

製品コード RR107A

食品・環境分析用

Takara

**O-157 & ベロ毒素遺伝子
同時検出キット**

説明書

v201901Da

O-157：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。

本キットは大腸菌 O-157 と、ベロ毒素（志賀毒素）1 型産生菌および 2 型産生菌を簡便、迅速かつ確実に検出するために開発された PCR 用検出キットです。本キットを構成する PCR プライマー溶液は O-157 の O 抗原合成遺伝子を特異的に検出するプライマー*¹ と、ベロ毒素 1 型および 2 型（変異型を含む）遺伝子をそれぞれ検出するプライマー*² の mixture で、O-157 の同定およびベロ毒素遺伝子の検出について同時に 1 反応で判定できるようになっています。

また、本キットでは PCR のインターナルコントロールとして Positive Control Template を添付し、反応液に同時添加することで反応阻害などによる偽陰性を排除することができます。さらに PCR 用酵素として、従来の Taq より増幅効率の優れた TaKaRa Ex Taq[®] を用いることで、より短時間で高感度の検出が可能になりました。

* 1：O-157 のみを検出し、他の O 抗原合成遺伝子は検出対象外です。また H 抗原などそれ以外の血清型の差異は判別できません。

* 2：ベロ毒素 1 型（VT1）および 2 型（VT2, VT2vha, VT2vhb, VT2vp1, VT2vp2）遺伝子を個別に検出します。ただし、2 型において VT2 ファミリー内での判別はできません。また、VT1 検出用プライマーは赤痢菌の志賀毒素遺伝子とも反応します。

I. 内容（50 回分）

1. 10 × Ex Taq [™] Buffer	250 μl
2. dNTP mixture (2.5 mM each)	200 μl
3. Primer Mixture*	500 μl
4. Positive Control Template*	500 μl
5. TaKaRa Ex Taq (5 U/μl)	12.5 μl

*：株式会社島津製作所で製造されたものです。

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。

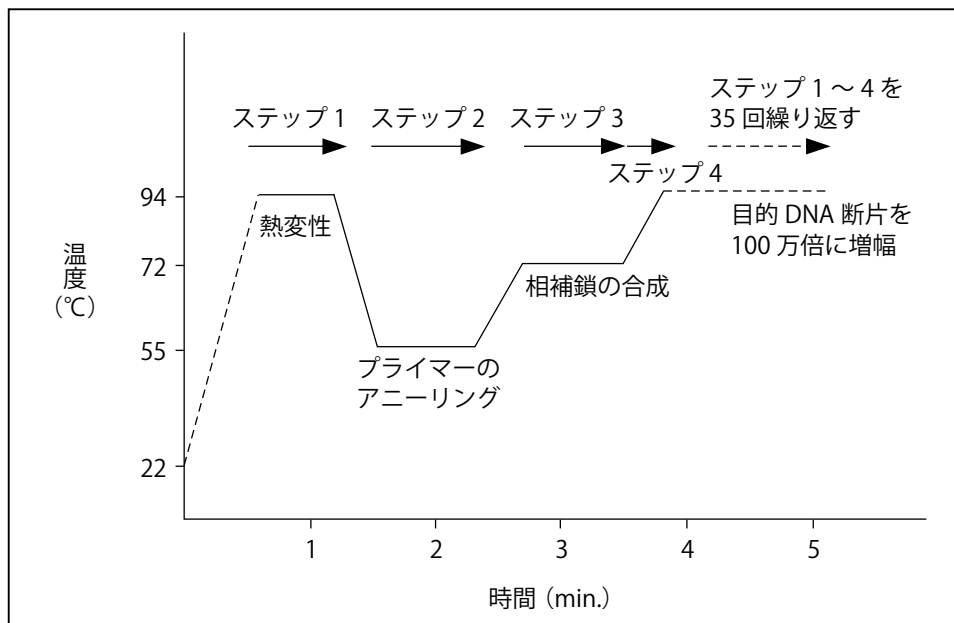


図 1. PCR による DNA 増幅の工程

- 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 (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) (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. 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°C 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°C、10 分) し、上清を回収する。これを熱抽出サンプルとして 10 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°C、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°C で 5 分間熱処理する。
5. 遠心分離 (12,000 rpm、4°C、5 分) し、上清を回収する。これを熱抽出サンプルとして 10 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 10 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を用いる。また、熱抽出サンプルは -20°C で保存可能です。

2. 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）。
検体サンプル等の鑄型以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製後、各反応チューブに 40 μ l ずつ分注し、軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして 10 μ l の滅菌精製水を加え、しっかりとふたをする。

試薬	使用量
10 × <i>Ex Taq</i> Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer Mixture	10 μ l
Positive Control Template	10 μ l
<i>TaKaRa Ex Taq</i>	0.25 μ l
滅菌精製水	10.75 μ l
Total	40 μ l

2. VII-1. で得られた熱抽出サンプル 10 μ l 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、反応を行うまで氷上にて冷やす。
4. あらかじめ 94°C に加温したサーマルサイクラー*に、反応液の入ったチューブをセットして PCR 反応を開始する。

