

特殊細菌検出用 Primer Set

包装量：各 1,000 pmol
保存：-20℃

添付反応液：専用 10×PCR Buffer
容量：53 μl

形状：滅菌水溶液
濃度：19 pmol/μl

製品コード	製品名	検出細菌名	増幅 DNA (bp)
S001	●腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒遺伝子検出用 Primer Set VPD-1&2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	251
S002	●耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子 (<i>trh1</i>) 検出用 Primer Set VPS-1&2		210
S028	●耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子 (<i>trh1&2</i>) 検出用 Primer Set VPR-1&2		250
S003	●毒素原性大腸菌 LT 遺伝子検出用 Primer Set ELT-1&2	enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ; ETEC	263
S004	●STh 遺伝子検出用 Primer Set ESH-1&2		131
S005	●STp 遺伝子検出用 Primer Set ESP-1&2		123
S006	●腸管出血性大腸菌 VT1 遺伝子検出用 Primer Set EVT-1&2	enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> ; EHEC (Verocytotoxin-producing <i>Escherichia coli</i> ; VTEC)	349
S007	●VT2 遺伝子検出用 Primer Set EVS-1&2		404
S008	●VT 遺伝子検出用 Primer Set EVC-1&2		171
S009	●黄色ブドウ球菌 エンテロトキシン A 遺伝子検出用 Primer Set SEA-1&2	<i>Staphylococcus aureus</i>	423
S010	●エンテロトキシン B 遺伝子検出用 Primer Set SEB-1&2		391
S011	●エンテロトキシン C 遺伝子検出用 Primer Set SEZ-1&2		146
S012	●エンテロトキシン D 遺伝子検出用 Primer Set SED-1&2		499
S013	●エンテロトキシン E 遺伝子検出用 Primer Set SEE-1&2		557
S015	●毒素性ショック症候群毒素遺伝子検出用 Primer Set TST-1&2		228
S014	●コレラ毒素遺伝子検出用 Primer Set VCT-1&2	<i>Vibrio cholerae</i>	307
S016	●赤痢菌および腸管侵入性大腸菌 (EIEC) <i>invE</i> 遺伝子検出用 Primer Set INV-1&2	<i>Shigella</i> sp. and enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> ; EIEC	293
S017	● <i>ipaH</i> 遺伝子検出用 Primer Set IPA-1&2		242
S018	●サルモネラ菌 <i>invA</i> 遺伝子検出用 Primer Set SIN-1&2	<i>Salmonella typhimurium</i>	378
S019	●エンテロトキシン遺伝子検出用 Primer Set STN-1&2		264
S020	●ウェルシュ菌毒素遺伝子検出用 Primer Set CPE-1&2	<i>Clostridium perfringens</i>	456
S021	ボツリヌス A 型毒素遺伝子検出用 Primer Set BAS-1&2	<i>Clostridium botulinum</i>	284
S022	B 型毒素遺伝子検出用 Primer Set BBS-1&2		314
S023	C 型毒素遺伝子検出用 Primer Set BCS-1&2		290
S024	D 型毒素遺伝子検出用 Primer Set BDS-1&2		497
S025	E 型毒素遺伝子検出用 Primer Set BES-1&2		266
S026	F 型毒素遺伝子検出用 Primer Set BFS-1&2		332
S027	G 型毒素遺伝子検出用 Primer Set BGS-1&2		488

●これらの製品は株式会社島津製作所で製造されたものです。

特殊細菌検出用 Positive Control Template

包装量：各 5 ng
濃度：100 pg/μl

容量：50 μl
形状：滅菌 TE Buffer 溶液

保存：-20℃

製品コード	製品名	対応する Primer Set (製品コード)	増幅 DNA (bp)	製品コード	製品名	対応する Primer Set (製品コード)	増幅 DNA (bp)	製品コード	製品名	対応する Primer Set (製品コード)	増幅 DNA (bp)
S031	VP1	VPD (S001)	688	S035	SE1	SEA (S009)	695	S041	CP	CPE (S020)	667
		VPS (S002)	688			SEB (S010)	694	S042	BS1	BAS (S021)	691
S046	VP2	VPR (S028)	666	S036	SE2	SEZ (S011)	697	S043	BS2	BCS (S023)	690
S032	EC1	ELT (S003)	690	S037	ST	SED (S012)	695			BDS (S024)	690
		ESH (S004)	691			SEE (S013)	695	S044	BS3	BES (S025)	691
S033	EC2	ESP (S005)	689	S038	SS	TST (S015)	694			BFS (S026)	691
		EVT (S006)	686			INV (S016)	691	S045	BS4	BGS (S027)	668
S034	EC3	EVS (S007)	686	S039	VC	IPA (S017)	689				
		EVC (S008)	685			VCT (S014)	670				
				S040	SN	SIN (S018)	689				
						STN (S019)	690				

Application 1

腸炎ビブリオ病原因子遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を用いて PCR を行うと、腸炎ビブリオの各病原因子を特異的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子	増幅 DNA
VPD-1&2 (S001)	耐熱性溶血毒遺伝子 (<i>tdh</i>)	251 bp
VPS-1&2 (S002)	耐熱性溶血毒類似毒素 1 型遺伝子 (<i>trh1</i>)	210 bp
VPR-1&2 (S028)	耐熱性溶血毒類似毒素 1 型および 2 型遺伝子 (<i>trh1&trh2</i>)	250 bp

2. PCR

腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒遺伝子および耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子の各陽性株を用いた実験例を示します。PCR の反応液および温度条件については、それぞれ表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer*1	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)*2	4 μl
Primer-1	0.5 μl
Primer-2	0.5 μl
Template DNA*3	5 μl
TaKaRa Taq™ (5 U/μl)*4	0.25 μl
滅菌精製水	34.75 μl
Total	50 μl

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体を L-broth 培地中、あるいはアルカリペプトン培地中で 37°C で一晩培養した培養液 10 μl に、滅菌水を 90 μl 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) のほか、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	} 35 cycles
アニーリング*	55°C	1 min.	
(または)	60°C	1 min.)	
伸長	72°C	1 min.	

