

dPCR Microbial DNA Detection Assays

デジタルPCRによる微生物ターゲットー細菌、真菌、寄生虫、ウイルス、 抗生物質耐性遺伝子、病原性因子遺伝子ーの検出

dPCR Microbial DNA Detection Assaysは、デジタルPCRを使用して広範な微生物のターゲット領域を高精度・高感度に検出する加水分解プローブアッセイです。本製品はプライマーペアと1反応で最大5ターゲット領域のマルチプレックス検出を可能にする蛍光色素標識の加水分解プローブから構成されます。本製品はQIAcuity デジタルPCRシステム上でQIAcuity Probe PCR Kit (DNA 標的向け) またはQIAcuity OneStep Advanced Probe Kit (RNAまたはRNA+DNA標的向け) とともに使用します。

- 680以上のターゲット領域を同定
- 5種類の蛍光色素ーFAM™、HEX™、TAMRA、ROX™、Cy5®ーで1反応につき最大5種類のターゲット領域を検出
- QIAcuityデジタルPCRシステムのシンプルで迅速なワークフロー
- 1反応で微生物DNAとウイルスRNAを同時検出

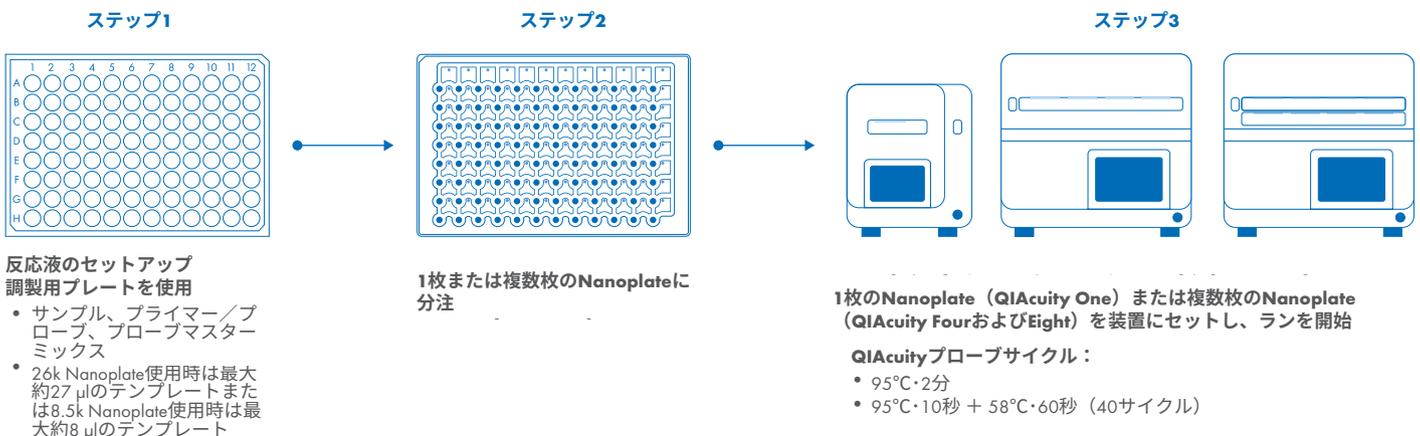


図1. 手作業を最小限に抑えた約2時間の微生物検出dPCR

図はNanoplate 8.5k 96-wellの使用例。より高感度な検出にはNanoplate 26k 24-wellの使用を推奨。



以下のサイトで仮想ワークフローを検討できます:

www.qiagen.com/applications/digital-pcr/workflow/qiacuity-demo

680以上の微生物のターゲット領域を高感度検出

dPCR Microbial DNA Detection Assaysの使用により、細菌、真菌、寄生虫、ウイルス、抗生物質耐性遺伝子、病原性因子遺伝子など680以上のターゲット領域を検出します(表1)。高感度のQIAcuity デジタルPCRシステムにより、メタゲノムサンプル、単離コロニー、その他のサ

ンプル中に非常に低いレベルで存在する微生物またはそれらの遺伝子の検出が可能です。効率化されたワークフローにより、手作業は最小限に抑えられ、わずか2時間で結果が得られます(図1)。

