

---

# Takara

## 特殊細菌検出用 Primer Set

- インターカレーター法によるリアルタイム PCR への応用 -  
参考データ集

---

特殊細菌検出用 Primer Set は、通常、PCR 後に電気泳動で検出するエンドポイント PCR 法でご使用いただいておりますが、より迅速かつ簡便に検出するために、リアルタイム PCR 法への応用について検証しました。リアルタイム PCR には、インターカレーター法のリアルタイム PCR 試薬を用い、増幅産物の確認は融解曲線分析で行いました。今回、検証した 11 種のプライマーに関しては、すべてで良好な反応結果が得られ、リアルタイム PCR にも十分利用可能と考えられます。

## <方法>

### 【使用した試薬および装置】

- リアルタイム PCR 試薬  
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420A)
- リアルタイム PCR 装置  
Thermal Cycler Dice® Real Time System // (製品コード TP900 : 終売)
- プライマー

Primer Set (製品コード)	菌種	検出対象遺伝子	増幅サイズ
ELT-1&2 (S003)	毒素原性大腸菌	LT 遺伝子	263 bp
ESH-1&2 (S004)		STh 遺伝子	131 bp
ESP-1&2 (S005)		STp 遺伝子	123 bp
EVT-1&2 (S006)	腸管出血性大腸菌	VT1 遺伝子	349 bp
EVS-1&2 (S007)		VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vp1	404 bp
EVC-1&2 (S008)		VT1, VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vp1	171 bp
INV-1&2 (S016)	赤痢および	<i>invE</i> 遺伝子	293 bp
IPA-1&2 (S017)	腸管侵入性大腸菌	<i>ipaH</i> 遺伝子	242 bp
SIN-1&2 (S018)	サルモネラ菌	<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
CPE-1&2 (S020)	ウェルシュ菌	ウェルシュ菌毒素遺伝子	456 bp

### ・鋳型

各プライマーにより増幅される配列を組み込んだプラスミド DNA\*を、1 反応あたり 5 ~ 5 × 10<sup>5</sup> コピー使用。また、ネガティブコントロールとして滅菌精製水を使用。

\* : 本実験で用いたプラスミド DNA は、特殊細菌検出用 Positive Control Template (製品コード S031 ~ S046) とは異なります。特殊細菌検出用 Positive Control Template を用いた PCR 産物は、本来のターゲット由来の増幅産物とサイズが異なりますので、本実験には使用できません。

### 【リアルタイム PCR 反応組成】

試薬	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus) (2 ×)	12.5 μl
各 Primer-1	0.25 μl
各 Primer-2	0.25 μl
Template	5 μl
滅菌精製水	7 μl
Total	25 μl

### 【リアルタイム PCR 反応条件】

#### S007、S020 (増幅サイズ 400 bp 以上)

Hold (初期変性)

Cycle : 1

95°C 30 秒

2 step PCR

Cycles : 40

95°C 5 秒

60°C 1 分

Dissociation (融解曲線分析)

#### S007、S020 以外 (増幅サイズ 400 bp 未満)

Hold (初期変性)

Cycle : 1

95°C 30 秒

2 step PCR

Cycles : 40

95°C 5 秒

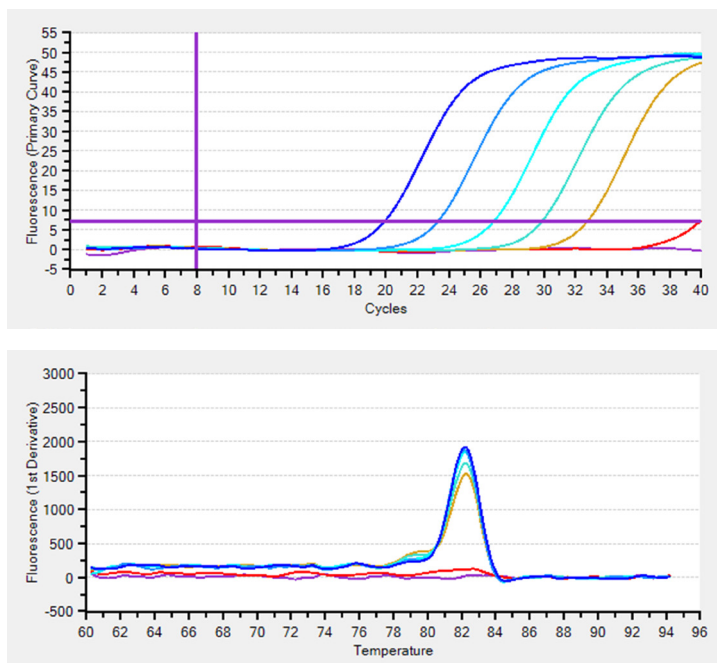
60°C 30 秒

Dissociation (融解曲線分析)

