

製品コード RR120A

食品・環境分析用

---

# Takara

## EHEC (VT gene) PCR Screening Set

---

説明書

本製品を用いる検出方法は、厚生労働省通知「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 や O26 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。

## I. 内容 (200 回用、50 $\mu$ l 反応系)

1. EVC-1/2(VT) Primer Mix (各 19 pmol/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l
2. TaKaRa Ex Taq <sup>®</sup> HS (5 U/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
3. 10 × Ex Taq <sup>™</sup> Buffer	1 ml
4. dNTP Mixture (各 2.5 mM)	800 $\mu$ l
5. Control Template EC3 (10 fg/ $\mu$ l)	1 ml

### 【Primer Mix について】

EVC-1/2(VT) Primer Mix

- ・ 標的遺伝子：VT1、VT2、VT2vha、VT2vhb、VT2vp1
- ・ 増幅サイズ：171 bp

※これらのプライマーは (株) 島津製作所で製造されたものです。

### 【Control Template EC3 について】

EVC-1/2(VT) Primer Mix を用いてベロ毒素遺伝子検出を行う際に、PCR が正常に行われているか確認するためのコントロールテンプレート。685 bp の増幅産物が得られる。実検体である腸管出血性大腸菌由来の増幅産物とはサイズが異なるので、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）  
または  $\phi$ X174-*Hinc* II digest（製品コード 3406A/B）  
または pHY Marker（製品コード 3404A/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など

#### 【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 チューブ対応型遠心機
3. 卓上遠心機
4. 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
5. 電気泳動装置  
Mupid-2plus（製品コード M-2P）  
Mupid-exU（製品コード EXU-1）
6. UV トランスイルミネーター (300 nm 前後のもの)
7. 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. PCR 用チューブ  
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap（製品コード NJ200）など
2. 200  $\mu$ l、20  $\mu$ 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. PCR の原理

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。

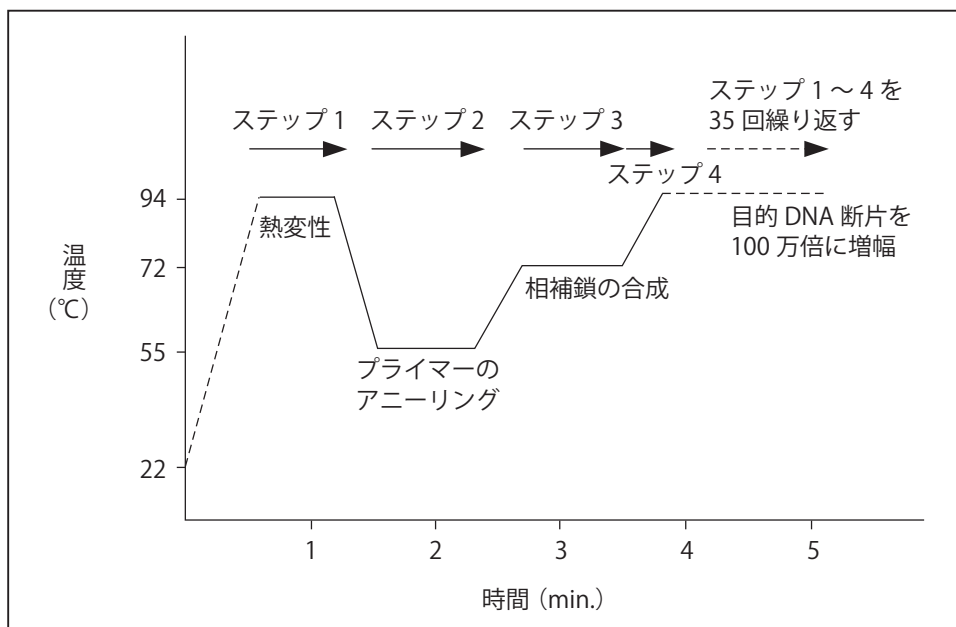


図 1. PCR による DNA 増幅の工程

- 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。

---

## V. 使用上において

- ・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：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  $\mu$ 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  $\mu$ l 添加し、100 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱処理する。
  - ← 1 M Tris-HCl (pH7.0) (滅菌済み) を 15  $\mu$ 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

本製品では、Control Template EC3 をインターナルコントロールとして添加して反応を行います。また、正しい判定結果を得るために、陰性コントロール（滅菌精製水）の反応を一緒に行ってください。

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）  
検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数 +  $\alpha$  分調製後、各反応チューブに 45  $\mu$ 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 5  $\mu$ 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 $\mu$ l
dNTP Mixture	4 $\mu$ l
EVC-1/2(VT) Primer Mix	0.5 $\mu$ l
Control Template EC3*1	5 $\mu$ l
鋳型*2	5 $\mu$ l
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS	0.25 $\mu$ l
滅菌精製水	30.25 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

