

製品コード RR102A

食品・環境分析用

Takara

O-157 (ベロ毒素遺伝子)
One Shot PCR Screening Kit Ver.2

説明書

v201901Da

O157:H7をはじめとする腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、血便と激しい腹痛を伴う出血性大腸炎、さらには溶血性尿毒症候群を引き起こす病原性大腸菌の一群です。これらの重篤な症状の原因は、EHEC が産生する細胞毒素であるベロ毒素です。EHEC の検出において、この毒素の産生能力の有無を的確に、かつ迅速にチェックする検査方法の重要性が指摘されています。

PCR 法は、ごく微量の DNA を鋳型 DNA として用いて、目的の遺伝子断片 (ターゲット DNA) のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、このサイクルを繰り返すことで、数時間のうちにターゲット DNA を 100 万倍にまで増幅させることができます。

このキットは、PCR 法を用いてベロ毒素遺伝子を持異的に検出することによって、EHEC を簡便に検出するための One Shot PCR Kit です。PCR に必要な試薬全てが 0.2 ml PCR tube に分注されており、サンプルを加えるだけで PCR 反応を開始することができます。また、DNA ポリメラーゼに従来の *Taq* より増幅効率の優れた *TaKaRa Ex Taq*® HS を用いることにより、より短時間で高感度の検出が可能になりました。

さらに、反応阻害などによる偽陰性を防ぐため、各 tube には PCR 反応の positive control となる Control template EC3 が含まれています。このテンプレートを鋳型にした場合の増幅産物は、ベロ毒素遺伝子由来の増幅産物とサイズが大きく異なるので、電気泳動による判定を容易に行うことができます。

I. 内容 (50 μ l 反応系、48 回分)

2 \times One Shot PCR solution tube (無色の 0.2 ml PCR tube) 25 μ l \times 48

【2 \times One Shot PCR solution tube に含有されているもの】

• PCR primer EVC-1 & 2

< 標的遺伝子 > 以下の腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子を増幅する。
VT1, VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vp1

< 増幅サイズ > 171 bp

• Control template EC3

PCR 反応が正常に行われていることを確認するための Positive control template であり、この template を鋳型にして primer EVC-1 & 2 で PCR を行うと、685 bp の増幅産物が得られる。

• *TaKaRa Ex Taq* HS

TaKaRa Ex Taq HS は、抗 *Taq* 抗体と *TaKaRa Ex Taq* を混合したもので、ホットスタート PCR 用の酵素である。高温に加熱するまでは抗 *Taq* 抗体が酵素に結合し、ポリメラーゼ活性を抑えているため、サイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができる。ベロ毒素遺伝子の検出に有効である。

• *Ex Taq*™ Buffer

• dNTP Mixture

II. 保存

– 20°C

各コンポーネントには *TaKaRa Ex Taq* HS が含まれていますので、激しい攪拌操作はできるだけ避けてください。

また、凍結融解により反応性が低下する場合がありますので、使用する tube のみ融解してください。

III. 原理

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法とは、

DNA 鎖の熱変性 (denaturation step)
プライマーのアニーリング (annealing step)
ポリメラーゼによる伸長反応 (extension step)

を繰り返し行うことによりチューブ内で DNA を増幅する方法です (図 1 参照)。この方法を用いると、DNA を数時間で少なくとも 100 万倍に増幅できます。