表1. dPCR Microbial DNA Detection Assaysでカバーされるターゲット

細菌	真菌	ウイルス	毒性および抗生物質耐性遺伝子
387ターゲット 例: <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Legionella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Mycobacteria</i> , <i>Mycoplasma species</i>	35ターゲット 例: <i>Aspergillus</i> 属, <i>Candida</i> 属, <i>Trichophyton</i> 属, <i>Fusarium</i> 属, <i>Microsporium</i> 属	46ターゲット 例: SARS-CoV-2 (N1, N2)、インフルエ ンザA&B、RSV、ノロウイルスGI、GII	202ターゲット 例: βラクタマーゼ、MDR排出ポンプ、フルオロキノロン耐性、毒素、微生物分泌系の構成要素、表面タンパク質



詳細な標的一覧については、技術情報をご覧ください:www.qiagen.com/TI_dPCR-microbial-detection

微生物のターゲット領域の正確な定量

QIAcuity デジタルPCRシステム上でdPCR Microbial DNA Detection Assaysを使用し、微生物のターゲット領域の定量性を評価するために *Shigella sonnei* 由来のゲノムDNAを含むNIST標準物質8376を定量しました。ターゲット遺伝子の測定濃度(コピー数/μl)は、

図2に示される予測濃度にほぼ一致しました。図3は2種類の細菌ターゲット—*Enterococcus faecalis*と *Shigella sonnei*—の0.4コピー/μlまでの4-logダイナミックレンジにおける定量値の直線性を示しています。

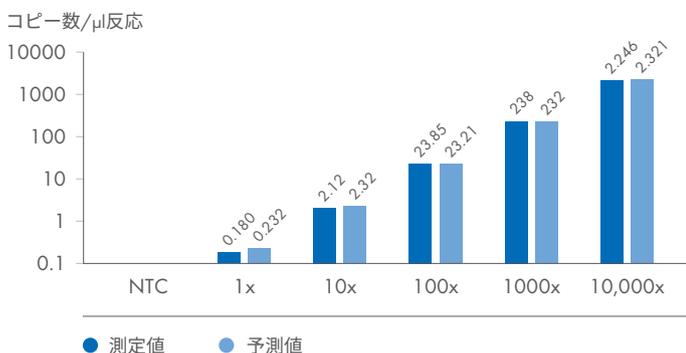


図2. 標準物質の正確な定量

*S. sonnei*由来のゲノムDNAを含むNIST標準物質8376を定量した。*S. sonnei*のシングルコピー遺伝子をターゲットとするdPCRアッセイでは、標準DNAテンプレートのすべての希釈(1x~10,000x)において予測値と合致する正確な定量性が示された。濃い青色の棒グラフは、3重測定から得られた測定コピー数/μlの平均値にエラーバーを付加した値を表し、各アッセイは26K 24-well Nanoplateを用いてQIAcuityデジタルPCRシステム上で実施した。

