

製品コード RR132A

食品・環境分析用

TAKARA

***Bacillus cereus* (CRS gene)
PCR Detection Kit**

説明書

Bacillus cereus (セレウス菌) は環境細菌の一つであり、土壌、空気および河川水等の自然環境、そして農作物などの食料、飼料等に広く分布する芽胞形成桿菌です。この芽胞は高熱にも耐え、富栄養環境で発芽して栄養型となって増殖し、毒素を産生します。食中毒にかかわる毒素には嘔吐毒素 (セレウリド) と下痢原性毒素 (エンテロトキシン) の2種類があります。セレウリドは熱に強いため、セレウリド産生性のセレウス菌が食品中に大量に増殖し、セレウリドを産生すると、加熱しても食中毒を引き起こします。

セレウリドは従来、バイオアッセイやLC-MSによって検出されてきましたが、操作が煩雑で時間がかかるため、より簡便で迅速なセレウリド産生性セレウス菌の特異的検出法の開発が望まれていました。名古屋大学医学部と名古屋市衛生研究所による研究で、セレウリド非産生株はセレウリド合成酵素 (CRS) 遺伝子の一部を欠落していることが明らかとなり、この欠落部分の配列がシーケンス解析により同定されました。この欠落部分の配列に基づいて設計されたプライマーを用いてこの領域のPCRを行い、増幅産物が検出できれば、セレウリド産生株であると判定できます。日本で実際に発生したセレウス菌による嘔吐型食中毒の臨床株を無作為に100株選び、この方法で検査したところ、100%の確率でPCR産物が検出され、これらがセレウリド産生株であることが確認できました。また、セレウリド非産生株では検出されませんでした。このことから、セレウリド産生株を特異的に検出できていることが示されました。

本製品は、分離培養培地から得られたセレウス菌およびその類似菌 (例: *B. thuringiensis*, *B. anthracis* など) とセレウリド産生性セレウス菌を迅速かつ確実に検出するためのPCR検出キットです。セレウス菌およびその類似菌を検出するためにレシチナーゼ遺伝子を、また、セレウリド産生性セレウス菌を検出するためにセレウリド合成酵素 (CRS) 遺伝子を、一本のチューブで同時に増幅し、アガロースゲル電気泳動により検出確認を行います。増幅には、Hot Start PCR用酵素、*TaKaRa Ex Taq*® HSを使用しているので、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、高感度の検出が可能です。また、インターナルコントロールを同時に増幅するため、偽陰性の判定が可能です。

本製品の開発には、名古屋市衛生研究所 安形則雄先生にご協力いただきました。

I. 内容 (50 回分)

1. 5 × PCR Premix *	500 μl
2. CRS Primer Mixture (セレウリド合成酵素遺伝子検出用)	50 μl
3. LE Primer Mixture (レシチナーゼ遺伝子検出用)	50 μl
4. I.C. Primer Mixture (インターナルコントロール検出用)	50 μl
5. CRS Positive Control Template	10 μl
6. LE Positive Control Template	10 μl