## <結果>

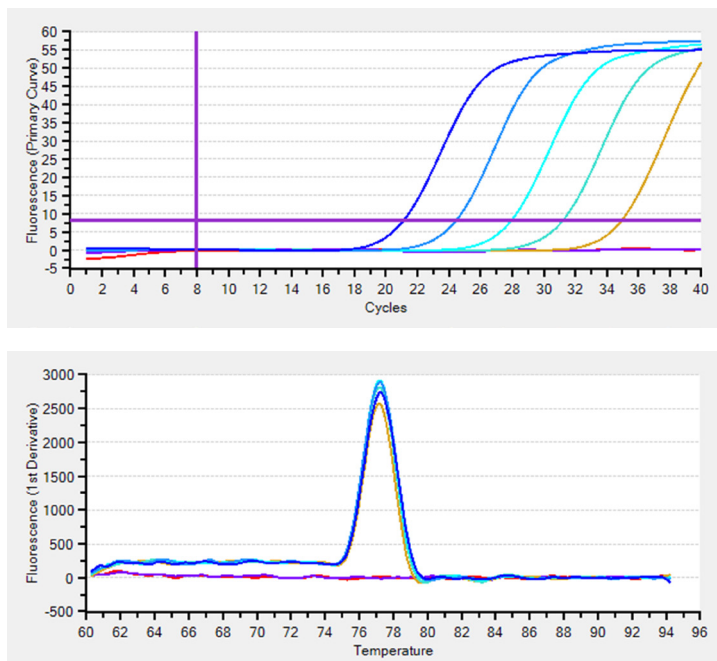
### 毒素原性大腸菌 LT 遺伝子 (S003)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、プライマーダイマー等の非特異的増幅は生じませんでした。また、融解曲線分析の結果、 $T_m$  値の平均は  $82.2^{\circ}\text{C}$  でした。



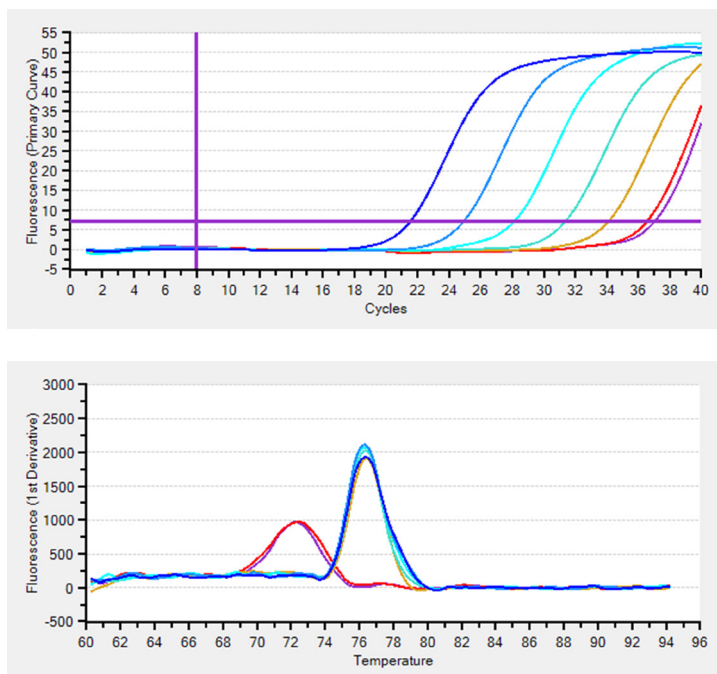
### 毒素原性大腸菌 STh 遺伝子 (S004)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、プライマーダイマー等の非特異的増幅は生じませんでした。また、融解曲線分析の結果、 $T_m$  値の平均は  $77.2^{\circ}\text{C}$  でした。



