

製品コード RR105A

食品・環境分析用

Takara

O-157 (ベロ毒素 1 型、2 型遺伝子) PCR Typing Set

説明書

本製品を用いる検出方法は、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」(食安監発 1120 第 1 号) に記載されました。

v202012Da

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によるものです。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 を鋳型として用いて、目的の遺伝子断片 (Target 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 Target DNA を 100 万倍にまで増幅させることができます。

本製品は、O-157 に代表される腸管出血性大腸菌による食中毒の原因遺伝子であるベロ毒素 1 型、2 型遺伝子を PCR 法で検出することにより、腸管出血性大腸菌の検出とタイピングを簡便にかつ迅速に行うための試薬セットです。

※ 本製品を用いる検出方法は、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」(食安監発 1120 第 1 号) に収載されました。

I. 内容 (100 検体用、50 μ l 反応系)

1. DNA Primer EVT-1* (19 pmol/ μ l ; VT1 用)	53 μ l
2. DNA Primer EVT-2* (19 pmol/ μ l ; VT1 用)	53 μ l
3. DNA Primer EVS-1* (19 pmol/ μ l ; VT2 用)	53 μ l
4. DNA Primer EVS-2* (19 pmol/ μ l ; VT2 用)	53 μ l
5. <i>TaKaRa Ex Taq</i> [®] (5 U/ μ l)	50 μ l
6. 10 × <i>Ex Taq</i> [™] Buffer (Mg ²⁺ plus)	1.0 ml
7. dNTP Mixture (各 2.5 mM)	800 μ l
8. Control Template EC2 (0.1 ng/ μ l ; VT1 用)	10 μ l
9. Control Template EC3 (0.1 ng/ μ l ; VT2 用)	10 μ l

* : (株) 島津製作所で製造されたものです。

[DNA Primer EVT-1 & EVT-2、EVS-1 & EVS-2 について]

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

* : 別途販売している Primer Set の製品コードです。

[Control Template EC2 & EC3 について]

それぞれの Primer を用いて腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子検出 PCR を行う際に、PCR 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。Control Template EC2 を鋳型に Primer EVT-1 & EVT-2 で PCR を行うと、686 bp の増幅産物が得られる。また、Control Template EC3 を鋳型に Primer EVS-1 & EVS-2 で PCR を行うと、686 bp の増幅産物が得られる。ベロ毒素遺伝子由来の増幅産物とサイズが異なるので、万一、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る。

II. 保存 −20℃

III. 本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）

本製品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. 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
100 bp DNA Ladder（製品コード 3407A/B）
 ϕ X174-*Hinc* II digest（製品コード 3406A/B）
pHY Marker（製品コード 3404A/B）など
5. Loading buffer（6 × : 36% glycerol、0.05% bromophenol blue、0.035% xylene cyanol、30 mM EDTA）（4. に記載の DNA マーカーには添付されている。）
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℃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）など
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）など
5. UV トランスイルミネーター（300 nm 前後のもの）
6. 電気泳動ゲル撮影用装置（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. PCR 用チューブ
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap（製品コード NJ200）など
2. 200 μ l & 20 μ l マイクロピペット
3. マイクロピペット用チップ
4. ポラロイドフィルム
5. 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。）

IV. 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 *in vitro* 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。

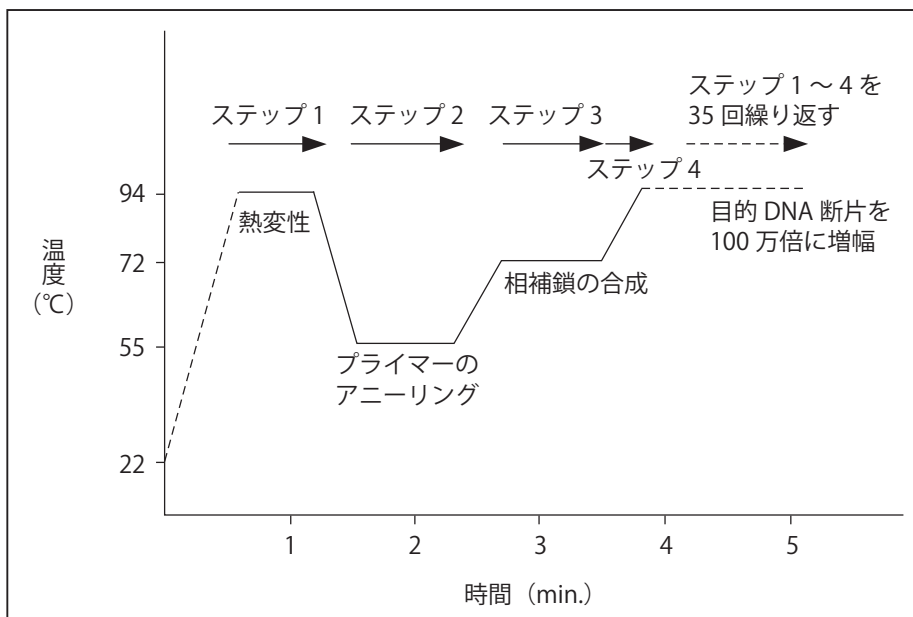


図 1. PCR による DNA 増幅の工程

- 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。

V. 使用上の注意

- ・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、正確な検出ができません。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：検出例