* : VPD-1&2 および VPR-1&2 の場合は 55°C、VPS-1&2 の場合は 60°C。

3. 結果

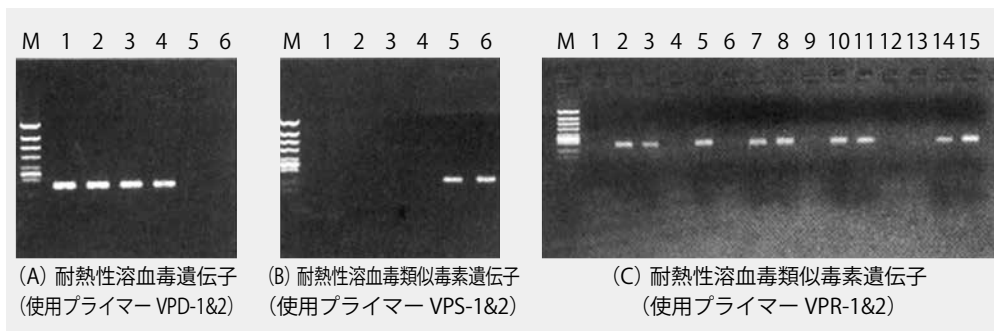


図 1. 腸炎ビブリオ病原因子遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。

- (A)、(B) レーン 1～4：腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒遺伝子陽性株
5, 6：腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子陽性株
M： ϕ X174-*Hinc* II digest
- (C) レーン 1, 4, 6, 9, 12, 13：腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子陰性株
2, 5, 8, 10, 11, 15：腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子 *trh1* 陽性株
3, 7, 14：腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子 *trh2* 陽性株
M： ϕ X174-*Hae* III digest

4. 参考文献

- 1) 西淵光昭ら PCR による腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒遺伝子および類似毒素遺伝子の検出法 日本臨床 50 巻・1992 年特別号 (1992) 感染症—遺伝子診断と分子疫学— pp.348-352
- 2) J., Tada, T., Ohashi, N., Nishimura, Y., Shirasaki, H., Ozaki, S., Fukushima, J., Takano, M., Nishibuchi, and Y., Takeda. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol Cell Prob.* (1992) **6**: 477-487.
- 3) M., Nishibuchi and J. B., Kaper. Duplication and variation of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol.* (1990) **4**: 87-99.
- 4) M., Nishibuchi, T., Taniguchi, T., Misawa, V., Khaeomanee-iam, T., Honda, and T., Miwatani. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun.* (1989) **57**: 2691-2697.
- 5) M., Kishishita, N., Matsuoka, K., Kumagai, S., Yamazaki, Y., Takeda, and M., Nishibuchi. Sequence variation in thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol.* (1992) **58**: 2449-2457.

Application 2

毒素原性大腸菌エンテロトキシン遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を用いて PCR を行うと、毒素原性大腸菌の各エンテロトキシン遺伝子の特異的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子	増幅 DNA
ELT-1&2 (S003)	易熱性エンテロトキシン遺伝子 (LT 遺伝子)	263 bp
ESH-1&2 (S004)	ヒト型耐熱性エンテロトキシン遺伝子 (STh 遺伝子)	131 bp
ESP-1&2 (S005)	ブタ型耐熱性エンテロトキシン遺伝子 (STp 遺伝子)	123 bp

2. PCR

毒素原性大腸菌の LT、STh、および STp の各遺伝子陽性株を用いた実験例を示します。PCR の反応液および温度条件については、それぞれ表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer*1	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each) *2	4 μl
Primer-1	0.5 μl
Primer-2	0.5 μl
Template DNA*3	5 μl
TaKaRa Taq (5 U/μl) *4	0.25 μl
滅菌精製水	34.75 μl
Total	50 μl

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体を L-broth 培地中で 37°C 一晩培養した培養液 10 μl に、滅菌水を 90 μl 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) のほか、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。ESH-1&2 (製品コード S004) を使用する際は、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A) の使用を推奨する。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	} 35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	

3. 結果



図 1. 毒素原性大腸菌エンテロトキシン遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g/ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。

- レーン 1, 2 : 毒素原性大腸菌 LT 遺伝子陽性株
 3, 4 : 毒素原性大腸菌 LT および STp 遺伝子陽性株
 5 : 毒素原性大腸菌 STp 遺伝子陽性株
 6 ~ 8 : 毒素原性大腸菌 STh 遺伝子陽性株
 M : ϕ X174-*Hinc* II digest

4. 参考文献

- 1) 西村直行、大橋鉄雄、多田淳、尾崎博子、福島繁、西淵光昭、竹田美文 PCR 法による易熱性エンテロトキシン (LT) 産生性大腸菌の検出 感染症学雑誌 (1991) 65 臨時増刊号 : 138
- 2) 大橋鉄雄、多田淳、西村直行、白崎良成、福島繁、竹田多恵、西淵光昭、竹田美文 PCR による耐熱性エンテロトキシン (ST) 産生性大腸菌の検出 感染症学雑誌 (1992) 66 臨時増刊号 : 216
- 3) T., Yamamoto, T., Tamura, and T., Yokota. Primary structure of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for humans. *J Biol Chem.* (1984) **259**: 5037-5044.
- 4) T., Yamamoto, T., Gojobori, and T., Yokota. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1. *J Bacteriol.* (1987) **169**: 1352-1357.
- 5) S. L., Moseley, J. W., Hardy, M. I., Huq, P., Echverria, and S., Falkow. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* (1983) **39**: 1167-1174.
- 6) M., So. and B. J., McCarthy. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1980) **77**: 4011-4015.