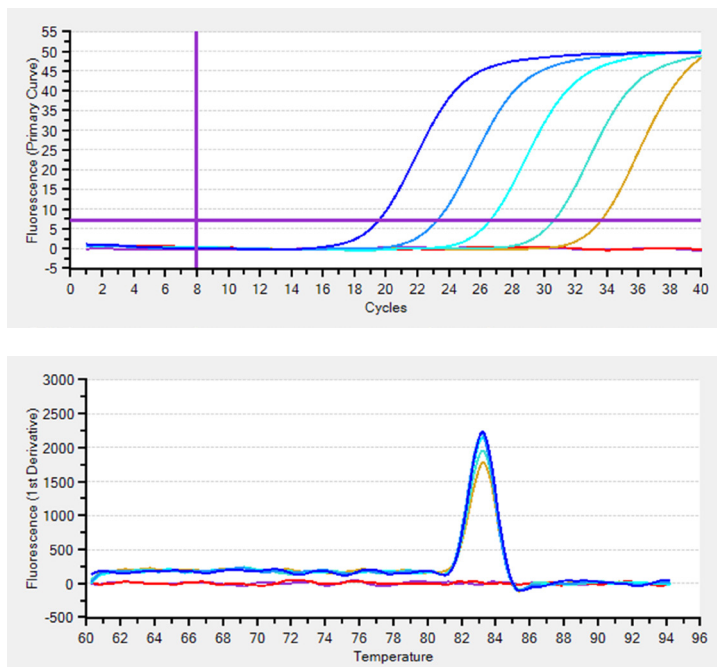
### 毒素原性大腸菌 STp 遺伝子 (S005)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、ネガティブコントロールにおいてわずかに非特異的増幅が生じましたが、融解曲線分析により目的の増幅産物と明確に区別できました。目的の増幅産物の  $T_m$  値平均は  $76.4^{\circ}\text{C}$  で、非特異的増幅の  $T_m$  値は  $72.3^{\circ}\text{C}$  でした。



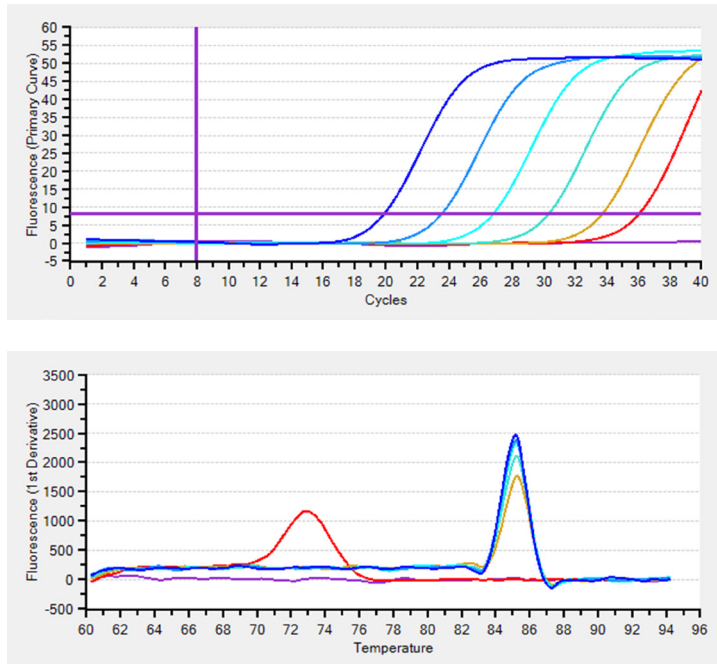
### 腸管出血性大腸菌 VT1 遺伝子 (S006)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、プライマーダイマー等の非特異的増幅は生じませんでした。また、融解曲線分析の結果、 $T_m$  値の平均は  $83.2^{\circ}\text{C}$  でした。



