

製品コード RR133A

食品・環境分析用

Takara

**EHEC (O antigens)
PCR Typing Kit**

説明書

v201904Da

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です。EHEC の検出においては、まずベロ毒素遺伝子 (および *eae* 遺伝子) の保有状況によるスクリーニングを行い、ベロ毒素遺伝子陽性であれば、O 抗原型の遺伝子タイプングをした上で、分離培養を行う方法が効率的であるとされています。

本キットは、O 抗原型の内、主要な 7 血清型 (O26、O103、O111、O121、O145、O157、O165) のタイプングに使用します。さらに、ベロ毒素 1 型、ベロ毒素 2 型、*eae* 遺伝子も同時検出することが可能です。これらの遺伝子をマルチプレックス PCR により一括して検出します。

※ 本キットの開発には、宮崎大学農学部畜産草地科学科 動物衛生微生物学分野 井口純准教授にご協力いただきました。

I. 内容 (50 回反応分、50 μ l 反応系)

○ 1.	2 × Multiplex PCR Buffer (Mg^{2+} , dNTP plus)	625 μ l × 2
○ 2.	Multiplex PCR Enzyme Mix	12.5 μ l
● 3.	Primer Mix (EHEC O antigens)	5 × conc. 500 μ l
○ 4.	dH ₂ O	1 ml
● 5.	Control Template 1	100 μ l
● 6.	Control Template 2	100 μ l

【コンポーネントの説明】

2 × Multiplex PCR Buffer (Mg^{2+} , dNTP plus) :

PCR 反応用バッファです。反応に必要な dNTP Mixture、 Mg^{2+} を含みます。

Multiplex PCR Enzyme Mix : PCR 酵素です。

Primer Mix (EHEC O antigens) :

以下の遺伝子検出用のプライマーを含みます。

ターゲット遺伝子	増幅サイズ
O26 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	241 bp
O103 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	716 bp
O111 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	451 bp
O121 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	193 bp
O145 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	132 bp
O157 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	292 bp
O165 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	1,042 bp
ベロ毒素 1 型遺伝子 (<i>stx1</i>)	348 bp
ベロ毒素 2 型遺伝子 (<i>stx2</i>)	584 bp
<i>eae</i> 遺伝子	881 bp

Control Template 1 :

O26、O103、O111、O121、O145、O157、O165 の陽性コントロールです。

Control Template 2 :

ベロ毒素 1 型、ベロ毒素 2 型、*eae* 遺伝子の陽性コントロールです。

II. 保存 - 20°C

III. キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

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. 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
100 bp DNA Ladder（製品コード 3407A/B）
または ϕ X174-*Hinc* II digest（製品コード 3406A/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. 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。

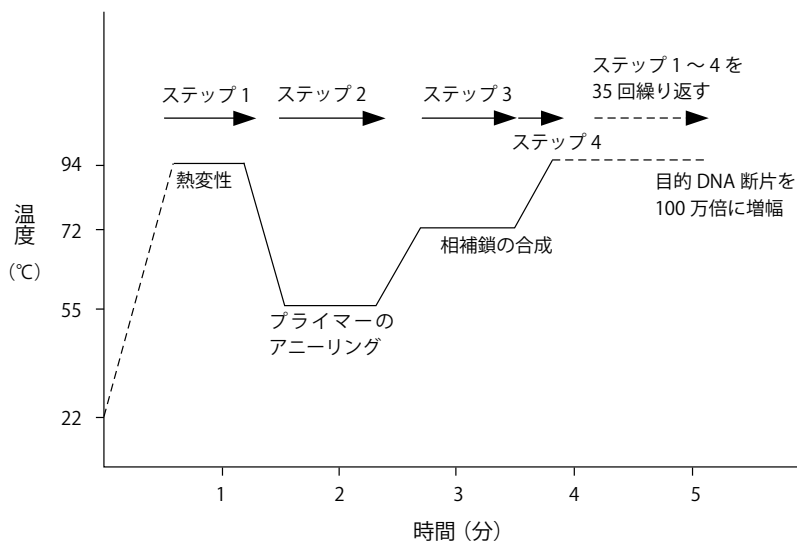


図 1. PCR による DNA 増幅の工程 (例)