Application 3

腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を組み合わせると、腸管出血性大腸菌のベロ毒素遺伝子の特異的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子					増幅 DNA
	ベロ毒素 1 型遺伝子	ベロ毒素 2 型遺伝子	ベロ毒素 2 型の変異型遺伝子			
EVT-1&2 (S006)	VT1	—	—	—	—	349 bp
EVS-1&2 (S007)	—	VT2	VT2vha	VT2vhb	VT2vp1	404 bp
EVC-1&2 (S008)	VT1	VT2	VT2vha	VT2vhb	VT2vp1	171 bp

2. PCR

腸管出血性大腸菌の各ベロ毒素 (VT1、VT2、VT2vha、VT2vhb、および VT2vp1) 遺伝子陽性株を用いた実験例を示します。PCR の反応液および温度条件については、それぞれ表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer*1	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each) *2	4 μl
Primer-1	0.5 μl
Primer-2	0.5 μl
Template DNA*3	5 μl
TaKaRa Taq (5 U/μl) *4	0.25 μl
滅菌精製水	34.75 μl
Total	50 μl

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体を L-broth 培地中で 37°C 一晩培養した培養液 10 μl に、滅菌水を 90 μl 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) のほか、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	} 35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	
	72°C	10 min.	

3. 結果

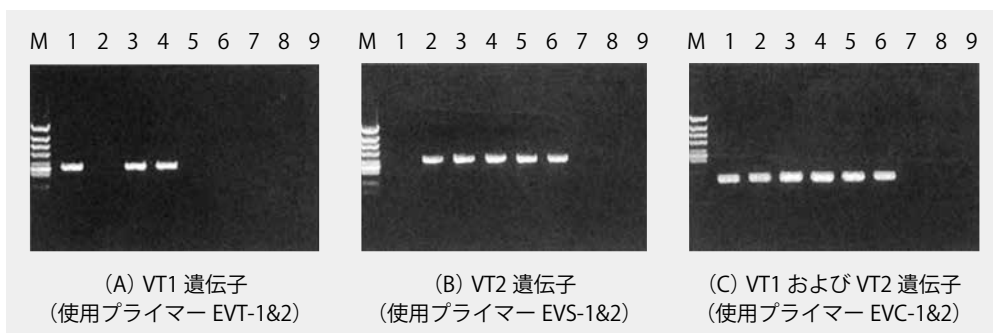


図 1. 腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g/ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。

- レーン 1 : 腸管出血性大腸菌 VT1 遺伝子陽性株
2 : 腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子陽性株
3 : 腸管出血性大腸菌 VT1 および VT2 遺伝子陽性株
4 : 腸管出血性大腸菌 VT1 および VT2vha 遺伝子陽性株
5 : 腸管出血性大腸菌 VT2vhb 遺伝子陽性株
6 : 腸管出血性大腸菌 VT2vp1 遺伝子陽性株
7 : 毒素原性大腸菌 LT 遺伝子陽性株
8 : 毒素原性大腸菌 STh 遺伝子陽性株
9 : 毒素原性大腸菌 STp 遺伝子陽性株
M : ϕ X174-*Hinc* II digest

4. 参考文献

- 1) T., Takao, T., Tanabe, Y.-M., Hong, Y., Shimonishi, H., Kurazono, T., Yutsudo, C., Sasakawa, M., Yoshikawa, and Y., Takeda. Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157: H7 with that of Shiga toxin. *Microb Pathog.* (1988) **5**: 357-369.
- 2) M. P., Jackson, R. J., Neill, A. D. O' Brien, R. K., Holmes, and J. W., Newland. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbio Lett.* (1987) **44**: 109-114.
- 3) H., Ito, A., Terai, H., Kurazono, Y., Takeda, and M., Nishibuchi. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91: H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog.* (1990) **8**: 47-60.
- 4) D. L., Weinstein, M. P., Jackson, J. E., Samuel, R. K., Holmes, and A. D. O' Brien. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from a *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol.* (1988) **170**: 4223-4230.
- 5) 上田成子、峰野純一、桑原祥浩 PCR 法による食品からのベロ毒素産生性大腸菌の検出法の検討 防菌防黴誌 (1999) **27**: 441-446.

Application 4

黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を用いて PCR を行うと、黄色ブドウ球菌の各エンテロトキシン遺伝子の特異的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子	増幅 DNA
SEA-1&2 (S009)	エンテロトキシン A 遺伝子	423 bp
SEB-1&2 (S010)	エンテロトキシン B 遺伝子	391 bp
SEZ-1&2 (S011)	エンテロトキシン C 遺伝子	146 bp
SED-1&2 (S012)	エンテロトキシン D 遺伝子	499 bp
SEE-1&2 (S013)	エンテロトキシン E 遺伝子	557 bp

2. PCR

黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンの各遺伝子の陽性株を用いた実験例を示します。PCR の反応液および温度条件については、それぞれ表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer* ¹	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)* ²	4 μl
Primer-1	0.5 μl
Primer-2	0.5 μl
Template DNA* ³	5 μl
<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/μl)* ⁴	0.25 μl
滅菌精製水	34.75 μl
Total	50 μl

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : *TaKaRa Taq* (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体をブレインハートインフュージョン培地中で 37°C 一晚培養した培養液 10 μl に、滅菌水を 90 μl 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : *TaKaRa Taq* (製品コード R001A) のほか、*TaKaRa Taq* Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	} 35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	