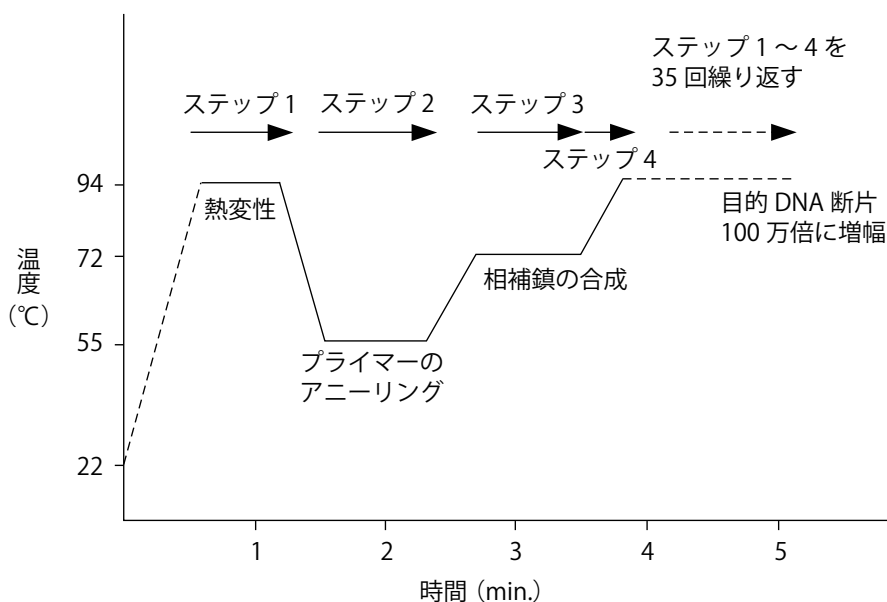


図 1. PCR による DNA 増幅の工程

ステップ 1: プライマー、dNTP、ポリメラーゼを含んだ反応液中で、目的とする 2 本鎖 DNA 断片を熱変性する (94°C、1 分)

ステップ 2: 熱変性により生じた 1 本鎖鋳型 DNA にプライマーをアニーリングする (55°C、1 分)

ステップ 3: DNA ポリメラーゼを用いて相補鎖 DNA を合成する (72°C、1 分)

ステップ 4: 増幅産物としての 2 本鎖 DNA を再度熱変性して 1 本鎖にする (ステップ 1 に戻る)

ステップ 1~4 を 1 サイクルとして、35 サイクル繰り返す。

IV. キット以外に必要な試薬、機器

本キット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. 滅菌精製水
2. アガロースゲル
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
3. 電気泳動用 buffer
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3 (製品コード T9131)
または TBE (Tris-borate-EDTA) powder (製品コード T905)
4. DNA マーカー
pHY Marker (製品コード 3404A/B)
または ϕ X174-*Hinc* II digest (製品コード 3406A/B)
または 100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)
5. Loading buffer (6 × : 36% glycerol, 0.05% bromophenol blue, 0.035% xylene cyanol, 30 mM EDTA) (注：4. DNA マーカーに添付されている)
6. DNA 染色剤
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
またはエチジウムブロマイド

【機器】

1. ヒートブロック (95°C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-2 plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)
5. UV トランスイルミネーター (300 nm 前後のもの)
6. 電気泳動ゲル撮影装置 (SYBR Green I を使用する場合は専用のフィルターが必要です。)

【その他】

1. 1.5 ml チューブまたは 0.2 ml PCR tube
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200) など
2. 200 μ l & 20 μ l マイクロピペット
3. マイクロピペット用チップ
4. アガロースゲル染色用トレイ (SYBR Green I を使用する場合はポリプロピレン製容器を使用してください。)

V. 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。

VI. 操作上の注意

- 1) 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。(手袋・マスク着用等)
- 2) 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(X. 補足：エリア分けについてを参照)。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以外では増幅産物の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。

VII. 方法：菌体熱抽出サンプルからの検出例

1. 菌体熱抽出サンプルの調製 (エリア2で実施)

【調製方法-I】

1. 増菌培養液 4 μ l を 1.5 ml tube に、または 2 μ l を 0.2 ml PCR tube に採る。
2. 滅菌水を 1.5 ml tube の場合は 196 μ l、0.2 ml tube の場合は 98 μ l 加えて混合する。
3. 95℃で5分間熱処理する。(0.2 ml PCR tube の場合は TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice を利用すると簡便に行うことができる。)
4. 遠心分離 (12,000 rpm、4℃、10分) し、上清を回収する。これを熱抽出サンプルとして 25 μ l を PCR 反応に用いる。さらに感度を上げたい場合は、【調製方法-II】をお試しください。

【調製方法-II】

1. 増菌培養液 (ノボビオシン加 mEC 培地など) 1 ml を 1.5 ml tube に採る。
2. 遠心分離 (5,000 rpm、4℃、5分) し、上清を捨てる。
3. 沈殿物 (菌体など) に滅菌水 100 μ l を加えて懸濁する。
4. 95℃で5分間熱処理する。
5. 遠心分離 (12,000 rpm、4℃、5分) し、上清を回収する。これを熱抽出サンプルとして 25 μ l を PCR 反応に用いる。

★ この方法で調製した熱抽出サンプルを用いて PCR を行ったときに反応が阻害されるようであれば、以下の (1) あるいは (2) (または (1) と (2) の組み合わせ) の手法を試してください。