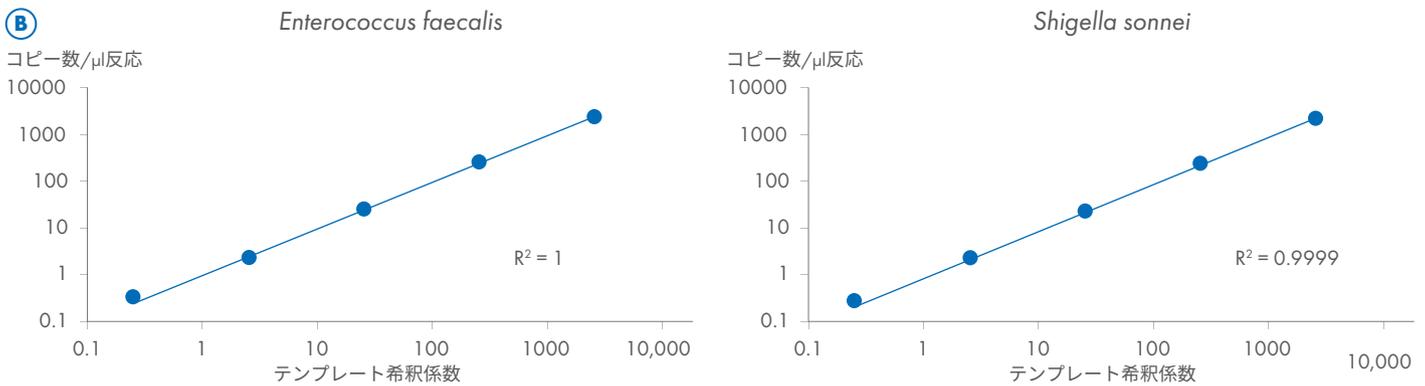
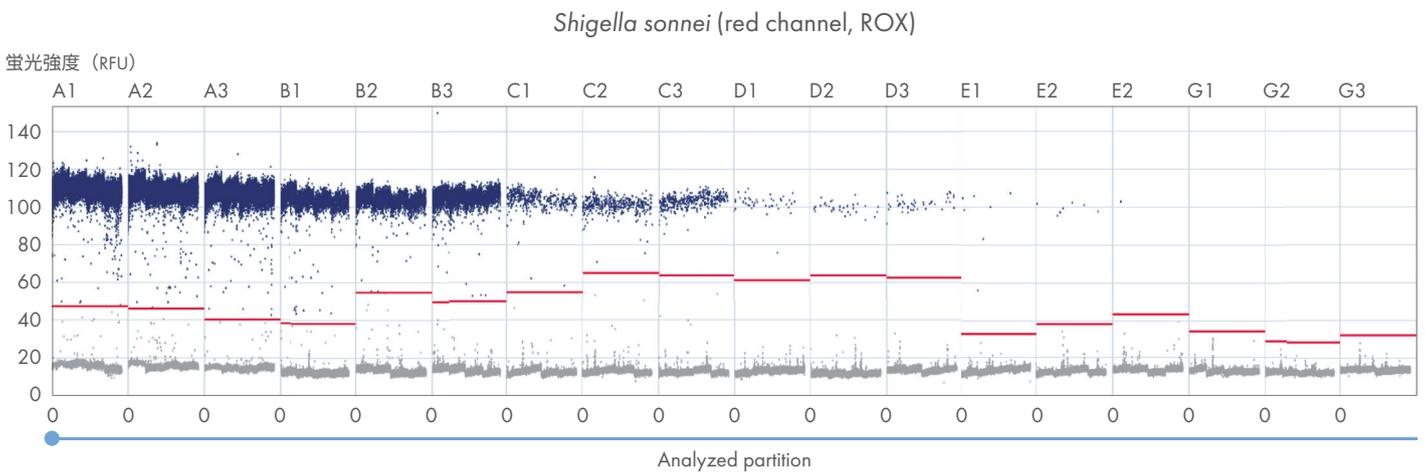
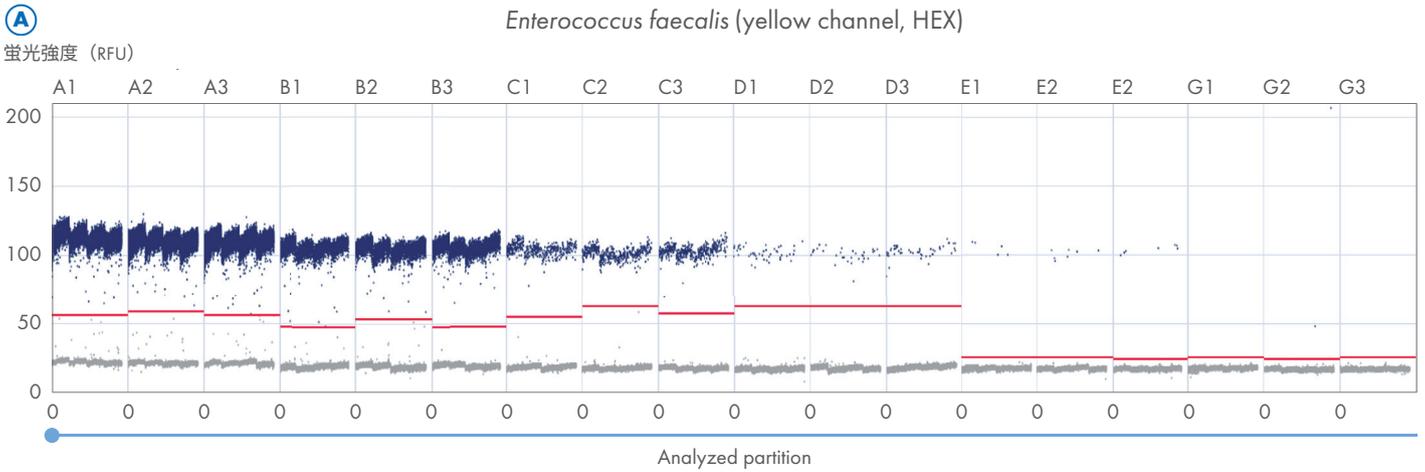