3. 結果

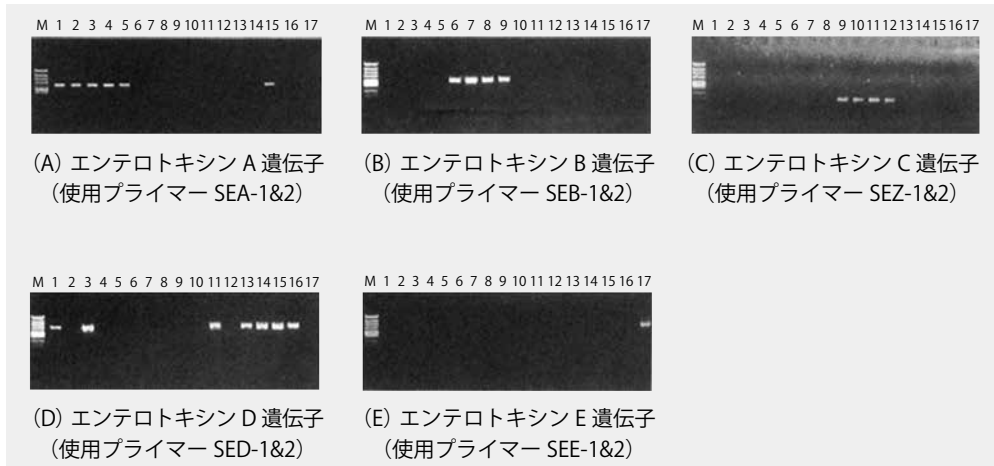


図 1. 黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g/ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。

- | | |
|--------|--------------------------------------|
| レーン 1 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子および D 遺伝子陽性株 |
| 2 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子陽性株 |
| 3 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子および D 遺伝子陽性株 |
| 4 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子陽性株 |
| 5 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子および B 遺伝子陽性株 |
| 6 ~ 8 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン B 遺伝子陽性株 |
| 9, 10 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン C 遺伝子陽性株 |
| 11 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン C 遺伝子および D 遺伝子陽性株 |
| 12 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン C 遺伝子陽性株 |
| 13 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン D 遺伝子陽性株 |
| 14 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子および D 遺伝子陽性株 |
| 15, 16 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン D 遺伝子陽性株 |
| 17 | : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン E 遺伝子陽性株 |
| M | : ϕ X174- <i>Hinc</i> II digest |

4. 参考文献

- 1) 大橋鉄雄、多田淳、西村直行、尾崎博子、福島繁、品川邦汎、西淵光昭、竹田美文 PCR 法による黄色ブドウ球菌エンテロトキシン (A ~ E) 遺伝子の検出 日本細菌学雑誌 (1992) **47**: 280
- 2) M. J., Betley and J. J., Mekalanos. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol.* (1988) **170**: 34-41.
- 3) C. L., Jones and S. A., Khan. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* (1986) **166**: 29-33.
- 4) G. A., Bohach and P. M., Schlievert. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol Gen Genet.* (1987) **209**: 15-20.
- 5) K. W., Bayeales and J. J., landolo. Genetic and molecular analysis of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol.* (1989) **171**: 4799-4806.
- 6) J. L., Couch, M. T., Soltis, and M. J., Betley. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol.* (1988) **170**: 2954-2960.
- 7) 上田成子、峰野純一、徳丸雅一、大塚佳代子、品川邦汎、桑原祥浩 PCR 法による食品からの毒素産生性ブドウ球菌の検出 防菌防黴誌 (1999) **27**: 505-510.

Application 5

黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を用いて PCR を行うと、黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素 I 型 (TSST-1) 遺伝子の特異的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子	増幅 DNA
TST-1&2 (S015)	毒素性ショック症候群毒素 I 型遺伝子 (TSST-1)	228 bp

2. PCR

黄色ブドウ球菌の毒素性ショック症候群毒素 I 型遺伝子陽性株および各エンテロトキシン (A ~ E) 遺伝子陽性株を用いた実験例を示します。PCR の反応液および温度条件については、表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer*1	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each) *2	4 μ l
Primer-1	0.5 μ l
Primer-2	0.5 μ l
Template DNA*3	5 μ l
TaKaRa Taq (5 U/ μ l) *4	0.25 μ l
滅菌精製水	34.75 μ l
Total	50 μ l

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体を L-broth 培地中で 37°C 一晚培養した培養液 10 μ l に、滅菌水を 90 μ l 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μ l の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) のほか、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	} 35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	

3. 結果

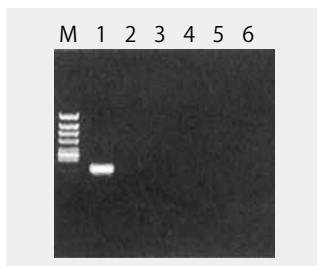


図 1. 黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素 (TSST-1) 遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g/ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。

- レーン 1 : 黄色ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素 I 型遺伝子陽性株
- 2 : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A 遺伝子陽性株
- 3 : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン B 遺伝子陽性株
- 4 : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン C 遺伝子陽性株
- 5 : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン D 遺伝子陽性株
- 6 : 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン E 遺伝子陽性株
- M : ϕ X174-Hinc II digest

4. 参考文献

- 1) D. A., Blomster-Hautamaa., B. N., Kreiswirth., J. S., Kornblum., R. P., Novick., and P. M., Schlievert. The nucleotide and partial amino acid sequence of toxic shock syndrome toxin-I. *J Biol Chem.* (1986) **261**: 15783-15786.
- 2) 上田成子、峰野純一、徳丸雅一、大塚佳代子、品川邦汎、桑原祥浩 PCR 法による食品からの毒素産生性ブドウ球菌の検出 防菌防黴誌 (1999) **27**: 505-510.

