

製品コード RR109A

食品・環境分析用

Takara

**毒素原性大腸菌 (LT gene)
One Shot PCR Kit**

説明書

v201901Da

毒素原性大腸菌 (EPEC) は、耐熱性エンテロトキシン (ST) または易熱性エンテロトキシン (LT) と呼ばれる毒素の両方、またはいずれか一方を産生する大腸菌で、1960 年代後半～70 年代に明らかにされた菌です。EPEC の検出において、これら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が望まれています。

本キットは EPEC による食中毒の原因遺伝子である易熱性エンテロトキシン遺伝子 (LT gene) を PCR 法で簡便にかつ迅速に検出を行うための One Shot PCR Kit です。

PCR 法は、ごく微量の DNA を鋳型として、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ルリング、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。

この製品は、PCR に必要な試薬すべてが 0.2 ml PCR tube に分注されており、サンプルをチューブに添加するだけで 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 を採用しており、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判定を防ぐためのインターナルコントロール DNA が含まれています。このインターナルコントロール DNA 由来の増幅産物は、LT 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確実に行うことができます。

I. 内容 (48 回分、50 µl 反応系)

2 × One Shot PCR solution tube (無色の 0.2 ml PCR tube) 25 µl × 48

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

• Primer Set ELT-1 & 2

(標的遺伝子) 易熱性エンテロトキシン (LT) 遺伝子を増幅検出します。
(増幅サイズ) 263 bp

• インターナルコントロール DNA

(増幅サイズ) 690 bp

ターゲット遺伝子とは異なる配列を有する DNA 分子で、偽陰性の判定を目的としています。すべての反応系に存在させることで、ターゲットが不検出の場合、インターナルコントロール DNA の検出ができていれば、PCR 反応阻害が起こらず検出限界以下と判定できます。ターゲット、インターナルコントロール DNA とともに不検出の場合は PCR 反応が正常に進まなかったことがわかります。なお、ターゲットの DNA 量が多い場合、そのターゲットの増幅反応が優先され、インターナルコントロール DNA の検出ができないことがあります。この場合、ターゲット遺伝子の検出が正しくなされており、陽性であると判定できます。単品販売している特殊細菌検出用 Positive Control Template EC1 (製品コード S032) を用いた場合と同じサイズの増幅産物が得られます。

• *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 用の酵素です。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ます。

• *Ex Taq*™ Buffer

• dNTP Mixture

II. 保存

– 20℃

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チューブの試薬のみ融解してください。

III. 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
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)
5. Loading buffer (6 × :36% glycerol, 0.035% 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)
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 (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。)

IV. 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。

V. 操作上の注意

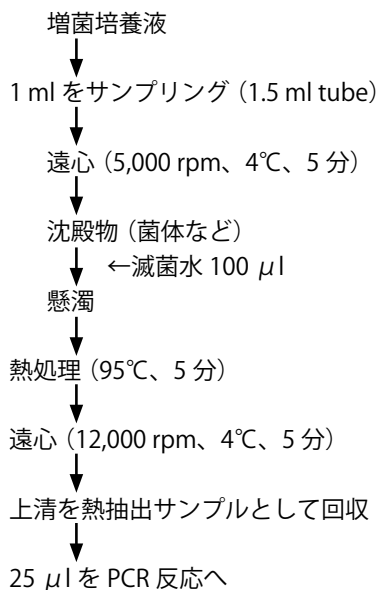
1. 万一、プライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。
2. 反応液の調製から検出まで、次の4つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (IX. 補足：エリア分けについてを参照)。コンタミネーション発生の原因となりますので、エリア4以外では増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア1：PCR 反応液の調製、分注を行います。
 - エリア2：検体の調製 (DNA 抽出等) を行います。
 - エリア3：PCR 反応液へ鋳型 DNA の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

VI. サンプルの調製 (エリア2で実施)

1. 菌体熱抽出サンプルの調製 - I
 - 1) 増菌培養液 4 μ l を 1.5 ml tube、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 を加えて混合する。
 - 3) 95℃で5分間熱処理する。(0.2 ml PCR tube の場合は TaKaRa PCR Thermal Cycler 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する。

さらに感度を上げたい場合は、次の2.の調製方法をお試しください。

2. 菌体熱抽出液の調製方法 - II



※ 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 で 2、3 回洗浄する。
(PBS 500 μl 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 (希釈は滅菌精製水でよい) を調製し、その 25 μl 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°C で保存可能である。

VII. PCR 反応液調製と反応例

1. 反応液調製・反応条件

正しい検出結果を得るために Negative control 反応を行ってください。

1) 2 × One Shot PCR solution tube に調製した熱抽出サンプルを 25 μl 添加する。
(エリア 3 で実施)

Negative control として、滅菌精製水を 25 μl 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。

【PCR 条件】 94°C 2 min.
↓
94°C 30 sec. }
55°C 1 min. } 40 cycles
72°C 1 min. }

※ 反応は約 3 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。

2. 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℃ に冷めたらゲル板にアガロース溶液を注ぎ、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、十分に固める。
(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 時間室温放置して十分に固める。
- 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、ゲルが充分わかるまで電気泳動 buffer を泳動槽に加える。