図3. ターゲット微生物の定量値の4-logダイナミックレンジの直線性

A ゲノムDNAをインプットテンプレートとして使用した*E. faecalis*と*S. sonnei*の5段階希釈のレプリケート (各3つ) およびテンプレートなしのコントロール (No Template Control, NTC) の1D Scatter Plot。

B 測定値 (コピー数/μl) の平均値をインプットテンプレートの希釈係数に対してそれぞれプロット。 R^2 値は、測定値とインプットテンプレートの希釈係数の間に強い正の直線関係を示す。dPCRはQIAcuity デジタルPCRシステム上で26K 24-well Nanoplateを使用して実施した。

シングルプレックスとマルチプレックスでの高精度で特異的な定量

複数の蛍光色素の組み合わせを選択することで1反応につき最大5種類のターゲット領域の定量が可能です。これにより、時間、コスト、貴重なサンプルを節約できます。個別のアッセイに比べNanoplateのウェルの使用を抑えられるため、スループットが向上します。さらに、さまざまな色素 (FAM、HEX、TAMRA、ROX、Cy5) を用いたシングルアッセイを組み合わせることで独自のマルチプレックスアッセイを組むことが可能です。ウェットラボで検証された5プレックスバンドルアッセ

イも入手可能です。検証済アッセイ以外の他の組み合わせについては、お客様が検証する必要があります。dPCR Microbial DNA Detection Assaysは、シングルプレックスでもマルチプレックスでも同等の結果が得られます (図4)。図5はマルチプレックスアッセイにおけるノイズに対する強いシグナルを示します。図6は5種類の水性感染微生物を1回のマルチプレックスアッセイで検出した結果です。