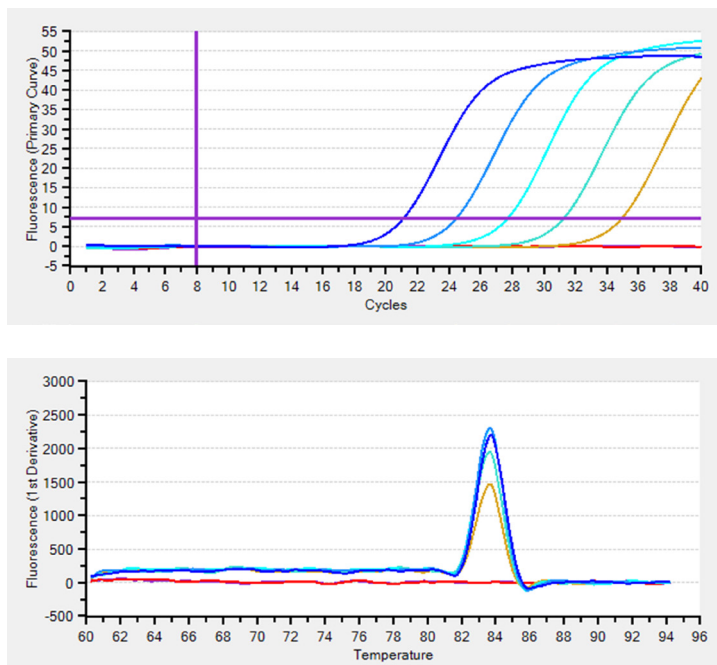
### 腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子 (S007)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、プラスミド DNA 5 コピーではわずかに非特異的増幅が生じましたが、融解曲線分析により目的の増幅産物と明確に区別できました。目的の増幅産物の Tm 値平均は 85.2°C で、非特異的増幅の Tm 値は 72.9°C でした。



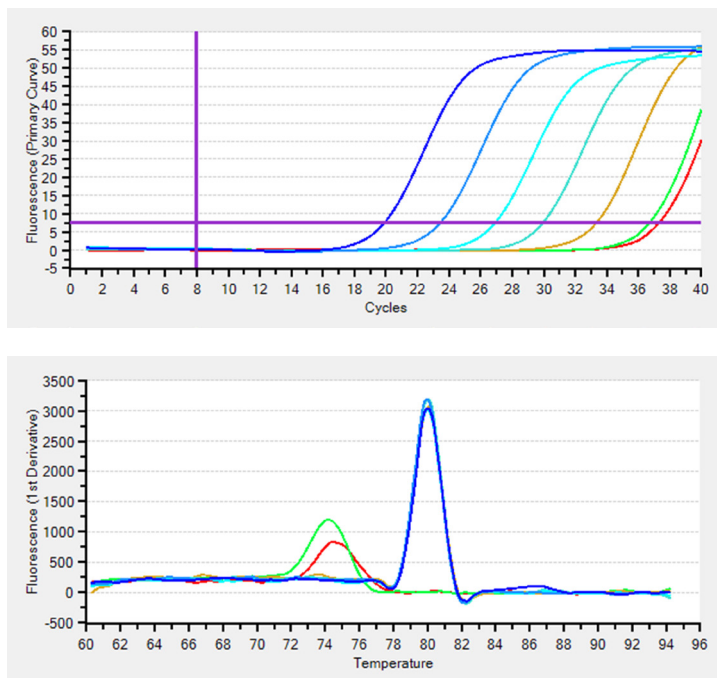
### 腸管出血性大腸菌 VT 遺伝子 (S008)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、プライマーダイマー等の非特異的増幅は生じませんでした。また、融解曲線分析の結果、Tm 値の平均は 83.7°C でした。



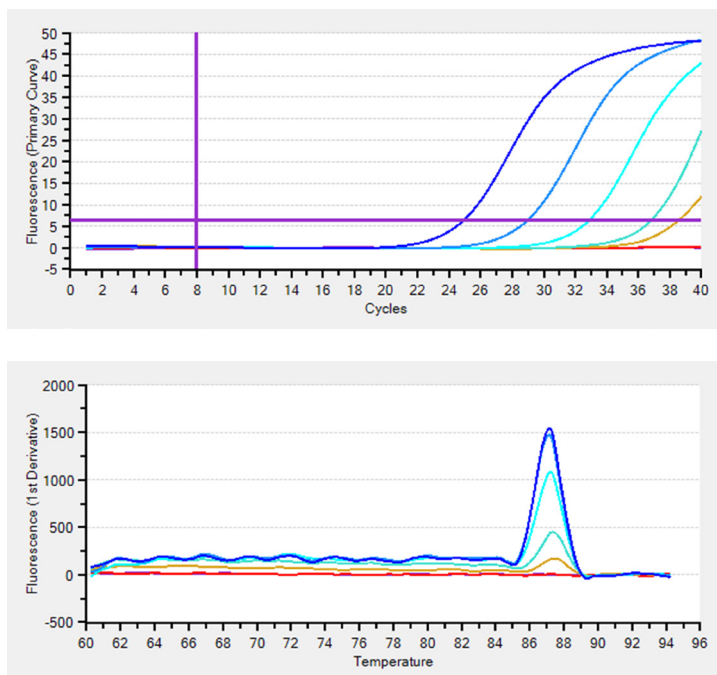
### 赤痢および腸管侵入性大腸菌 *invE* 遺伝子 (S016)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、ネガティブコントロールにおいてわずかに非特異的増幅が生じましたが、融解曲線分析により目的の増幅産物と明確に区別できました。目的の増幅産物の  $T_m$  値平均は  $80.0^{\circ}\text{C}$  で、非特異的増幅の  $T_m$  値は  $74.3^{\circ}\text{C}$  でした。