3. 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 5 μl に 1 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 マーカーを適当量注入する。)
- 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。

4. 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) のみで良い)

- 1) ゲルが充分浸せる量の 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 (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、増幅産物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扱う場合は、必ず手袋を着用し、直接液が触れないようにご注意ください。

5. 使用上の注意

100 bp 弱の位置に非特異的バンドがみられることがありますが、非特異的増幅によるものなので判定には関係ありません。増幅フラグメントのサイズを正確に確認するために、PCR 反応後の電気泳動は適切な泳動距離になるまで行ってください。

VIII. 判定

サンプル中に易熱性エンテロトキシン遺伝子 (LT gene) が存在すれば、263 bp の増幅産物 (バンド) が検出されます。インターナルコントロールは、690 bp の増幅産物が検出されます。

サンプル反応の結果は、Negative control 反応結果と照らし合わせて判定してください。

[Negative control 反応の電気泳動結果]

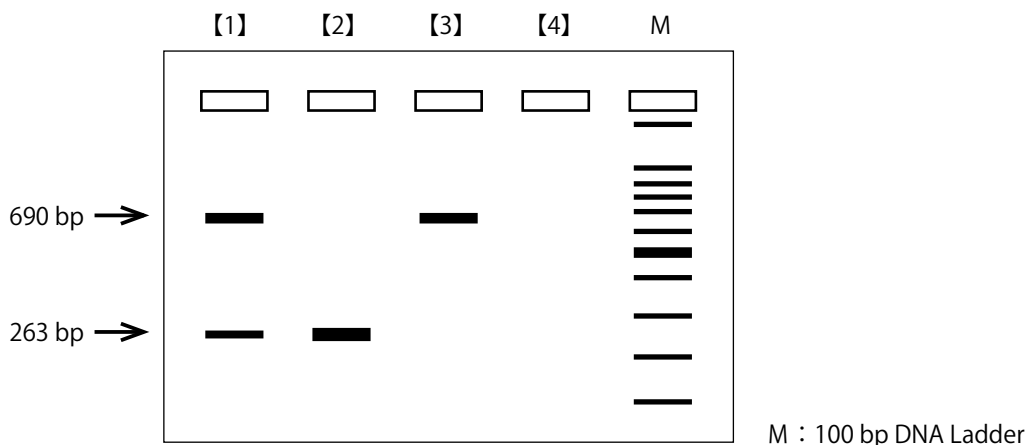
	インターナルコントロール由来増幅産物 (690 bp) が検出されない。	インターナルコントロール由来増幅産物 (690 bp) が検出された。
LT 遺伝子由来増幅産物 (263 bp) が検出されない。	PCR 反応が正常に進まなかった。 ^{*1} 【4】	コンタミネーションを起こさず、正しく PCR 反応が進んだ。【3】
LT 遺伝子由来増幅産物 (263 bp) が検出された。	コンタミネーションを起こしていると考えられる。 ^{*2} 【2】	コンタミネーションを起こしていると考えられる。 ^{*2} 【1】

[サンプル反応の電気泳動結果]

	インターナルコントロール由来増幅産物 (690 bp) が検出されない。	インターナルコントロール由来増幅産物 (690 bp) が検出された。
LT 遺伝子由来増幅産物 (263 bp) が検出されない。	PCR 反応が正常に進まなかった。 ^{*1} 【4】	LT 遺伝子は検出限界以下である。【3】
LT 遺伝子由来増幅産物 (263 bp) が検出された。	LT 遺伝子陽性である。 ^{*3} 【2】	LT 遺伝子陽性である。 ^{*3} 【1】

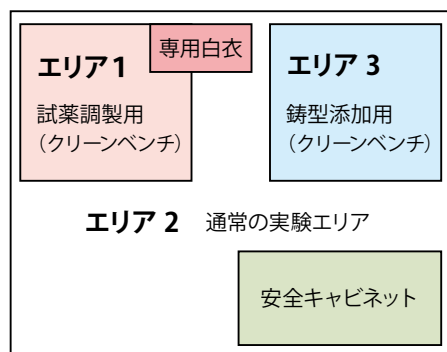
【1】～【4】は、下図のレーンをご参照ください。

- * 1 : 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反応を行う。
- * 2 : 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すべてのサンプルで再度反応を行う。
- * 3 : Negative control 反応の結果が正しい結果が得られた場合に LT 遺伝子陽性と判定される。



※ 100 bp 弱の位置に非特異的バンドがみられることがありますが、非特異的増幅によるものなので判定には関係ありません。

IX. 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。

X. 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) Yamamoto, T., T. Tamura, and T. Yokota Primary structure of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for human. *J Biol Chem.* (1984) **259**:5037-5044.
- 3) Yamamoto, T., T. Gojobori, and T. Yokota Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1. *J Bacteriol.* (1987) **169**:1352-1357.

XI. 関連製品

毒素原性大腸菌 (STh gene) One Shot PCR Kit (製品コード RR104A)
毒素原性大腸菌 (STp gene) One Shot PCR Kit (製品コード RR108A)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)

XII. 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