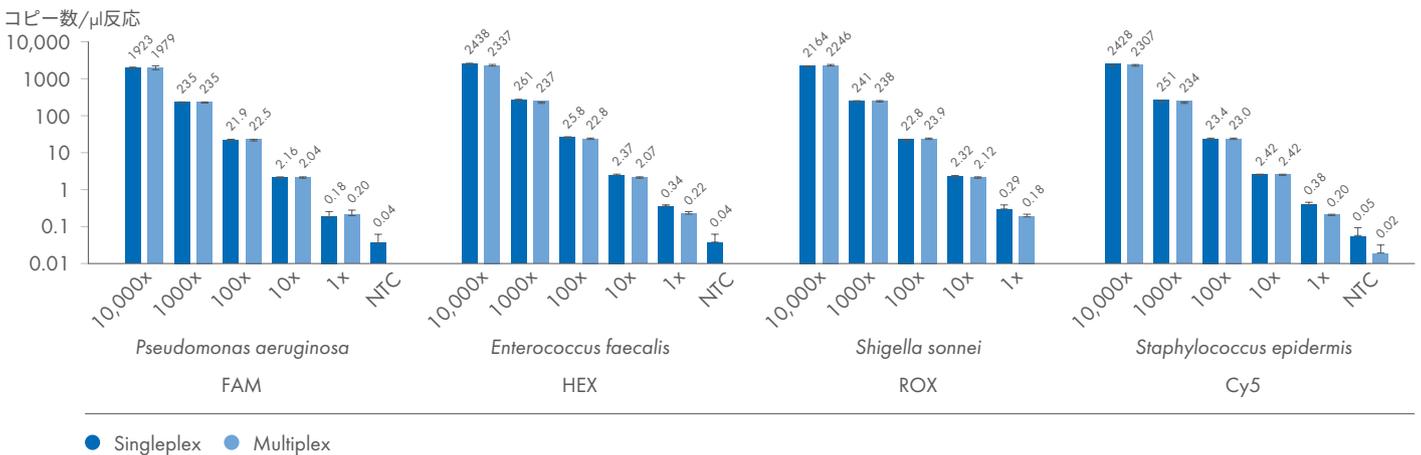


図4. 4種類の細菌標的を定量するシングルプレックスとマルチプレックスのセットアップ

同じテンプレートのゲノムDNA材料を使用して、シングルプレックスと4プレックスの反応で4つのアッセイを実施した。いずれのアッセイにおいても0.2~2500 コピー数/μlの濃度範囲で同等の濃度が認められた。QIAcuity デジタルPCRシステム上で26K 24-well NanoplateとQIAcuity Probe PCR Kitを使用し、各条件で3重測定によるdPCRを実施した。

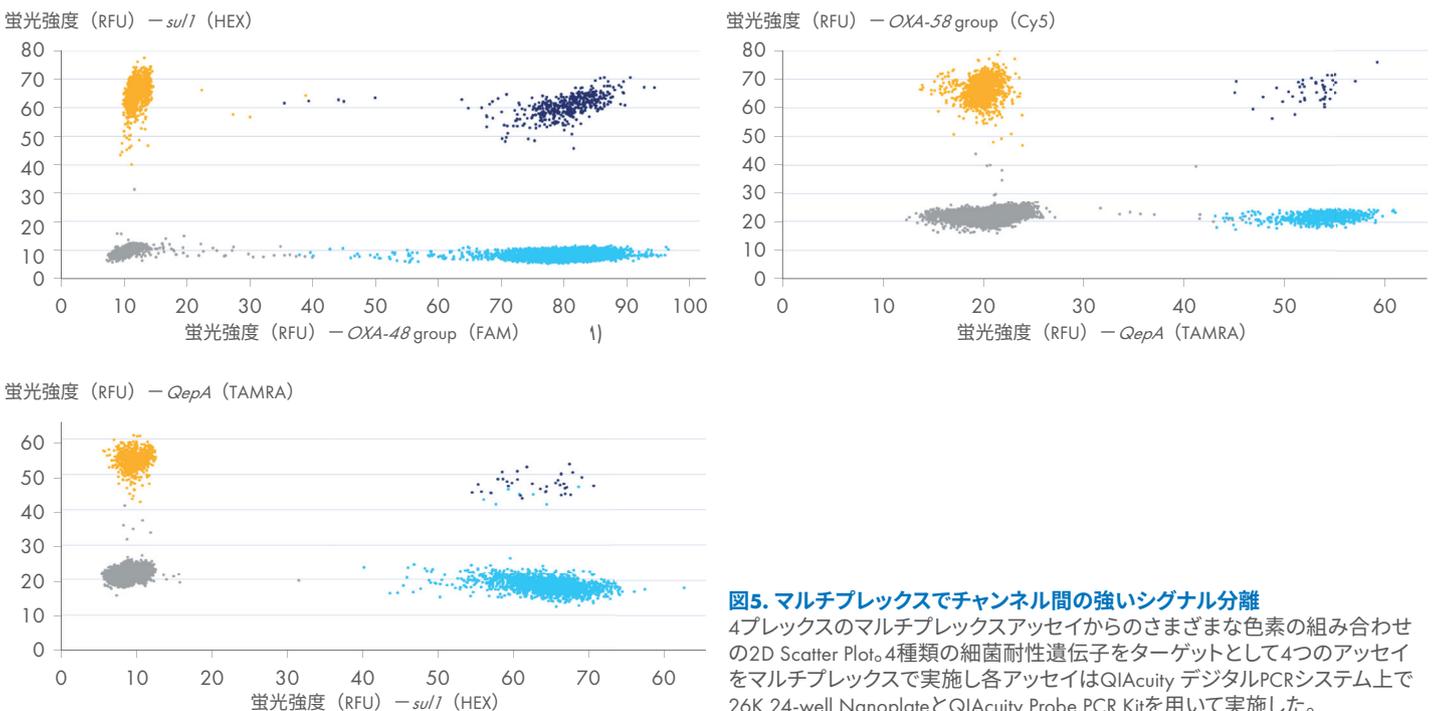


図5. マルチプレックスでチャンネル間の強いシグナル分離

4プレックスのマルチプレックスアッセイからのさまざまな色素の組み合わせの2D Scatter Plot。4種類の細菌耐性遺伝子をターゲットとして4つのアッセイをマルチプレックスで実施し各アッセイはQIAcuity デジタルPCRシステム上で26K 24-well NanoplateとQIAcuity Probe PCR Kitを用いて実施した。