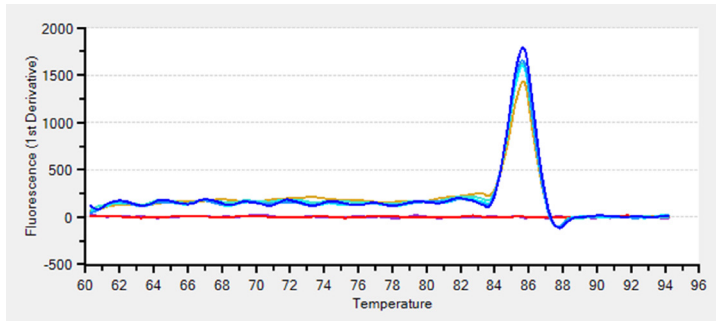
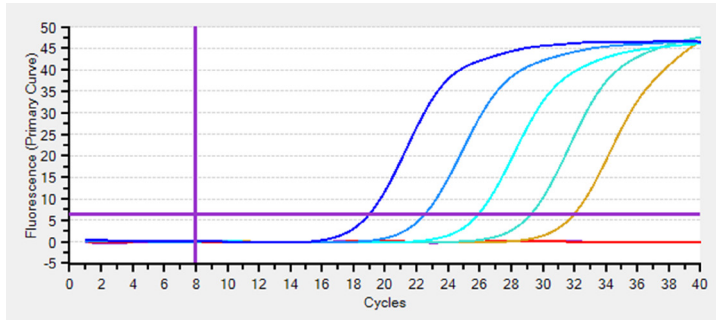
### 赤痢および腸管侵入性大腸菌 *ipaH* 遺伝子 (S017)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、プライマーダイマー等の非特異的増幅は生じませんでした。また、融解曲線分析の結果、 $T_m$  値の平均は  $87.1^{\circ}\text{C}$  でした。



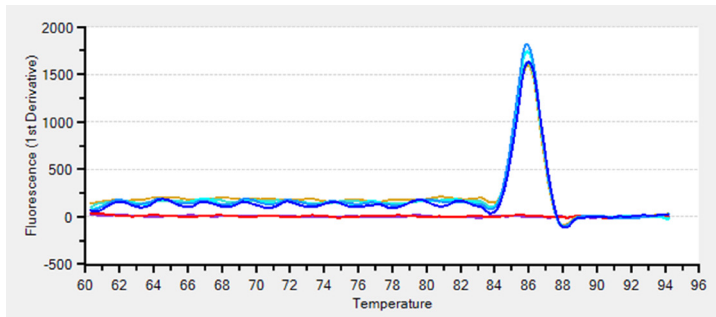
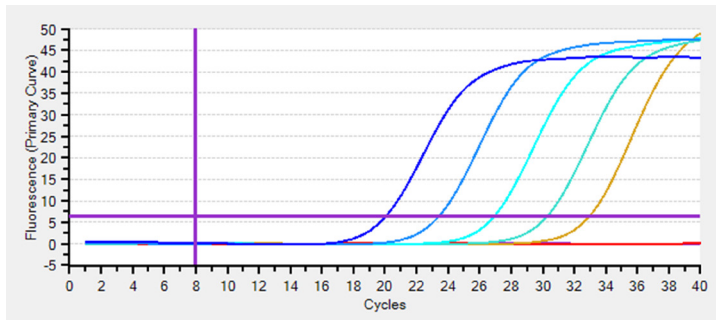
### サルモネラ菌 *invA* 遺伝子 (S018)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、プライマーダイマー等の非特異的増幅は生じませんでした。また、融解曲線分析の結果、 $T_m$  値の平均は  $85.6^{\circ}\text{C}$  でした。