Application 6

コレラ毒素遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を用いて PCR を行うと、コレラ毒素 (CT) 遺伝子を特異的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子	増幅 DNA
VCT-1&2 (S014)	コレラ毒素遺伝子 (CT)	307 bp

2. PCR

コレラ菌 (コレラ毒素遺伝子陽性株および陰性株) および毒素原性大腸菌 (易熱性エンテロトキシン遺伝子陽性株) を用いた実験例を示します。PCR 反応液および温度条件については、表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer* ¹	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)* ²	4 μl
Primer-1	0.5 μl
Primer-2	0.5 μl
Template DNA* ³	5 μl
<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/μl)* ⁴	0.25 μl
滅菌精製水	34.75 μl
Total	50 μl

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : *TaKaRa Taq* (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体を L-broth 培地中で 37°C 一晩培養した培養液 10 μl に、滅菌水を 90 μl 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : *TaKaRa Taq* (製品コード R001A) のほか、*TaKaRa Taq* Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	} 35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	

3. 結果

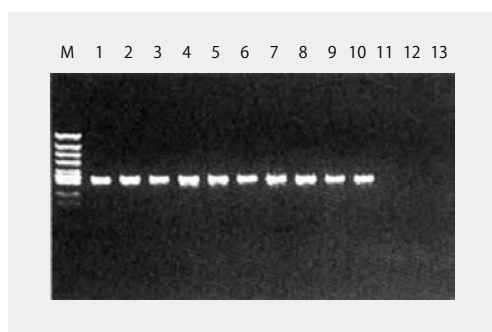


図 1. コレラ毒素遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g/ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。

- レーン 1～3 : コレラ菌エルトール・小川型、コレラ毒素遺伝子陽性株
- 4～6 : コレラ菌エルトール・稲葉型、コレラ毒素遺伝子陽性株
- 7 : コレラ菌古典・小川型、コレラ毒素遺伝子陽性株
- 8 : コレラ菌古典・稲葉型、コレラ毒素遺伝子陽性株
- 9, 10 : コレラ菌 non-O1、コレラ毒素遺伝子陽性株
- 11 : コレラ菌エルトール・小川型、コレラ毒素遺伝子陰性株
- 12 : コレラ菌エルトール・稲葉型、コレラ毒素遺伝子陰性株
- 13 : 毒性原性大腸菌 LT 遺伝子陽性株
- M : ϕ X174-*Hinc* II digest

4. 参考文献

H., Lockman and J. B., Kaper. Nucleotide sequence analysis of the A2 and B subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J Biol Chem.* (1983) **258**: 13722-13726.

Application 7

赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を用いて PCR を行うと、赤痢菌および腸管侵入性大腸菌の病原遺伝子を実験的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子	増幅 DNA
INV-1&2 (S016)	<i>invE</i> 遺伝子	293 bp
IPA-1&2 (S017)	<i>ipaH</i> 遺伝子	242 bp

2. PCR

赤痢菌および腸管侵入性大腸菌の *invE* 遺伝子および *ipaH* 遺伝子の各陽性株を用いた実験例を示します。PCR の反応液および温度条件については、それぞれ表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer*1	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)*2	4 μl
Primer-1	0.5 μl
Primer-2	0.5 μl
Template DNA*3	5 μl
TaKaRa Taq (5 U/μl)*4	0.25 μl
滅菌精製水	34.75 μl
Total	50 μl

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体を L-broth 培地中で 37°C 一晩培養した培養液 10 μl に、滅菌水を 90 μl 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) のほか、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	

3. 結果



図 1. 赤痢菌病原因子遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。なお、使用したプライマーはレーン 1,2 が INV-1 および 2、レーン 3,4 が IPA-1 および 2 です。

レーン 1	: 赤痢菌 <i>invE</i> 遺伝子陽性株	プライマー INV-1&2 INV-1&2 IPA-1&2 IPA-1&2
2	: 赤痢菌 <i>invE</i> 遺伝子陰性株	
3	: 赤痢菌 <i>ipaH</i> 遺伝子陽性株	
4	: 赤痢菌 <i>ipaH</i> 遺伝子陰性株	
M	: pHY Marker	

4. 参考文献

- 1) A. B., Hartman., M., Venkatesan., E. V., Oaks., and J. M., Buysse. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol.* (1990) **172**: 1905-1915.
- 2) H., Waranabe., E., Arakawa., K., Ito., J., Kato., and A., Nakamura. Genetic analysis of an invasion region by use of a Tn3-*lac* transposon and identification of a second positive regulator gene, *invE*, for cell invasion of *Shigella sonnei*: Significant homology of *invE* with *parB* of plasmid PI. *J Bacteriol.* (1990) **172**: 619-629.

5. Q&A

Q : 赤痢菌および腸管侵入性大腸菌検出用プライマーには 2 種類 (INV、IPA) あるが、その違いは？

A : *ipaH* 遺伝子は、ゲノムあるいはプラスミドのいずれかに存在するといわれています。ほとんどの赤痢菌株はこの遺伝子が陽性ですが、その機能はわかっていません。*invE* 遺伝子はプラスミド上にある侵入性遺伝子ですので、脱落する場合があります。*ipaH* 遺伝子陽性株のうち、約 50% が *invE* 遺伝子陽性株といわれています。

Application 8

サルモネラ菌 *invA* 遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を用いて PCR を行うと、サルモネラ菌の病原遺伝子の特異的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子	増幅 DNA
SIN-1&2 (S018)	<i>invA</i> 遺伝子	378 bp
STN-1&2 (S019)	エンテロトキシン遺伝子	264 bp

2. PCR

サルモネラ菌 *invA* 遺伝子およびエンテロトキシン遺伝子の各陽性株を用いた実験例を示します。PCR の反応液および温度条件については、それぞれ表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer*1	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each) *2	4 μl
Primer-1	0.5 μl
Primer-2	0.5 μl
Template DNA*3	5 μl
TaKaRa Taq (5 U/μl) *4	0.25 μl
滅菌精製水	34.75 μl
Total	50 μl

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体を L-broth 培地中で 37°C 一晩培養した培養液 10 μl に、滅菌水を 90 μl 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) のほか、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	} 35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	
	72°C	10 min.	