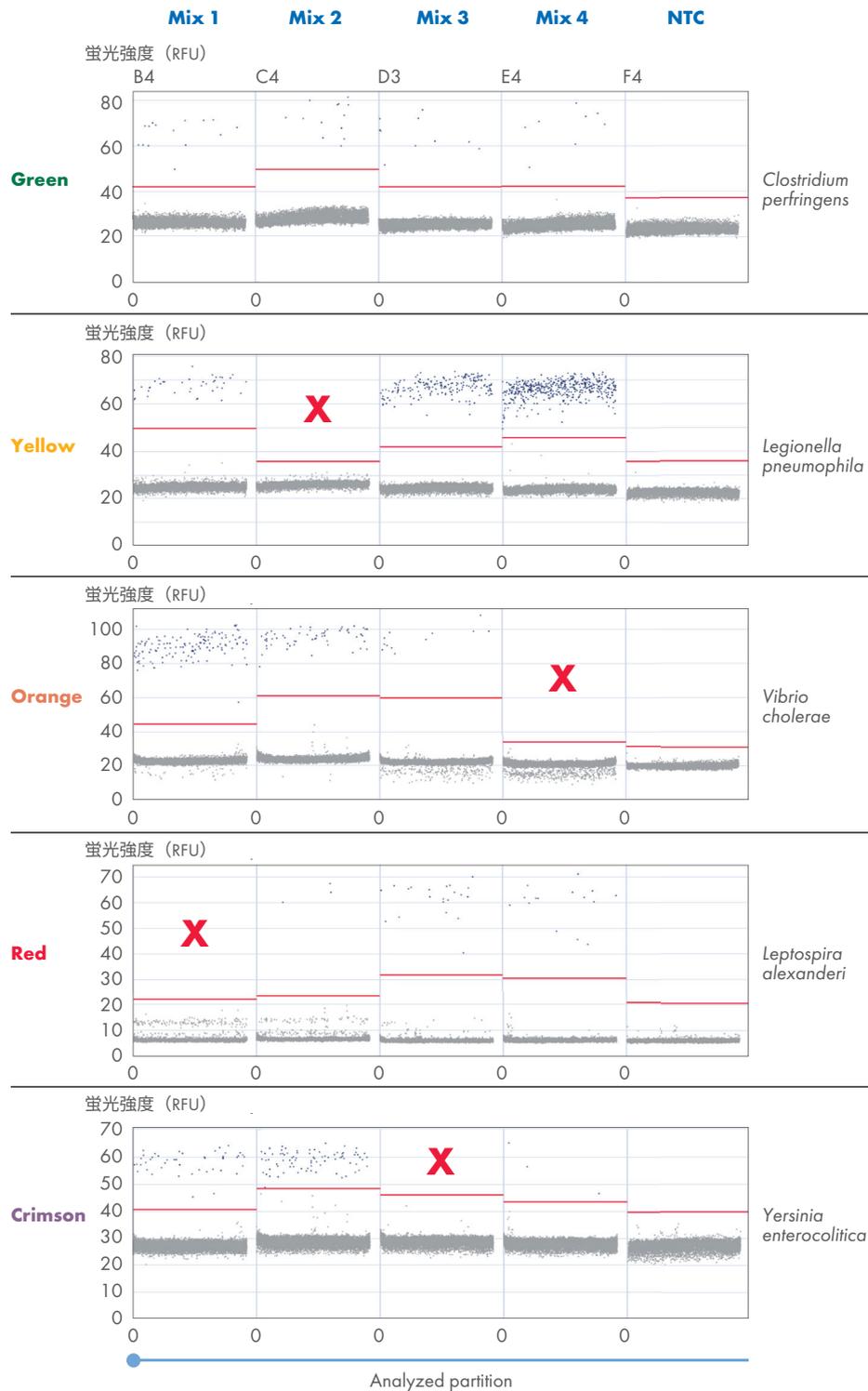


図6. 5 ブレックスでの水性感染微生物の検出

4つの異なるテンプレートミックスとテンプレートなしのコントロール (No Template Control, NTC) を用いた5反応の1D Scatter Plot。各gDNAミックスは、5種類の標的微生物のうち4種類に由来するgDNAをさまざまな量で含んでいる (赤い十字の印は、その反応液中に存在しない生物種を示す)。MIX1では *Leptospira* 属のテンプレートを欠く。MIX2では *Legionella* 属のテンプレートを欠く。MIX3では *Yersinia* 属のテンプレートを欠く。MIX4では *Vibrio* 属のテンプレートを欠く。各標的DNAは5ブレックス反応で正確に定量した。QIAcuity デジタルPCR システム上で8.5K 24-well NanoplateとQIAcuity Probe PCR Kitを使用し、各条件の3重測定でdPCRを実施した。

マルチプレックス反応でウイルスRNAと微生物DNAを同時に検出

dPCR Microbial DNA Detection AssaysとQIAcuity OneStep Advanced Probe Kitを併用して、1つのマルチプレックス反応でRNAターゲットまたはRNAターゲットとDNAターゲットを組み合わせて検出できます。これはDNAとRNAウイルスの同時検出などのアプリケーションにおいて特に有用です。図7は、マルチプレックスでの SARS-CoV-2 (N1) RNAターゲットと4種類の細菌ターゲット

の同時検出を示します。ウイルスターゲットのみの組み合わせも可能です。たとえば、SARS-CoV-2とインフルエンザまたはノロウイルスなどの組み合わせが可能です(データ非表示)。