### サルモネラ菌エンテロトキシン遺伝子 (S019)

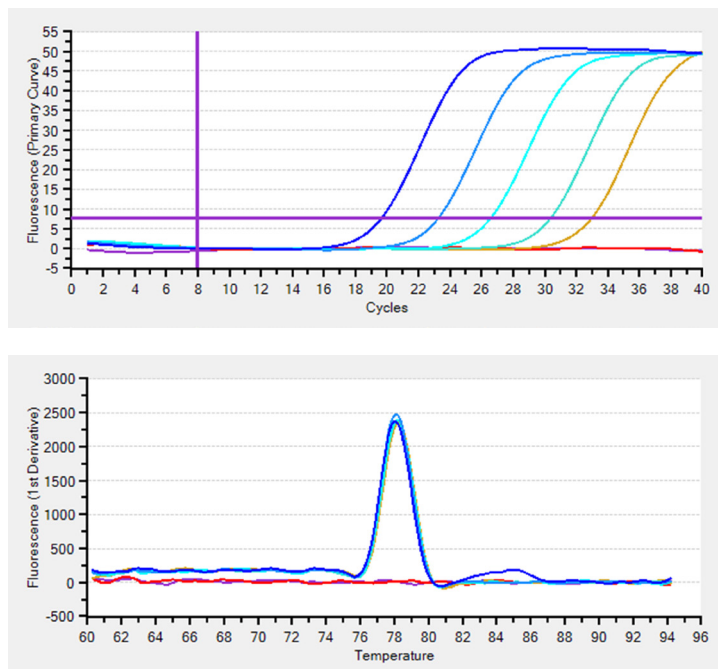
プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、プライマーダイマー等の非特異的増幅は生じませんでした。また、融解曲線分析の結果、 $T_m$  値の平均は  $86.0^{\circ}\text{C}$  でした。





## ウェルシュ菌毒素遺伝子 (S020)

プラスミド DNA 50 コピーまでの検出が可能で、プライマーダイマー等の非特異的増幅は生じませんでした。また、融解曲線分析の結果、 $T_m$  値の平均は  $78.1^{\circ}\text{C}$  でした。



※ この文書でご紹介したプラスミド DNA での検証の他に、S005 以外のプライマーについては、実際のゲノム DNA を鋳型とした検証も実施し、反応性が良好であることを確認しています。

※ Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ (製品コード TP800/TP850 : 終売) や Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* シリーズ (製品コード TP700/TP760 : 終売) でも同じ反応条件でお使い頂けます。



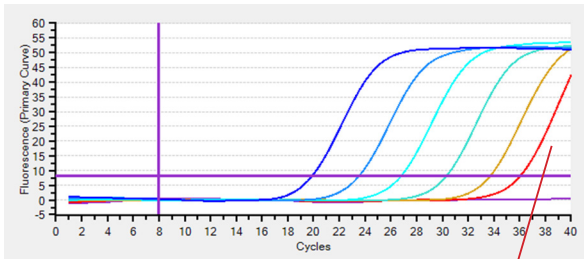
## 備考：Ct 値および Tm 値による Cut off 機能 (Thermal Cycler Dice Real Time System Software に搭載)

Thermal Cycler Dice Real Time System Software Ver.5.1 (または食品環境検査用ソフトウェア Ver.2.1) から搭載された新機能を用いて、Ct 値や Tm 値の Cut off 値を設定すると、その範囲に含まれないデータを解析から除外することができます。例えば、インターカレーター法によるプラス/マイナス判定においては、Tm 値の Cut off 設定により、非特異的増幅を陰性として判定することが可能になります。(本機能の詳しい操作方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書をご参照ください。)

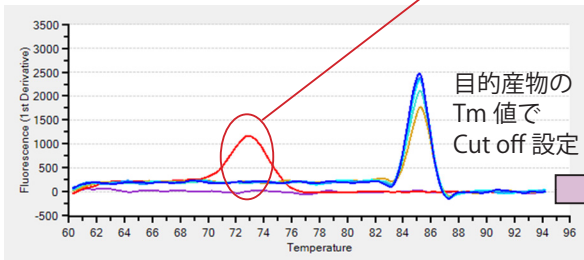
### <使用例>

#### 腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子 (S007)

融解曲線分析により目的の増幅産物の Tm 値は 85.2°C で、非特異的増幅産物の Tm 値は 72.9°C でした。目的産物の Tm 値で Cut off 設定を行うことにより、非特異的増幅を陰性として判定することができました。