\* 1 : Control Template EC3 は、インターナルコントロールとしてすべての反応に添加してください。

\* 2 : 菌体アルカリ熱抽出サンプル、または滅菌精製水（陰性コントロール）

2. 鋳型を添加する。（エリア 3 で実施）  
陰性コントロール以外の各チューブに、菌体アルカリ熱抽出サンプルを 5  $\mu$ l 添加し、しっかりとふたをする。反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心を行う。
3. PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、PCR 反応を開始する。

PCR 条件：	94°C	1 分	} 35 サイクル
	55°C	1 分	
	72°C	1 分	
	↓	72°C	10 分

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。

---

### 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用 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、- → +に泳動される。)
2. PCR 反応終了後の各反応液 10  $\mu\text{l}$  に 2  $\mu\text{l}$  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。

### 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 TAE 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事ができる。]
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遺伝子が存在すれば、171 bp の増幅産物が検出されます。  
一方、インターナルコントロール (Control Template EC3) からの増幅産物は 685 bp です。  
サンプル反応の結果は、陰性コントロールの反応結果と照らし合わせて判定してください。

### 【陰性コントロー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 (685 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 (685 bp) が検出された。
ベロ毒素遺伝子由来増幅産物 (171 bp) が検出されない。	PCR 反応が正常に進まなかった。 <sup>*1</sup>	コンタミネーションを起こさず、正しく PCR 反応が進んだ。
ベロ毒素遺伝子由来増幅産物 (171 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。 <sup>*2</sup>	コンタミネーションを起こしていると考えられる。 <sup>*2</sup>

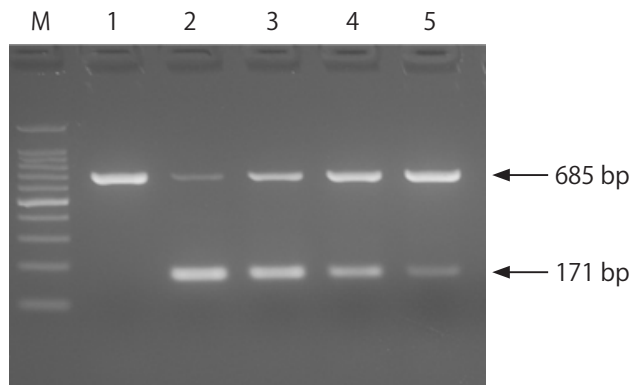
### 【サンプル反応の電気泳動結果】

	インターナルコントロール由来増幅産物 (685 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 (685 bp) が検出された。
ベロ毒素遺伝子由来増幅産物 (171 bp) が検出されない。	PCR 反応が正常に進まなかった。 <sup>*1</sup>	ベロ毒素遺伝子は検出限界以下である。
ベロ毒素遺伝子由来増幅産物 (171 bp) が検出された。	ベロ毒素遺伝子陽性である。 <sup>*3</sup>	ベロ毒素遺伝子陽性である。 <sup>*3</sup>

- \* 1 : 何らかの原因で PCR 反応が正常に行われていないので再反応を行ってください。  
夾雑物により PCR 反応が阻害されている可能性もあるため、場合によってはサンプル調製をやり直してください。または DNA を精製してください。
- \* 2 : コンタミネーションを起こしていると考えられます。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ってください。
- \* 3 : 陰性コントロール反応で正しい結果が得られた場合にベロ毒素遺伝子陽性と判定されます。



## IX. 実施例



M : 100 bp DNA Ladder

1 : 陰性コントロール

2 : EHEC O26 ゲノム DNA 1 ng

3 : EHEC O26 ゲノム DNA 100 pg

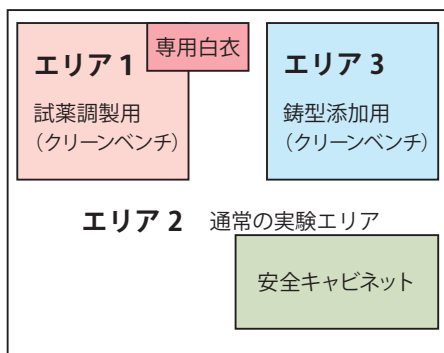
4 : EHEC O26 ゲノム DNA 10 pg

5 : EHEC O26 ゲノム DNA 1 pg

3% Agarose gel、TAE buffer

PCR 産物 10  $\mu$ l apply

## 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 toxinland Shiga-like toxinII 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 haemolytic 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 typell 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)  
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)  
φ X174-*Hinc* II digest (製品コード 3406A/B)  
100 bp DNA Ladder (製品コード 3407A/B)  
pHY Marker (製品コード 3404A/B)  
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)  
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)  
0.2 ml Hi-8-Dome Cap (製品コード NJ301)

O-157 (ベロ毒素 1 型、2 型遺伝子) PCR Typing Set (製品コード RR105A)  
O-157 (ベロ毒素遺伝子) One Shot PCR Screening Kit Ver.2 (製品コード RR102A)  
EHEC (O antigens) PCR Typing Kit (製品コード RR133A)

## 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**