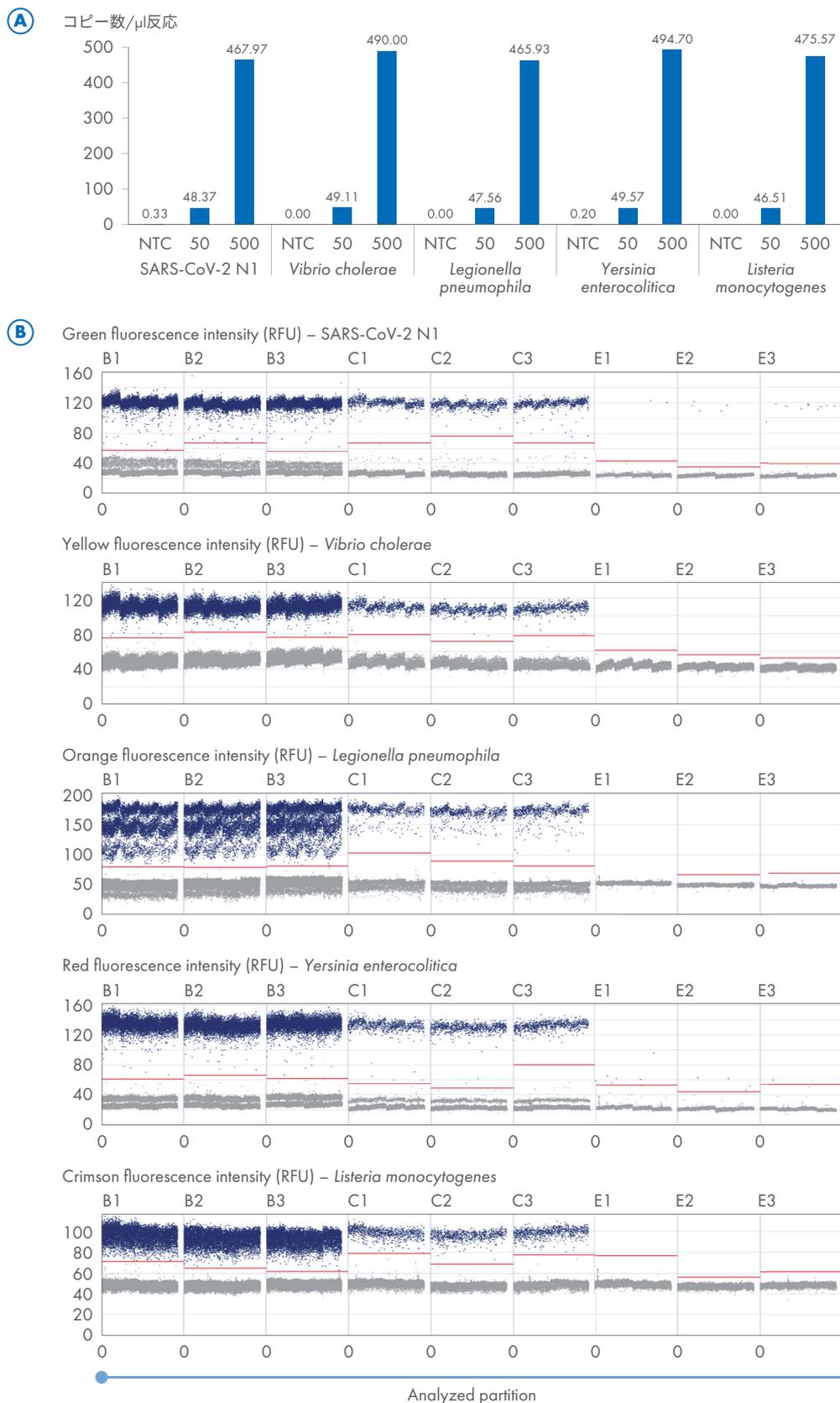


図7. RNAとDNAのマルチプレックス検出

4種類の細菌gDNA (*Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*) およびSARS-CoV-2 RNAの混合物をインプットとして使用した。QIAcuity Digital PCR システム上で26K 24-well NanoplateとQIAcuity OneStep Advanced Probe Kitを使用して、各条件3重測定でdPCRを実施した。500コピー/μlと50コピー/μlの2種類のテンプレート希釈を使用した。A 棒グラフは5種類のターゲットそれぞれの測定濃度(コピー数/μl)を示す。B 検出用に使用した5つのチャンネルの1D Scatter Plot。FAM (SARS-CoV-2 N1)、HEX (*Vibrio cholerae*)、TAMRA (*Legionella pneumophila*)、ROX (*Yersinia enterocolitica*)、Cy5 (*Listeria monocytogenes*)。

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.
dPCR Microbial DNA Detection Assays	One tube Microbial DNA dPCR Assay、40 µl反応で200 rxn (Nanoplate 26k)、12 µl反応で666 rxn (Nanoplate 8.5k)	250207*
QIAcuity Nanoplate 26k 24-well (10)	QIAcuity Nanoplate 26k 24-well x 10枚、Nanoplate Seals x 1枚	250001
QIAcuity Nanoplate 8.5k 24-well (10)	QIAcuity Nanoplate 8.5k 24-well x 10枚、Nanoplate Seals x 1枚	250011
QIAcuity Nanoplate 8.5k 96-well (10)	QIAcuity Nanoplate 8.5k 96-well x 10枚、Nanoplate Seals x 1枚	250021