3. 結果

(A) サルモネラ菌 *invA* 遺伝子



(B) サルモネラ菌エンテロトキシン遺伝子

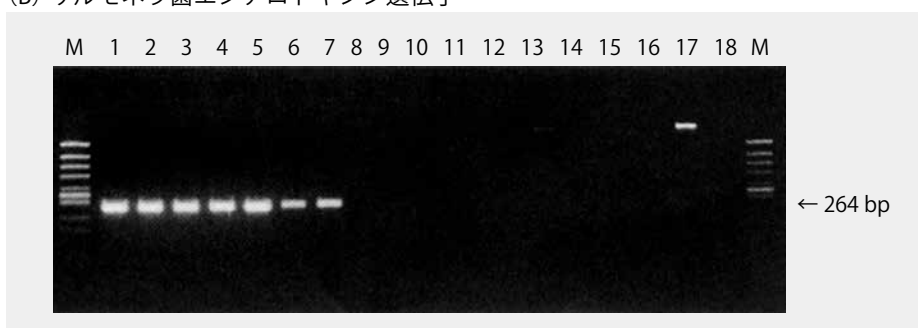


図1. サルモネラ菌病原因子遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g/ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。なお、*C. freundii* にはサルモネラ菌エンテロトキシン遺伝子とホモロジーの高い配列を有する株が存在していると示唆されました。

レーン 1 : <i>Salmonella typhimurium</i>	レーン 10 : <i>Vibrio furnissii</i>
2 : <i>Salmonella enteritidis</i>	11 : <i>Vibrio fluvialis</i>
3 : <i>Salmonella choleraesuis</i>	12 : <i>Vibrio furnissii</i>
4 : <i>Salmonella infantis</i>	13 : <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
5 : <i>Salmonella thompson</i>	14 : <i>Vibrio cholerae</i> non-O1
6 : <i>Citrobacter freundii</i>	15 : <i>Vibrio cholerae</i> O1
7 : <i>Citrobacter freundii</i>	16 : <i>Escherichia coli</i>
8 : <i>Citrobacter amalonaticus</i>	17 : <i>Proteus mirabilis</i>
9 : <i>Citrobacter freundii</i>	18 : <i>Klebsiella oxytoca</i>
	M : ϕ X174-Hinc II digest

4. 参考文献

- 1) J. E., Galán., C., Ginocchio., and P., Costeas. Molecular and Functional Characterization of the *Salmonella* Invasion Gene *invA*: Homology of InvA to Members of a New Protein Family. *Journal of Bacteriology*. (1992) **56**: 4338-4349.
- 2) A. K., Chopra., J. W., Peterson., P., Chary., and R., Prasad. Molecular characterization of an enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *Microbial Pathogenesis*. (1994) **16**: 85-98.

Application 9

ウェルシュ菌毒素遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を用いて PCR を行うと、ウェルシュ菌毒素遺伝子（エンテロトキシン遺伝子）を特異的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子	増幅 DNA
CPE-1&2 (S020)	ウェルシュ菌毒素遺伝子	456 bp

2. PCR

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) および他の *Clostridium* 属菌を用いた実験例を示します。PCR の反応液および温度条件については、表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer*1	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each) *2	4 μl
Primer-1	0.5 μl
Primer-2	0.5 μl
Template DNA*3	5 μl
TaKaRa Taq (5 U/μl) *4	0.25 μl
滅菌精製水	34.75 μl
Total	50 μl

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体を GAM ブイヨン培地中で 37°C 一晚培養した培養液 10 μl に、滅菌水を 90 μl 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) のほか、TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	} 35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	

3. 結果

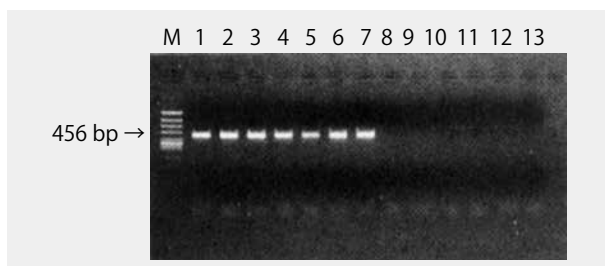


図 1. ウェルシュ菌毒性遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g/ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。

- レーン 1～7 : ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 毒素陽性株
- 8～9 : ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 毒素陰性株
- 10 : *Clostridium difficile*
- 11 : *Clostridium sporogenes*
- 12 : *Clostridium barati*
- 13 : Negative control
- M : ϕ X174-*Hinc* II digest

4. 参考文献

M., Van Damme-Jongsten., K., Wernars., and S., Notermans. Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. *Antonie van Leeuwenhoek.* (1989) **56**: 181-190.