(1) 滅菌水で懸濁する前の沈殿物 (菌体など) を PBS Buffer で 2、3 回洗浄する (Buffer 500 μ l で懸濁→遠心→上清を捨てるを 2、3 回繰り返す)。

(2) 調製した熱抽出サンプルの 10 倍希釈液、100 倍希釈液 (希釈は滅菌精製水を使用) を調製し、その 25 μ l を PCR 反応に用いる。

※ 増菌培養液は、それぞれ適当な標準プロトコールに従って食品サンプルから調製したものを用いる。また、熱抽出サンプルは -20℃で保存可能である。

2. PCR 反応

- (1) 2 × One Shot PCR solution tube に調製した熱抽出サンプルを 25 μ l 添加する。
(エリア 3 で実施)
Negative control として、滅菌精製水を 25 μ l 加えたものを 1 本用意する。
(エリア 1 で実施)
- (2) 各チューブのキャップをしっかりと閉め、サーマルサイクラーにセットして PCR 反応を開始する。

94°C	1 分	}	35 サイクル	※ 反応は約 2.5 時間で終了する。 反応後のサンプルは 4°C、または - 20°C で保存可能である。
55°C	1 分			
72°C	1 分			
↓				
72°C	10 分		1 サイクル	

※ TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice を使用する場合は、以下の条件でも上記条件とほぼ同等の反応性が得られます。

98°C	10 秒	}	35 サイクル
55°C	10 秒		
72°C	10 秒		
↓			
72°C	30 秒		

3. アガロースゲルの作製

- (1) 三角フラスコに電気泳動用 buffer を入れ、PrimeGel Agarose PCR-Sieve を 3% (w/v) になるように攪拌しながらゆっくり加える。
- (2) 電子レンジで 2 ~ 3 分加熱する。取り出してよく攪拌し、アガロース溶液が均一に溶解していることを確認する。均一に溶解するまで加熱・攪拌を繰り返す。
- (3) ゲル板の準備をする。
- (4) アガロースゲルが 50 ~ 60°C に冷めたらゲル板にアガロースを注ぎ、サンプルを注入するスロットを作製するためにコームを差し込み、30 分 ~ 1 時間室温で放置して、ゲルを固める。

【エチジウムブロマイド先染めの場合】
ゲル溶液が 50 ~ 60°C に冷めたら最終濃度 0.5 μ g/ml になるようにエチジウムブロマイド水溶液を加え、均一になるよう穏やかに攪拌した後、ゲル板に注ぐ。30 分 ~ 1 時間室温で放置してゲルを固める。
- (5) ゲルが破れないように注意しながらゆっくりとコームを抜き取る。
- (6) アガロースゲルを泳動槽にセットし、ゲルが充分浸かるまで電気泳動 buffer を泳動槽に加える。

4. 電気泳動 (エリア 4 で実施)

- (1) 電極を +、- を間違えないように接続する。(PCR で増幅した核酸は負に荷電しており、 $- \rightarrow +$ に泳動される。)
- (2) PCR 反応終了後の各反応液 10 μ l に 2 μ l の Loading buffer を加えて混合し、マイクロピペットを用いてゆっくりとゲルのスロットに注入する。(両端のスロットには DNA マーカーを適量注入する。)
- (3) 50 ~ 150 V の定電圧をかけ、bromophenol blue (速く泳動する色素) がコームから 3 ~ 4 cm に移動するまで電気泳動する。

5. 染色バンドの確認 (エチジウムブロマイド先染めの場合は (3) のみでよい)

- (1) ゲルが充分浸せる量の 1 μ g/ml のエチジウムブロマイド水溶液、または SYBR Green I 溶液 (TBE buffer または電気泳動 buffer で 10,000 倍希釈したもの) を調製し、アガロースゲル染色用トレイに入れておく。
- (2) 電気泳動したゲルをトレイに入れ 20 ~ 30 分静置する。
- (3) UV トランスイルミネーターにゲルをセットして写真を撮影し*、DNA マーカーと照らし合わせ、核酸のバンドの有無とサイズを確認する。

