

◆ ダイナビーズ anti-Salmonella の使用法**1. サンプルの準備**

- 1) フィルター付ストマッカーバッグにサンプル 25g を秤り入れ、前増菌培地 225mL を加えてホモゲナイズする。ストマッカーバッグごとにインキュベーターに入れ、前培養する。
 - DYNAL は前培養にはペプトン水を勧める。
 - フィルター付ストマッカーバッグを利用すると、残渣や脂肪を吸い込まずにサンプルを取る事ができる。
 - Swab で採取した環境サンプルは Swab を 10-50 mL の前培養培地に入れて培養する。
- 2) 前培養は 35-37°C で 18-24 時間行う。
- 3) 前培養したサンプルをホモジナイズしながらよく混ぜる。
- 4) あらかじめ、利用するマイクロ遠心チューブ、ピペットチップ等を滅菌しておく。サンプル毎にピペットを変える事。

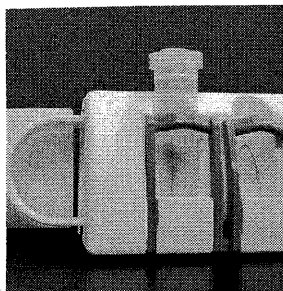
2. ビーズ法**【ダイナビーズの調製】**

- 1) ダイナル MPC-S の磁石板をはずし、1.5 mL マイクロ遠心チューブを必要な本数だけふたを開けて立てる。
- 2) Dynabeads anti-Salmonella のチューブをボルテックスを軽く掛けて、底にペレットが残らないように完全に懸濁させる。懸濁したダイナビーズを 20 μ L 取り、1) で用意した各チューブに分注する。チューブはあらかじめ滅菌しておく。チューブの蓋があまりきついものを利用すると蓋を開ける際に試料が飛び散る危険があるので注意する。

【Dynabeads anti-Salmonella と Salmonella の結合】

- 3) ストマッカー袋のろ過された部分から前増菌サンプルを 1mL 取り、各チューブに分注し、チューブの蓋をする。この時できるだけ脂肪などが入らないよう注意する。サンプル毎に、ピペットを変える事。
- 4) MPC-S のラックを 5 回反転させて、ビーズとサンプルを混合する。(サンプル毎にピペットを変える事) サンプルミキサー-MX-4 に MPC-S をセットし、回転させながら (18 rpm~20 rpm) 室温で **10 分間** インキュベーションする。サンプルミキサー-MX-4 を利用しない場合は全体がゆっくりと混ざり合っている状態にする。横揺れするだけの振盪器では混合効率が悪いので好ましくない。Dynabeads Salmonella とサンプルの反応時間が長すぎると非特異的な吸着が増え検出しにくくなることが考えられるので、15~30 分間とする。
- 5) インキュベーション後、MPC-S に磁石板を挿入し、ダイナビーズを回収するために 3 分間置く。この間 磁石を静かに数回反転させて、チューブの磁石側 (図 1) にダイナビーズの濃縮ドットペレットができるようにする。試料の種類によっては、集まってきたビーズがすべりやすく、反転する時にスナップをきかせると、力が加わり集まらないので、注意する。

図1 ビーズが集まる様子



- 6) チューブオープナーでチューブの蓋を開けず蓋の液を注意深く吸引除去し、次にチューブ内上清液を注意深く吸引除去する。(サンプル毎にピペットを変える事) この時濃縮されたダイナビーズを吸引しないよう気をつける。試料の種類によっては、液面が下がっていくのと同時にビーズがすべり落ちて行く場合がある。このような場合は上清をすべて除去せず、50~100 μ L程度残す。ビーズが充分集まらなと思われるときも同様に上清を少量残して置く。
- 7) MPC-Sの磁石板をはずし、洗浄バッファー(0.05% Tween 20、PBS pH 7.4)を1 mL加え、チューブに蓋をしてから、MPC-Sを反転させてビーズを再懸濁する。
- 8) ステップ5)~7)を繰り返す。
- 9) ステップ5)~6)を繰り返す。
- 10) 各チューブに洗浄バッファー100 μ L(分離平板培地2枚に蒔く場合)加え、チューブの蓋をしてボルテックスをかける。あるいは、磁石板の入っていないMPC-Sにたてて、MPC-Sを掌に軽くたたきつけるようにして上下に振り再懸濁させてもよい。