非特異的増幅



Analysis Setting  To each target  
Filter FAM   
Target 6  
Cut off #1 Cut off #2 Cut off #3  
Cutoff Tm #1   
 Cutoff 85.2 ± 1.0

85.2 ± 1.0 に設定

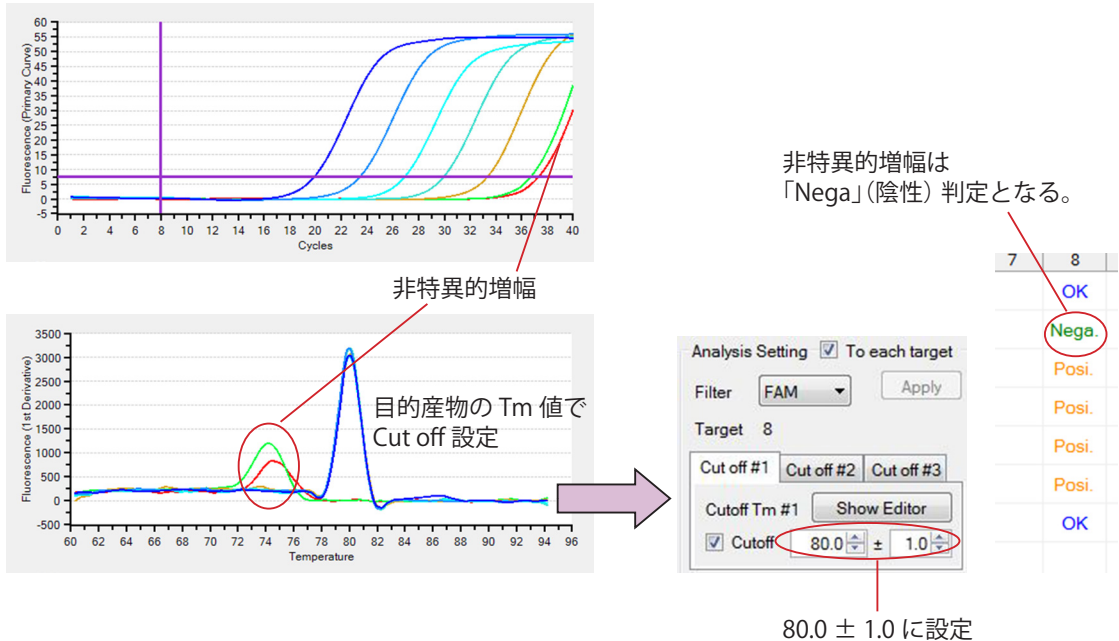
非特異的増幅は「Nega」(陰性) 判定となる。

4	5
	OK
	Nega
	Posi.
	Posi.
	Posi.
	Posi.
	OK

## 赤痢および腸管侵入性大腸菌 *invE* 遺伝子 (S016)

融解曲線分析により目的の増幅産物の Tm 値は 80.0°C で、非特異的増幅産物の Tm 値は 74.3°C でした。目的産物の Tm 値で Cut off 設定を行うことにより、非特異的増幅を陰性として判定することができました。

また、ネガティブコントロールにおいて非特異的増幅産物が生じた場合も、Tm 値の Cut off 設定を適切に行うと、非特異的増幅産物の Tm 値が Cut off の設定範囲外であれば、ネガティブコントロールが正しく判定され「OK」と表示されます。



※ネガティブコントロールにおいて非特異的増幅産物が生じた場合

Tm 値の Cut off 設定なしで解析を行うと、判定結果は「Out」と表示される。

Tm 値の Cut off 設定ありで解析を行うと、判定結果は「OK」と表示される。

7	8
	OUT
	Posi.
	Posi.
	Posi.
	Posi.
	Posi.
	OK

ネガティブコントロール

7	8
	OK
	Nega.
	Posi.
	Posi.
	Posi.
	Posi.
	OK

TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。  
Premix Ex Taq はタカラバイオ株式会社の商標です。

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 <https://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**