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. 操作

A. DNA 抽出 (エリア 2 で実施)

以下に例としてアルカリ熱抽出による DNA 抽出法を示します。PCR 阻害を起こす可能性がある検体については、必要に応じて DNA 精製を行うことをお勧めします。

【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 $\times g$ で 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を用いる。

B. PCR 反応

1. 反応液の調製 (エリア 1 で実施)

下記に示す反応液を氷上で調製する。サンプル以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、PCR チューブに 45 μ l ずつ分注して軽く蓋をする。
必要本数は、サンプル数 + 陽性コントロール 2 本 (Control Template 1 および 2) + 陰性コントロール 1 本 (dH₂O) と設定する。

試薬	液量 (1 反応分)	最終濃度
○ 2 \times Multiplex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	25 μ l	1 \times
○ Multiplex PCR Enzyme Mix	0.25 μ l	
● Primer Mix (EHEC O antigens)	10 μ l	1 \times
(検体サンプル or 陽性コントロール or dH ₂ O)	5 μ l)	
○ dH ₂ O	9.75 μ l	
Total	50 μ l	

1 本のチューブの蓋をあけ、陰性コントロール用として dH₂O を 5 μ l 添加した後しっかりと蓋をし、エリア 3 に移動する。

2. サンプルの添加 (エリア 3 で実施)

1. で反応液を分注した残りのチューブに、氷上にてサンプルまたは陽性コントロールを 5 μ l 添加し、しっかりと蓋をする。

3. サーマルサイクラーにセットして PCR を開始する。

94°C	1 分	} 25 サイクル
94°C	30 秒	
58°C	30 秒	
72°C	1 分	
72°C	2 分	

反応後のサンプルは、4°C または -20°C で保存する。

C. 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、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。(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 5 μ l に 1 μ 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 4～5 cm に移動するまで電気泳動する。

E. 染色バンドの確認

1. 1 μ 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。
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。

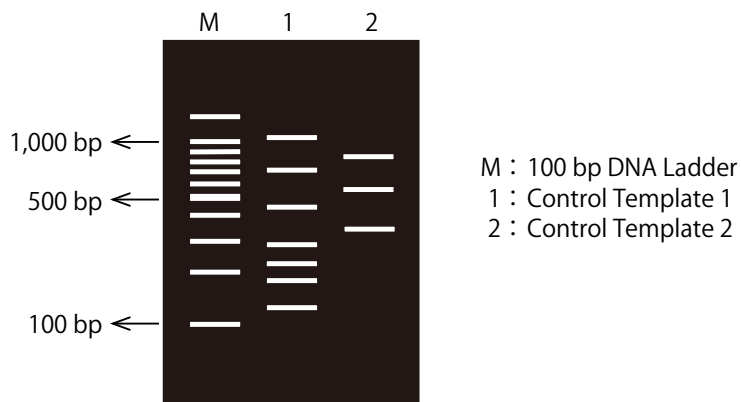
VIII. 判定

PCR 増幅産物のサイズから検出された遺伝子を判定する。
また、コントロール反応の結果が正常であることを確認する。

- ・陰性コントロール：以下のサイズの増幅産物が検出されないこと
- ・陽性コントロール：以下のサイズの増幅産物が検出されること

ターゲット遺伝子	増幅サイズ
O26 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	241 bp
O103 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	716 bp
O111 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	451 bp
O121 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	193 bp
O145 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	132 bp
O157 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	292 bp
O165 の O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子	1,042 bp
ベロ毒素 1 型遺伝子 (<i>stx1</i>)	348 bp
ベロ毒素 2 型遺伝子 (<i>stx2</i>)	584 bp
<i>eae</i> 遺伝子	881 bp