【洗浄バッファー調製方法】

- ・ 既製品を購入する場合: Sigmaより粉末パッケージで購入可能(製品番号 P3563)。1Lの水に溶かし、121 $^{\circ}$ C、15分間、オートクレーブ滅菌する。
- ・ 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と 0.1M NaH_2PO_4 を合わせ、pH 7.4に調整してストック溶液をつくる。このストック溶液100mlに5.4gのNaClと0.5gのTween 20を加え、水を加えて、1Lにする。121 $^{\circ}$ C、15分間、オートクレーブ滅菌を行う。

注) オートクレーブをかけると白濁したようになるが、しばらく置くと、透明にもどるのでそのまま使用する。試料によっては、洗浄溶液を加えてからビーズが集まりにくくなる場合がある。これは洗浄溶液に界面活性剤が入っていてビーズがすべりやすくなるためなので、5)の注意にあるように静かにあつめるよう注意する。分離平板培地3枚に蒔く場合は洗浄バッファーを100 μ Lではなく150 μ L加え懸濁させる。

3. 分離選択培地への塗布

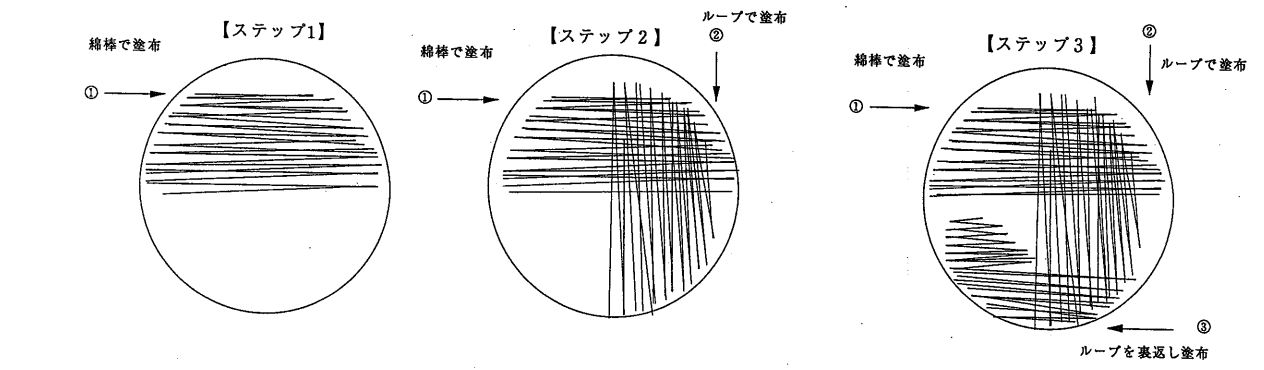
【全ての食品と環境サンプルに推奨する基本法】

- 1) 濃縮されたダイナビーズと菌の複合体を10mLのRVS(Rappaport Vassilliadis Soya peptone broth)に加え42 $^{\circ}$ Cで18-24時間インキュベートする。
- 2) 通常のサルモネラ分離法に従い、サルモネラ用分離平板培地にRVS培養液を画線塗布する。

【バックグラウンドが低い食品と環境サンプルに推奨する基本法】 (図2)

- 1) ダイナビーズと菌の複合体 50 μ L をピペットで取り、分離平板培地上半分のどこかに滴下する。分離平板培地は 2 種類用いる。(BGA, XLD, BSA, HE etc.)
- 2) Swab streak Method でビーズ菌複合体を選択培地に塗布する。加えたビーズ溶液を綿棒を左右に動かしながら分離平板培地の半分まで面棒で広げていく。綿棒を 20~30 往復させて広げる。(綿棒を往復させながら、半円の頂点から直径まで行きまた頂点までもどり、再度直径までもどる。)分離平板培地を 1/4 回転させて、ループを用い、左右に動かしながら分離平板培地の半分まで画線塗布する。ループを合計 20~30 往復させる。(ループを往復させながら、半円の頂点から直径まで行き、また頂点までもどり、再度直径までもどる。)分離平板培地をさらに 1/4 回転させて画線塗布し streak out する。
- 3) 35~37 $^{\circ}$ C で、18 ~24 時間培養する。