Application 10

ボツリヌス菌毒素遺伝子の検出

1. Primer

表 1. のように、プライマーの各型を用いて PCR を行うと、ボツリヌス菌毒素の各遺伝子を持異的に検出できます。

表 1. Primer の組合せ

Primer (製品コード)	検出できる遺伝子	増幅 DNA
BAS-1&2 (S021)	ボツリヌス A 型毒素遺伝子	284 bp
BBS-1&2 (S022)	ボツリヌス B 型毒素遺伝子	314 bp
BCS-1&2 (S023)	ボツリヌス C 型毒素遺伝子	290 bp
BDS-1&2 (S024)	ボツリヌス D 型毒素遺伝子	497 bp
BES-1&2 (S025)	ボツリヌス E 型毒素遺伝子	266 bp
BFS-1&2 (S026)	ボツリヌス F 型毒素遺伝子	332 bp
BGS-1&2 (S027)	ボツリヌス G 型毒素遺伝子	488 bp

2. PCR

ボツリヌス菌毒素の各遺伝子の陽性株を用いた実験例を示します。PCR の反応液および温度条件については、それぞれ表 2 および表 3 に示すとおりです。

表 2. 反応液組成

10 × PCR Buffer* ¹	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)* ²	4 μl
Primer-1	0.5 μl
Primer-2	0.5 μl
Template DNA* ³	5 μl
<i>TaKaRa Taq</i> (5 U/μl)* ⁴	0.25 μl
滅菌精製水	34.75 μl
Total	50 μl

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : *TaKaRa Taq* (製品コード R001A) に添付。

* 3 : 精製 DNA または熱抽出サンプルを使用。なお、熱抽出サンプルは、菌体をクックドミート培地中で 30 ~ 37°C 一晚培養した培養液 10 μl に、滅菌水を 90 μl 加え、95°C、5 分間加熱後、遠心分離により菌体の残渣を除いた上清液を使用する。さらに感度が要求される場合は、同培養液 1 ml を遠心 (5,000 rpm、5 分間) 後上清を除き、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。これを 95°C、5 分間加熱後、遠心分離により残渣を除いた上清を使用する。

* 4 : *TaKaRa Taq* (製品コード R001A) のほか、*TaKaRa Taq* Hot Start Version (製品コード R007A) も使用できる。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	

3. 結果

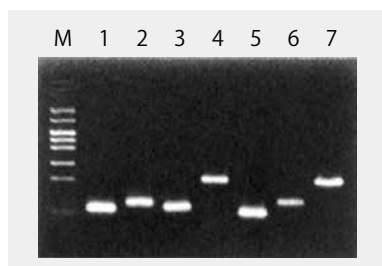


図 1. ボツリヌス菌毒性遺伝子の検出

3% アガロースゲル (エチジウムブロマイド 0.5 $\mu\text{g/ml}$ を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子が特異的に検出されました。図中の各レーンに用いたテンプレートは、次の菌株の熱抽出サンプルです。

レーン M : pHY Marker

- 1 : ボツリヌス菌 A 型毒素遺伝子陽性株
- 2 : ボツリヌス菌 B 型毒素遺伝子陽性株
- 3 : ボツリヌス菌 C 型毒素遺伝子陽性株
- 4 : ボツリヌス菌 D 型毒素遺伝子陽性株
- 5 : ボツリヌス菌 E 型毒素遺伝子陽性株
- 6 : ボツリヌス菌 F 型毒素遺伝子陽性株
- 7 : ボツリヌス菌 G 型毒素遺伝子陽性株

4. 参考文献

R. A., Huston., D. E., Thompson., and M. D., Collins. Genetic interrelationships of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related clostridia as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*. (1993) **108**: 103-110.

Application 11

Positive Control Template を用いた実験例

1. 製品説明

特殊細菌検出用 Primer Set を用いて病原菌検出 PCR を行う際に、PCR 反応が正常に行われているかを確認するためのポジティブコントロールテンプレートです。

PCR 増幅産物は、病原菌由来の増幅産物とサイズが異なりますので、万が一、本コントロールがサンプルにコンタミしても区別することができます。

使用されるプライマーにより適切なコントロールテンプレートをご使用ください。

2. PCR

特殊細菌検出用 Positive Control Template SE2 (製品コード S036)、SN (製品コード S040) を用いた PCR および各種病原菌ゲノムを用いた PCR より得られる増幅産物の比較実験例を示します。PCR 反応液、および温度条件については表 1、表 2 に示す通りです。

表 1. 反応液組成

10 × PCR Buffer*1	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)*2	4 μ l
Primer SEZ-1	0.5 μ l
Primer SEZ-2	0.5 μ l
Positive Control Template (SE2)	0.5 μ l
TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
滅菌精製水	39.25 μ l
Total	50 μ l

反応液は氷冷下で調製する。

* 1 : 特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028) に添付。

* 2 : TaKaRa Taq (製品コード R001A) に添付。

表 3. PCR 条件

熱変性	94°C	1 min.	} 35 cycles
アニーリング	55°C	1 min.	
伸長	72°C	1 min.	

3. 結果 (1)



図1. Positive Control Template の増幅産物と各種病原菌ゲノムの増幅産物との泳動パターン
の比較

ゲル：3% アガロース（エチジウムブロマイド含）

レーン1, 16：Positive Control Template SE2 に対する SEZ Primer Set による増幅 DNA (697 bp)

レーン 2 以下は各種病原菌の熱抽出物を鋳型として使用しました。

- 2：VPD Primer Set による増幅 DNA (251 bp)
- 3：VPS Primer Set による増幅 DNA (210 bp)
- 4：ELT Primer Set による増幅 DNA (263 bp)
- 5：ESH Primer Set による増幅 DNA (131 bp)
- 6：ESP Primer Set による増幅 DNA (123 bp)
- 7：EVT Primer Set による増幅 DNA (349 bp)
- 8：EVS Primer Set による増幅 DNA (404 bp)
- 9：EVC Primer Set による増幅 DNA (171 bp)
- 10：SEA Primer Set による増幅 DNA (423 bp)
- 11：SEB Primer Set による増幅 DNA (391 bp)
- 12：SEZ Primer Set による増幅 DNA (146 bp)
- 13：SED Primer Set による増幅 DNA (499 bp)
- 14：SEE Primer Set による増幅 DNA (557 bp)
- 15：VCT Primer Set による増幅 DNA (307 bp)
- 17：TST Primer Set による増幅 DNA (228 bp)
- 18：INV Primer Set による増幅 DNA (293 bp)
- 19：IPA Primer Set による増幅 DNA (242 bp)
- M：pHY Marker