A. 菌体アルカリ熱抽出サンプルの調製例 (エリア2で実施)

食品培養液*からの腸管出血性大腸菌の DNA 抽出には、下記のアルカリ熱抽出法を推奨します。

【アルカリ熱抽出法】

食品培養液 100 μ l を 1.5 ml または 2.0 ml 容量のねじ口チューブに採取する。



- ← 10,000 $\times g$ 、10 分間遠心して上清を除く。
- ← 沈渣に 50 mM NaOH Solution (滅菌済み) を 85 μ l 添加し、100°C で 10 分間加熱処理する。
- ← 1 M Tris-HCl (pH7.0) (滅菌済み) を 15 μ l 加えて中和する。
- ← 2,000 ~ 10,000 $\times g$ 、10 分間遠心する。

上清を検体とする。

*：食品培養液は、それぞれ適切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お使いください。

B. PCR 反応

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
必要本数 + α 分の反応液をそれぞれまとめて調製し、各反応チューブに 45 μ l ずつ分注し、軽くふたをする。
VT1、VT2 の検出でそれぞれに必要な本数は、サンプル数 + 2 本 (陰性コントロール、陽性コントロール) と設定する。

< VT1 の検出 >		< VT2 の検出 >	
試薬	使用量	試薬	使用量
10 × <i>Ex Taq</i> Buffer	5 μ l	10 × <i>Ex Taq</i> Buffer	5 μ l
dNTP Mixture	4 μ l	dNTP Mixture	4 μ l
EVT-1 Primer	0.5 μ l	EVS-1 Primer	0.5 μ l
EVT-2 Primer	0.5 μ l	EVS-2 Primer	0.5 μ l
<i>TaKaRa Ex Taq</i>	0.25 μ l	<i>TaKaRa Ex Taq</i>	0.25 μ l
滅菌精製水	34.75 μ l	滅菌精製水	34.75 μ l
Total	45 μ l	Total	45 μ l

2. 以下の各チューブに滅菌精製水を加える。(エリア 1 で実施)

VT1 および VT2 の陰性コントロール：滅菌精製水 5 μ l

VT1 および VT2 の陽性コントロール：滅菌精製水 4.5 μ l

3. 菌体抽出サンプル、Control Template を添加する。(エリア 3 で実施)

- ・ 菌体抽出サンプル
陰性コントロール、陽性コントロール以外の各チューブに菌体抽出サンプルを 5 μ l 加え、しっかりとふたをする。
- ・ VT1 の陽性コントロール
Control Template EC2 を 0.5 μ l 加え、しっかりとふたをする。
- ・ VT2 の陽性コントロール
Control Template EC3 を 0.5 μ l 加え、しっかりとふたをする。

4. PCR チューブを卓上遠心機で遠心し、PCR サーマルサイクラーにセットして PCR 反応を開始する。

PCR 条件： $\left. \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 1 \text{分} \\ 55^{\circ}\text{C} \quad 1 \text{分} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 1 \text{分} \end{array} \right\} 35 \text{ サイクル}$
↓
72 $^{\circ}$ C 10分 1 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 $^{\circ}$ C、または -20 $^{\circ}$ C で保存可能。

5. 反応終了後、反応液 10 μ l をアガロースゲル電気泳動する。(エリア 4 で実施)
VT1 および VT2 の陽性コントロールでは、どちらも 686 bp の増幅産物が検出される。

C. アガロースゲルの作製

1. 大きめの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、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℃ 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℃ に冷めたら最終濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ になるようにエチジウムブロマイド水溶液を加え、均一になるように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、ゲルが充分つかるまで電気泳動 buffer を泳動槽に加える。

D. 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。(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 μl に 2 μl 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。

E. 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下記の 3. のみでよい)

1. 1 $\mu\text{g/ml}$ 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) をゲルが充分浸せる量を調製し、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。
[エチジウムブロマイドで染色した場合は、染色後精製水で脱色する (ゲルを精製水を入れたトレイに入れ 20 ~ 30 分静置する) とバックグラウンドを下げることができる。]
3. UV トランスイルミネーターにゲルをセットし、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 を使用する場合は、専用フィルターを用いてください。