図 2 分離平板培地への塗布の仕方



4. 殻ツキ卵の場合の処理方法

- 1) 卵を流水で、ブラシを用いてよく洗い、ペーパータオルで水分を拭きとる。洗った卵を 70%のエタノールに 5-10 秒間浸した後、乾かす。(卵の汚染除去方法は他の標準的な方法を用いても良い。)
- 2) 無菌的に卵を割って、白身と黄身をよく混ぜる。硫酸鉄 (FeSO_4) を最終濃度 35 mg/L になるように加える。
- 3) 37 $^{\circ}$ C で 6 時間前培養する。
- 4) 前培養後、卵混合液をよく混ぜる。一部を採って、洗浄用バッファーあるいはペプトン水で 5 倍に希釈する。コンタミを防ぐために各サンプル毎にピペットを変える。
- 5) 希釈していない卵混合液の残りを 37 $^{\circ}$ C で一晩培養する。(疑陽性になった時のために増菌しておく。)
- 6) ダイナル MPC-S の磁石板をはずし、必要な本数ふたを開けたマイクロ遠心チューブを立てる。
- 7) 各マイクロ遠心チューブに Dynabeads anti-Salmonella を 40 μ L ずつ加える。コンタミを避けるため、ピペットでチューブを触らないよう注意する。
- 8) 希釈した卵混合液を 1 mL ずつ加える。各サンプル毎にピペットチップを変える事。
- 9) サンプルミキサー-MX-4 に MPC-S をセットし、回転させながら (18 rpm~20 rpm)、室温 (18~28 $^{\circ}$ C) で 30 分間インキュベーションする。サンプルミキサー-MX-4 を利用しない場合は全体がゆっくりと混ざり合っている状態にする。横揺れするだけの振盪器では混合効率が悪いので好ましくない。

Dynabeads Salmonella とサンプルの反応時間が長すぎると非特異的な吸着が増え検出しにくくなる
ことが考えらるので、15～30 分間とする。

- 10) インキュベーション後、MPC-S に磁石板を挿入し、ダイナビーズを回収するために 3 分間置く。この
間磁石を静かに数回反転させて、チューブの磁石側にダイナビーズの濃縮ドットペレットができるよ
うにする。試料の種類によっては、集まってきたビーズがすべり安く、反転する時にスナップをか
けると、力が加わり集まらないので、注意する。
- 11) チューブオープナーでチューブの蓋を開け、まず蓋の液を吸引除去し次にチューブ内上清液を注意深
く吸引除去する。(サンプル毎にピペットを変える事)この時濃縮されたダイナビーズを吸引しないよ
う気をつける。試料の種類によっては、液面が下がっていくのと同時にビーズがすべり落ちて行く場
合がある。このような場合は上清をすべて除去せずに、50～100 μ L 程度残す。ビーズが充分集まらな
いと思われるときも同様に上清を少量残して置く。
- 12) MPC-S の磁石板をはずして、洗浄バッファー (0.05% Tween 20、PBS pH 7.4) を 1 mL 加え、チュー
ブに蓋をしてから、MPC-S を反転させてビーズを再懸濁する。
- 13) ステップ 11. を繰り返す。
- 14) 各チューブに洗浄バッファー100 μ L (分離平板培地 2 枚に蒔く場合) 加え、チューブの蓋をしてボル
テックスをかける。あるいは、磁石板の入っていない MPC-S にたてて、MPC-S を掌に軽くたたきつけ
るようにして上下に振り再懸濁させてもよい。
- 15) 再懸濁したビーズ溶液 50 μ L を 2 種類の異なるサルモネラ用選択寒天培地に添加して通常の方法で塗
布する。
- 16) 選択寒天培地を 37°C で一晩インキュベートする。
- 17) サルモネラ擬陰性になったサンプルは、Step 5 で一晩インキュベートしたサンプルについても 6-16.
を行う。

メモ欄