* : SYBR Green I 溶液を使用する場合は、専用フィルターを用いる。

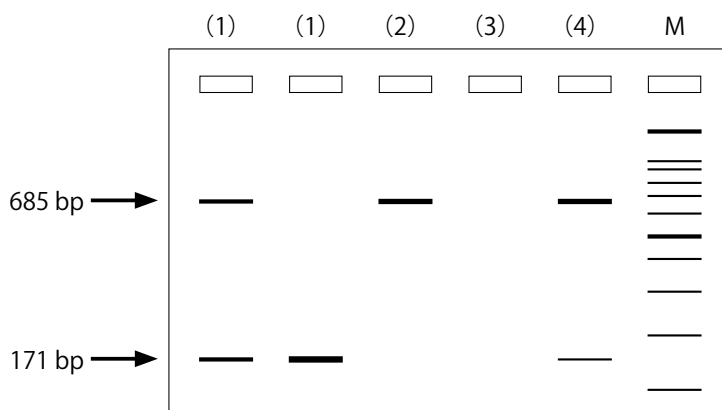
操作上の注意

エチジウムブロマイド、SYBR Green I 溶液を扱う場合、およびこれら DNA 染色剤で染色したゲルを取り扱う場合は、必ず手袋を着用し、直接液が触れないようご注意ください。

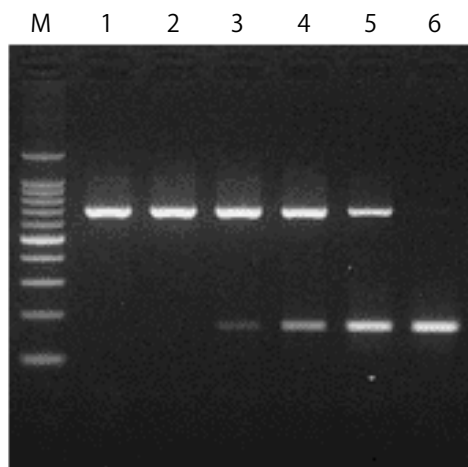
VIII. 判定

サンプル中にベロ毒素遺伝子が存在すれば、171 bp の増幅産物 (バンド) が検出されます。Positive control (Control template) では 685 bp のバンドが検出されます。

電気泳動結果	判定
(1) 171 bp のバンドが検出された。	Positive control のバンドの有無に関わらず、ベロ毒素遺伝子陽性である。 (ベロ毒素遺伝子が多量に存在する場合、Positive control のバンドは消失する。)
(2) 171 bp のバンドが検出されず、かつ Positive control のバンドが検出された。	ベロ毒素遺伝子は検出限界以下である。
(3) 何もバンドが検出されない。	陽性、陰性を確定できない。何らかの原因で PCR 反応が正常に行われていない可能性が高いので、再度 PCR を行う。
(4) Negative control のレーンに 171 bp のバンドが検出された。	コンタミネーションを起こしていると考えられる。反応液調製場所および使用した機器を除染したうえで再度検出を行う。



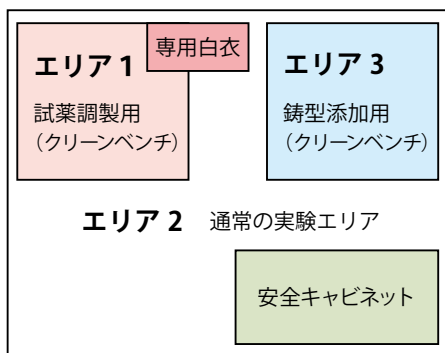
IX. 実施例



- M. 100 bp DNA Ladder
- 1. Negative Control
- 2. 1 cell/tube
- 3. 10^1 cells/tube
- 4. 10^2 cells/tube
- 5. 10^3 cells/tube
- 6. 10^4 cells/tube

3% Agarose gel (EtBr 先染め) で電気泳動

X. 補足：エリア分けについて



- 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。

XI. 参考文献

- 1) Takao, T., 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 (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin, *Microb Pathog.* (1988) **5**:357-369.
- 2) Jackson, M. P., R. J. Neill, A. D. O' Brien, R. K. Holmes, and J. W. Newland Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural gene 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) Ito, H., A. Terai, H. Kurokawa, 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 haemolytic uremic syndrome, *Microb Pathog.* (1990) **8**:47-60.
- 4) Weinstein, D. L., 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.

XII. 関連製品

PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50x Powder, pH8.3 (製品コード T9131)
TBE (Tris-borate-EDTA) powder (製品コード T905)
pHY Marker (製品コード 3404A/B)
 ϕ X174-*Hinc* II digest (製品コード 3406A/B)
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)
Mupid-2 plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)

XIII. 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。
- *TaKaRa Ex Taq*、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。*Ex 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