* : dNTP Mixture、インターナルコントロール、*TaKaRa Ex Taq* HS を含む

II. 保存

− 20℃

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。

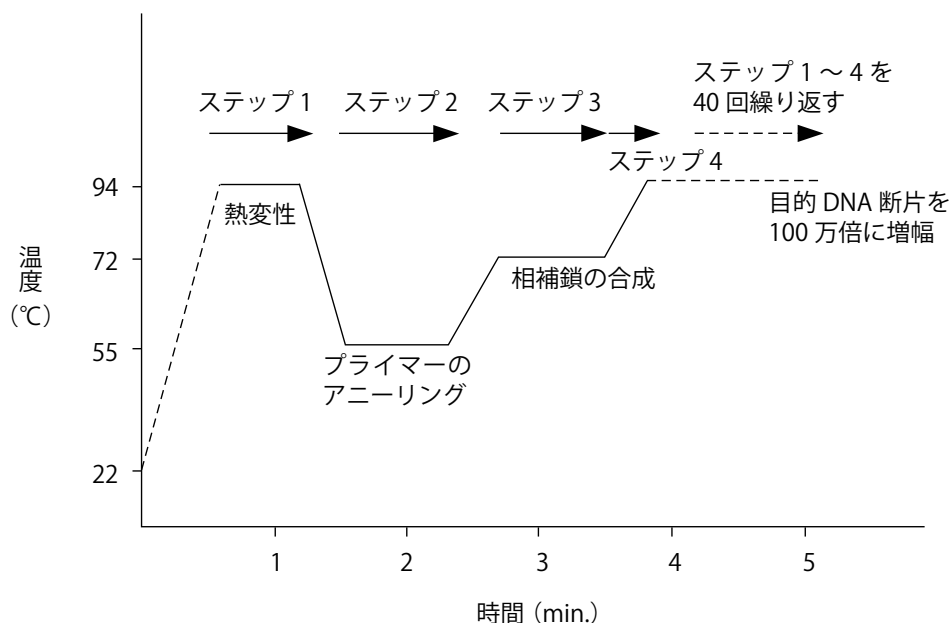


図 1. PCR による DNA 増幅の工程

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。

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。

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。

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、40 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
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) 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)
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. 0.2 ml PCR チューブ
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200) など
2. 1.5 ml チューブ (1. で代用も可)
3. 200 μ l、20 μ l マイクロピペット
4. マイクロピペット用チップ
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。)

V. 使用上に際して

- ・本製品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：菌体熱抽出サンプルからの検出例

1. サンプルの調製 (エリア2で実施)

1-1. 菌体を直接 PCR にかける場合

- (1) プレート (NGKG 培地*¹ など) 上のコロニーから、滅菌済みマイクロピペット用チップなどで微量の菌体を取り、滅菌精製水 100 μ l に懸濁する。
- (2) 95°C で 5 分間、熱処理する。
- (3) 1 μ l を PCR 反応に用いる。

1-2. 培養法を組み合わせ、食品等から菌を回収して PCR を行う場合

- (1) 被験試料にポリミキシン添加 SCD 培地*² を 10 倍量加え、細菌検査用ホモジナイザー (ストッカー等) で破碎混合後、35°C で数時間～一晩培養する。
- (2) 培養液 1.3 ml を 1,000 rpm (約 100 $\times g$) で 1 分間遠心後、その上清の 1.0 ~ 1.2 ml を新しいチューブに取り、12,000 rpm (約 13,000 $\times g$) で 3 分間遠心する。
- (3) 上清を除去し、沈殿を 100 μ l の TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0) に懸濁後、95°C、5 分間加熱処理して、1 μ l を PCR 反応に用いる。

PCR 反応阻害がかかる場合、さらに希釈して PCR 反応サンプルとして用いてください。

* 1：NGKG 培地：セレウス菌分離用培地 日水製薬 (株)

* 2：SCD 培地：トリプトソーヤバイヨン 日水製薬 (株)

2. PCR 反応例

1. PCR 用チューブに以下の反応液を準備する。(エリア 1 で実施)
Negative Control としてサンプルのかわりに滅菌精製水 1 μ l を加えたものを 1 本用意する。

試薬	1 反応分
5 × PCR Premix	10 μ l
CRS Primer Mixture	1 μ l
LE Primer Mixture	1 μ l
I.C. Primer Mixture	1 μ l
滅菌精製水	36 μ l
Total	49 μ l

2. VII-1. で得られた熱抽出サンプル、または 1 μ l の Positive Control を上記反応液に添加する。(エリア 3 で実施)
3. 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	30 秒	} 40 サイクル
	55°C	30 秒	
	72°C	30 秒	

※ 反応は約 2 時間で終了する。反応後のサンプルは - 20°C で保存可能である。

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、溶液が均一に溶解していることを確認する。そうでなければ再び加熱する。
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. 十分に固まった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。
6. 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。

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、- → +に泳動される。）
2. PCR 反応終了後の各反応液 10 μ l に 2.0 μ l の 6 × 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 2 ~ 3 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、もしくは 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、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る。