操作上の注意

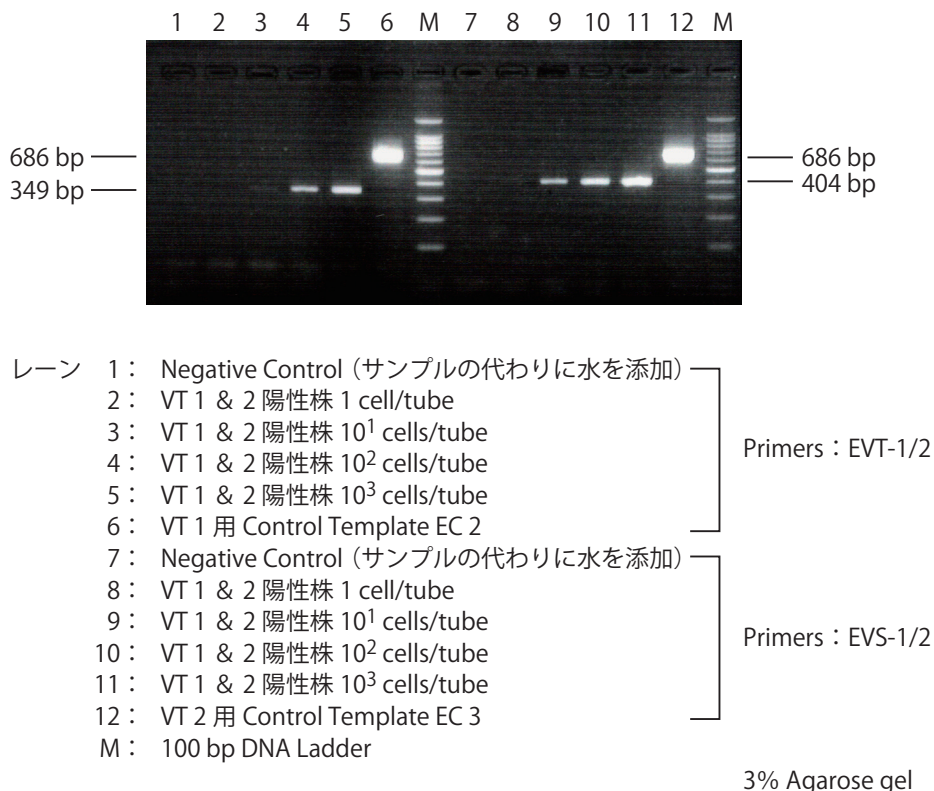
エチジウムブロマイド、SYBR Green I を扱う場合、およびこれら DNA 染色剤で染色したゲルを取り扱う場合は、必ず手袋を着用し、直接液が触れないようご注意ください。

VIII. 判定

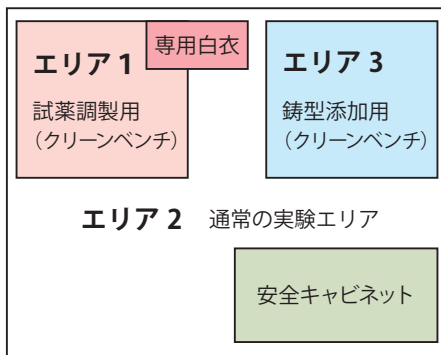
サンプル中にベロ毒素 1 型遺伝子が存在すると、349 bp の増幅産物（バンド）が検出され、ベロ毒素 2 型遺伝子または 2 型の変異遺伝子が存在すると、404 bp の増幅産物が検出される。また、Positive Control ではどちらも 686 bp のバンドが検出される。

電気泳動結果	判定
1. Primer EVT-1/2 を使用した場合、サンプルのレーンに 349 bp のバンドが認められる。	Positive Control のバンドの有無にかかわらず、ベロ毒素 1 型遺伝子 (VT1) 陽性である。
2. Primer EVS-1/2 を使用した場合、サンプルのレーンに 404 bp のバンドが認められる。	Positive Control のバンドの有無にかかわらず、ベロ毒素 2 型遺伝子 (VT2) または 2 型の変異遺伝子 (VT2vha、VT2vhb、VT2vp1) 陽性である。
3. サンプルのレーンに 349 bp または 404 bp のバンドが認められず、かつ Positive Control のバンド (686 bp) が検出された。	ベロ毒素遺伝子は検出限界以下である。
4. サンプル、Positive Control いずれのレーンに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。
5. Negative Control のレーンに 349 bp もしくは 404 bp のバンドが認められる。	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、試薬等を除染したうえで再度検出を行う。

IX. 実施例



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) 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 (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 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) H Ito, 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 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.* (1955) **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大腸菌の検出法の検討 防菌防黴誌 (1999) **27**: 441-446.

XII. 関連商品

O-157 (ベロ毒素 1 型、2 型遺伝子) PCR Typing Set Plus (製品コード RR122A)
EHEC (VT gene) PCR Screening Set (製品コード RR120A)
EHEC (O antigens) PCR Typing Kit (製品コード RR133A)
O-157 (ベロ毒素遺伝子) One Shot PCR Screening Kit Ver.2 (製品コード RR102A)
O-157 (ベロ毒素 1 型、2 型遺伝子) One Shot PCR Typing Kit Ver.2 (製品コード RR106A)
腸管出血性大腸菌 VT1 遺伝子検出用 Primer Set EVT-1&2 (製品コード S006)
腸管出血性大腸菌 VT2 遺伝子検出用 Primer Set EVS-1&2 (製品コード S007)
腸管出血性大腸菌 VT 遺伝子検出用 Primer Set EVC-1&2 (製品コード S008)
特殊細菌検出用 Primer Set (製品コード S001 ~ S028)
特殊細菌検出用 Positive Control Template (製品コード S031 ~ S046)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)
pHY Marker (製品コード 3404A/B)
 ϕ X174-*Hinc* II digest (製品コード 3406A/B)
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
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)

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

タカラバイオ株式会社