*： *TaKaRa* PCR Thermal Cycler Dice を使用される場合、チューブを入れないまま運転を開始し、PCR のプログラムの最初の 94°C、1 分のステップになった時点で「Pause」を Enter して運転を一時停止し、その時点でチューブをセットし、セット後、「Resume」を Enter して、運転を再開してください。

【PCR 条件】

94°C	1 分	} 35 サイクル
55°C	1 分	
72°C	1 分	
↓		
72°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°C、または -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。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 μg/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、ゲルが充分かかるまで電気泳動 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。(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 5 μl に 1.0 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。

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 μg/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 を使用する場合は、専用フィルターを用いてください。

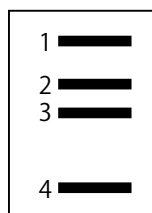
操作上の注意

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、直接手が触れないようご注意ください。

VIII. 判定

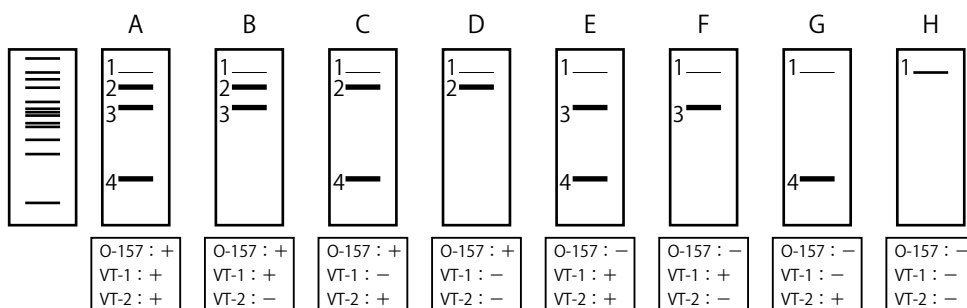
反応によって生成される増幅産物の大きさは、以下の通りです。

1. Positive Control Template 由来 641 bp
2. O-157 遺伝子由来 457 bp
3. ベロ毒素 1 型遺伝子由来 349 bp
4. ベロ毒素 2 型遺伝子由来 112 bp



泳動パターンとして下図に示す A ~ H の場合が考えられます。

分子量マーカー： ϕ X174-Hinc II digest



A の場合： O-157 であり、ベロ毒素 1 型、2 型両産生菌

B の場合： O-157 であり、ベロ毒素 1 型産生菌

C の場合： O-157 であり、ベロ毒素 2 型産生菌

D の場合： O-157 であり、ベロ毒素 1 型、2 型ともに産生しない菌

E の場合： O-157 以外であり、ベロ毒素 1 型、2 型両産生菌

F の場合： O-157 以外であり、ベロ毒素 1 型産生菌 (ベロ毒素産生赤痢菌もこれに該当)

G の場合： O-157 以外であり、ベロ毒素 2 型産生菌

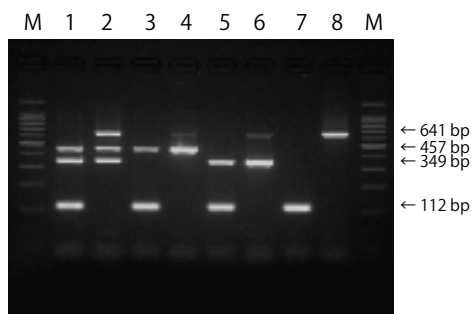
H の場合： O-157 以外であり、ベロ毒素 1 型、2 型ともに産生しない菌

(Negative Control もこの泳動パターンとなる)

注) 1. の Positive Control Template 由来の増幅産物は A ~ G 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。

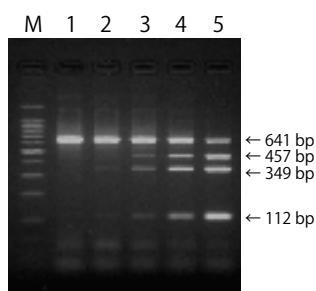
IX. 実施例

実施例 1：各種菌体熱抽出液を用いたテスト



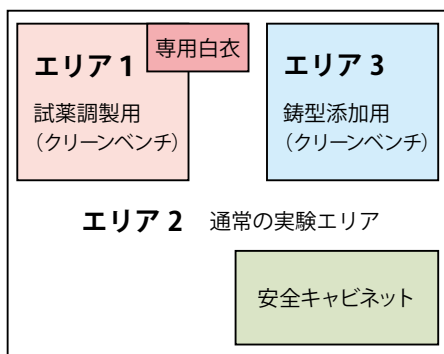
1. O-157/VT1 + /VT2 +
2. O-157/VT1 + /VT2 -
3. O-157/VT1 - /VT2 +
4. O-157/VT1 - /VT2 -
5. O-111/VT1 + /VT2 +
6. O-26/VT1 + /VT2 -
7. O-139/VT1 - /VT2 +
8. O-1/VT1 - /VT2 -
- M. 100 bp DNA Ladder

実施例 2：感度テスト



1. Negative Control
2. O-157/VT1 + /VT2 + 2.5 cells 相当
3. O-157/VT1 + /VT2 + 25 cells 相当
4. O-157/VT1 + /VT2 + 250 cells 相当
5. O-157/VT1 + /VT2 + 2,500 cells 相当
- M. 100 bp DNA Ladder

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.* (1955) **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