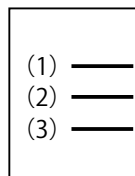
操作上の注意

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、直接手が触れないようご注意ください。

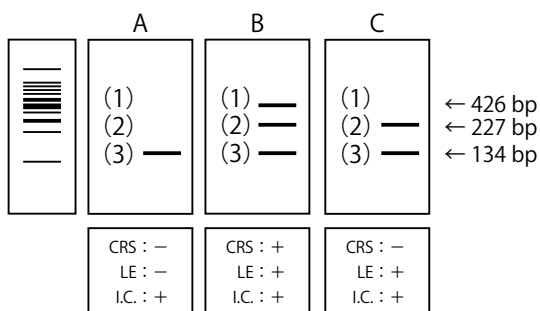
VIII. 判定

PCR 反応による各増幅産物の大きさは、以下の通りです。

- | | |
|-----------------------------|--------|
| (1) セレウリド合成酵素遺伝子 (CRS) | 426 bp |
| (2) レシチナーゼ遺伝子 (LE) | 227 bp |
| (3) Internal Control (I.C.) | 134 bp |



サンプルの泳動パターンとして下図に示す A ~ C の場合が考えられます。
分子量マーカー：100 bp DNA Ladder



A の場合：*Bacillus cereus* およびセレウス菌類似株由来の DNA 量が検出限界以下、またはこれら以外の菌種

B の場合：嘔吐毒素（セレウリド）産生性 *Bacillus cereus*

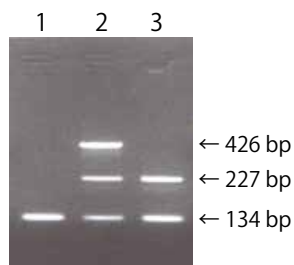
C の場合：嘔吐毒素（セレウリド）非産生性 *Bacillus cereus*、またはセレウス菌類似株 (*B. thuringiensis*、*B. anthracis* など)

- Negative Control は、A の泳動パターンになります。
Negative Control が B、C の泳動パターンの時は、コンタミネーションを起こしていると考えられるので、反応液調製場所および使用した機器を除染した上で、再反応を行ってください。
- すべての増幅産物が得られなかった場合、何らかの原因で PCR 反応が進まなかったと考えられます。理由として試薬の劣化、機器の不調、サンプルに PCR 阻害物質が含まれていることが考えられます。再反応および、サンプルの再調製をお勧めします。

注 1) (3) の Internal Control Template 由来の増幅産物は、B、C の泳動パターンの時、サンプルによっては確認出来ない場合があります。

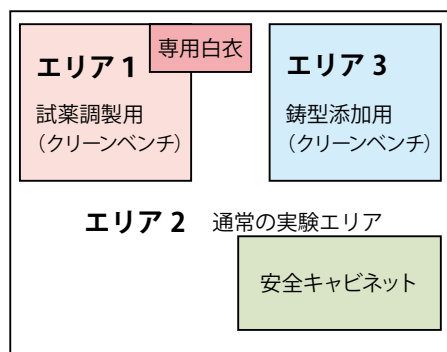
注 2) CRS Positive Control Template を用いた反応では、426 bp (および I.C. の 134 bp) のバンドが検出されます。LE Positive Control Template を用いた反応では、227 bp (および I.C. の 134 bp) のバンドが検出されます。

【反応例 1：各種菌体熱抽出液を用いたテスト】



1. Negative Control
2. 嘔吐毒素（セレウリド）産生性 *Bacillus cereus*
3. 嘔吐毒素（セレウリド）非産生性 *Bacillus cereus*

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) Agata, N. *International Journal of Food Microbiology*. (2002) **73**: 23-27.
- 2) Agata, N., *et al.* *FEMS Microbiol Lett.* (1994) **121**: 31-34.
- 3) Schraft, H., *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*. (1995) **61**: 98-102.

XI. 関連製品

CycleavePCR™ *Bacillus cereus* (CRS gene) Detection Kit (製品コード CY221)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
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)
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)

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。PrimeGel、CycleavePCR 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