各 Positive Control Template より得られる増幅産物は、レーン 1 および 16 とほぼ同じ位置
に泳動されるので、各種病原菌ゲノムより得られる増幅産物とサイズにより区別すること
ができます。

3. 結果 (2)

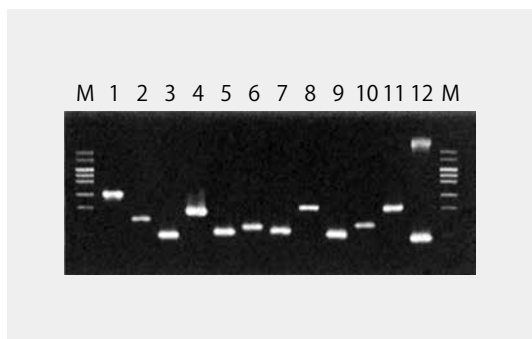


図 2. Positive Control Template の増幅産物と各種病原菌ゲノムの増幅産物との泳動パターンの比較

ゲル：3% アガロース (エチジウムブロマイド含)

レーン 1 : Positive Control Template SN に対する SIN Primer Set による増幅 DNA (689 bp)

レーン 2 以下は各種病原菌の熱抽出物を鋳型として使用しました。

2 : SIN Primer Set による増幅 DNA (378 bp)

3 : STN Primer Set による増幅 DNA (264 bp)

4 : CPE Primer Set による増幅 DNA (456 bp)

5 : BAS Primer Set による増幅 DNA (284 bp)

6 : BBS Primer Set による増幅 DNA (314 bp)

7 : BCS Primer Set による増幅 DNA (290 bp)

8 : BDS Primer Set による増幅 DNA (497 bp)

9 : BES Primer Set による増幅 DNA (266 bp)

10 : BFS Primer Set による増幅 DNA (332 bp)

11 : BGS Primer Set による増幅 DNA (488 bp)

12 : VPR Primer Set による増幅 DNA (250 bp)

M : pHY Marker

各 Positive Control Template より得られる増幅産物は、レーン 1 とほぼ同じ位置に泳動されるので、各種病原菌ゲノムより得られる増幅産物とサイズにより区別することができます。

【補足情報】

■ 本プライマーセットシリーズ以外に必要な試薬、機器（主なもの）

本プライマーセットシリーズを用いた検出過程では、さらに次のような試薬、機器が必要です。

[試薬]

1. *TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C)
TaKaRa Taq Hot Start Version (製品コード R007A/B)
2. 滅菌精製水
3. 電気泳動用アガロース
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
4. 電気泳動用 Buffer
Tris-Acetate-EDTA (TAE) 50x Powder, pH 8.3 (製品コード T9131)
TBE (Tris-borate-EDTA) powder (製品コード T905)
5. DNA マーカー
 ϕ X174-*Hae* III digest (製品コード 3405A/B)
 ϕ X174-*Hinc* II digest (製品コード 3406A/B)
pHY Marker (製品コード 3404A/B) など
6. Loading buffer (6× : 36% glycerol、0.05% bromophenol blue、0.035% xylene cyanol、30 mM EDTA) (5. に記載の DNA マーカーには添付されている。)
7. DNA 染色剤
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
エチジウムブロマイド

[機器]

1. ヒートブロック (95℃まで温度を上げられるもの)
2. 1.5 ml チューブ対応型冷却遠心機
3. サーマルサイクラー
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (製品コード TP600)
4. 電気泳動装置
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)
5. 電気泳動ゲル撮影装置

[その他]

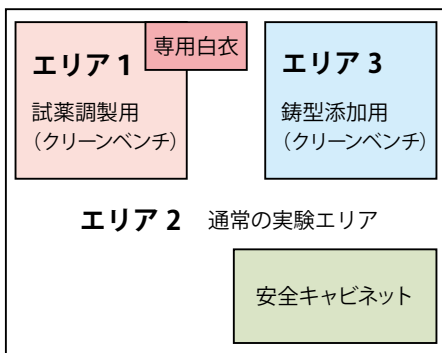
1. 0.2 ml PCR チューブ
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200) など
2. 200 μ l、20 μ l、10 μ l 各マイクロピペット
3. マイクロピペット用チップ (疎水性フィルター付)

■ 使用に際して

- ・本キットは遺伝子検出であるため、不活化された細菌も検出し、生菌のみを検出対象とするものではありません。また、設計した Primer の配列内に遺伝子の変異や欠損／挿入が生じた際には、検出できない場合があります。(検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。)
- ・判定の確定には、遺伝子検査だけではなく、培養検査などの結果も併用の上、ご判断ください。

■ 操作上の注意

1. サーマルサイクラーの取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
2. 万一、プライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。
3. 反応液の調製から検出まで、次の4つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。コンタミネーション発生の原因となりますので、エリア4以外では増幅産物が入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア1：PCR 反応液の調製、分注を行います。
 - エリア2：検体の調製 (DNA 抽出等) を行います。
 - エリア3：PCR 反応液へ鋳型 DNA の添加を行います。
 - エリア4：電気泳動等で PCR 増幅産物の解析を行います。



- エリア1：反応試薬のみを扱うエリア
PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
- エリア4：PCR 産物を取扱うエリア
PCR 後の増幅産物を電気泳動する場合は、エリア1、2、3とは異なる別室で行う。

■ 注意

- 本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Life Technologies Corporation の登録商標です。TaKaRa Taq、PrimeGel はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社