容器に調製したBuffer Aを加える。
- プレートごと洗ってウェルの中をBuffer Aで満たし、泡立るように数回揺らして洗う。
- ウェルに入ったBuffer Aを排水に捨てる。
- この(2)~(3)の操作を10回程度繰り返し行う。
- 洗浄操作後、ウェルを逆さにして乾いたペーパーなどの上にプレートごと数回叩きつけ、水分を拭き取る。
- 操作後、洗浄用容器に残ったBuffer Aは排水に捨てる。

- ウェル周辺に泡立ちが多い場合は、フレームからウェルが外れやすいので、精製水(蒸留水、イオン交換水)で泡を軽く洗い流してから上記の(5)と同様の操作を行って下さい。

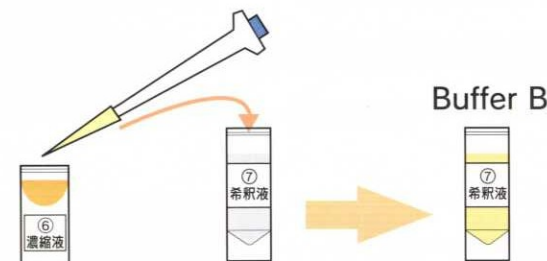
少検体の場合

洗浄用容器に調製したBuffer Aを少量加えて、洗浄用容器を傾けて上記の方法と同じように泡立るように洗浄する。



操作 11

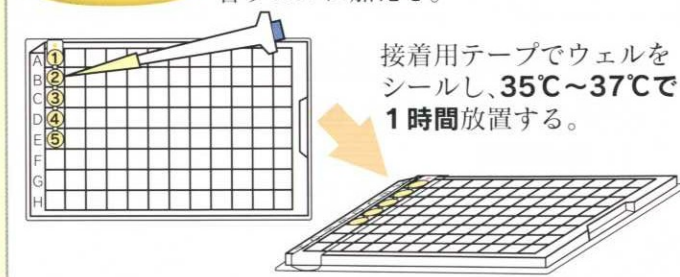
⑥ Conjugate濃縮液を⑦ Conjugate希釈液に全量加え、Buffer Bを調製する。→⑦に⑥を加えると黄色に変化する。



- ⑥の液量は少ないため、⑦に加える時はマイクロピペットを使用して下さい。
- ⑥の液量が少ない場合は、容器の蓋に試薬が残ることがありますので確認して下さい。また、濃縮が起こり液量が減る場合もあります。この場合、⑦の液で⑥の容器をともし洗いして使用して下さい。
- Buffer Bは、4 $^{\circ}$ Cで2ヶ月安定です。なお、凍結融解を繰り返さないように分注して冷凍保存を行えば、6ヶ月安定です。*

操作 12

調製したBuffer B(操作11) 100 μ lを各ウェルに加える。

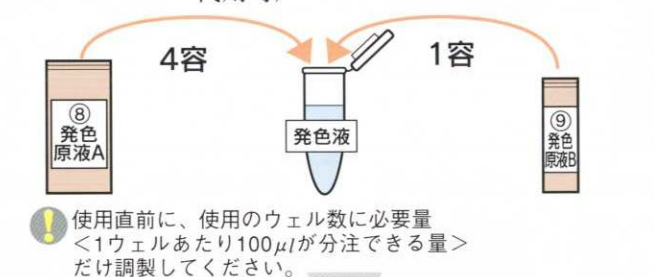


操作 13

テープをはがし、ウェルの液を捨て洗浄操作を行う。(洗浄方法は、操作9、10に同じ)

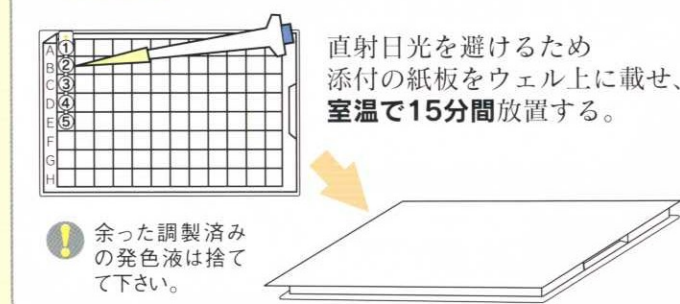
操作 14

⑧発色原液Aと⑨発色原液Bを4:1で混合する。(容器、チップ共にPP製を使用する。ガラス製の容器、ピペットでも代用可)



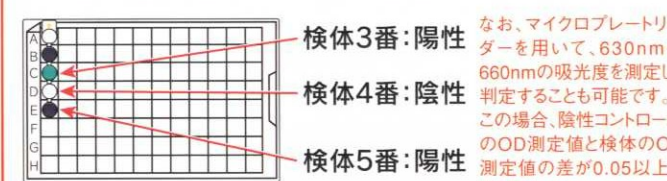
操作 15

使用直前に調製した発色液100 μ lを各ウェルに加え、添付の紙板を載せる。



判定

ウェルを添付の白紙板上に置き、目視で判定する。陰性コントロールより青色を呈するものを陽性とする。(下図の場合、検体3番と5番が陽性です。)



- 検体3番: 陽性
 - 検体4番: 陰性
 - 検体5番: 陽性
- なお、マイクロプレートリーダーを用いて、630nm~660nmの吸光度を測定し、判定することも可能です。この場合、陰性コントロールのOD測定値と検体のOD測定値の差が0.05以上を陽性とします。
- 直射日光が当たらない場所で判定して下さい。
 - 判定後のウェル中の発色液は、排水等に捨てます。また、使用したウェルはフレームから外し、一般用ゴミ又はプラスチック専用ゴミに捨てて下さい。
 - 未使用のウェルがある場合は、使用したフレームを水道水で軽く洗い、水分を拭き取ってから再使用して下さい。