QIAcuity Probe PCR Kit (1 ml, 5 ml, 25 ml)	1 ml, 5 ml, 25 ml Master Mix for QIAcuity、滅菌水	250101 250102 250103
QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit (1 ml, 5 ml)	1 ml, 5 ml OneStep Master Mix for QIAcuity、 RT Mix、Internal Control RNA、Enhancer GC、滅菌水	250131 250132

* 各アッセイIDについては、上記の表をご参照ください。完全なIDには選択いただく蛍光色素の情報が付加されます。

最新のライセンス情報と製品ごとの免責事項については、該当するQIAGENキットハンドブックまたはユーザーマニュアルを参照してください。QIAGENキットハンドブックとユーザーマニュアルは、www.qiagen.comから入手できます。QIAGENテクニカルサービス、または最寄りの代理店でも入手可能です。



アッセイの構成設定と発注については、以下のサイトをご覧ください：
geneglobe.qiagen.com/products/analysis-type/analysis-type-dpcr

最新のライセンス情報および製品ごとの免責事項に関しては、ウェブサイト www.qiagen.com の “Trademarks and Disclaimers” をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.com から入手可能です。

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAcuity® (QIAGEN Group).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更する場合がございます。予めご了承ください。
2302866 05/2022 © 2022 QIAGEN, all rights reserved.