【陽性コントロール (Control Template 1、2) の電気泳動模式図】



Control Template 1

O165 : 1,042 bp
O103 : 716 bp
O111 : 451 bp
O157 : 292 bp
O26 : 241 bp
O121 : 193 bp
O145 : 132 bp

Control Template 2

eae : 881 bp
stx2 : 584 bp
stx1 : 348 bp

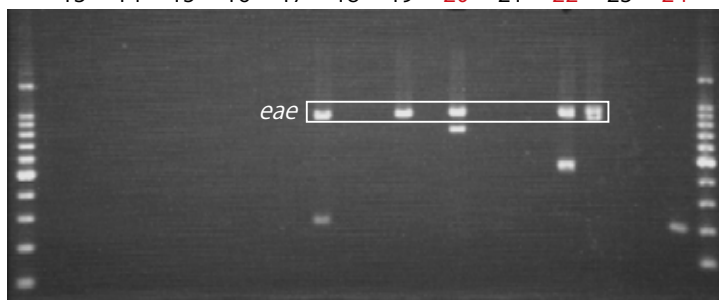
IX. アプリケーションデータ

本キットの使用例として、宮崎大学の井口 純先生よりご提供頂いたデータを以下にご紹介します。

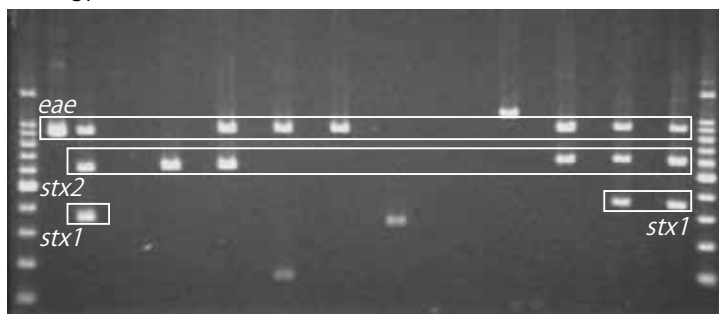
評価 1：全 O 血清群参考株を用いた特異性の評価

大腸菌の O 血清群はデンマーク国立血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) により現在のところ O1 から O187 までが定められており、3 種類の亜型 (O18ab/ac、O28ab/ac、O112ab/ac) と 6 種類の欠番 (O31、O47、O67、O72、O94、O122) があるために 184 種類の O 血清群が認められている。本評価ではそれら全 184 種類の SSI 由来参考株から精製したゲノム DNA を用いた。それぞれの DNA 濃度を 5 ng/μl に調整したプール DNA (5 種類の DNA を混和 - 表 1：PT01 ~ PT37) を用いて特異性の評価を行った。O 血清群に対する PCR 増幅産物 (バンド) が確認されたプール DNA (PT06、PT20、PT22、PT24、PT29、PT31、PT33) について (図 2)、各プールに含まれる 5 種類の単独 DNA を用いて再度増幅の確認を行った (図 3)。その結果、判定に関わる範囲内 (100 ~ 1,500 bp) において非特異的なバンドは確認されず、7 種類の対象 O 血清群株のみでバンドが確認された。以上の結果より、本キットの各対象 O 血清群に対する特異性が確認された。

PT No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



PT No. 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
37



PT06 : O25、**O26**、O27、O28ab、O28ac
PT20 : O100、O101、O102、**O103**、O104
PT22 : O110、**O111**、O112ab、O112ac、O123
PT24 : O119、O120、**O121**、O123、O124
PT29 : O144、**O145**、O146、O147、O148
PT31 : O154、O155、O156、**O157**、O159
PT33 : O164、**O165**、O166、O167、O168

図 2. 全プール DNA を用いた PCR キットの結果

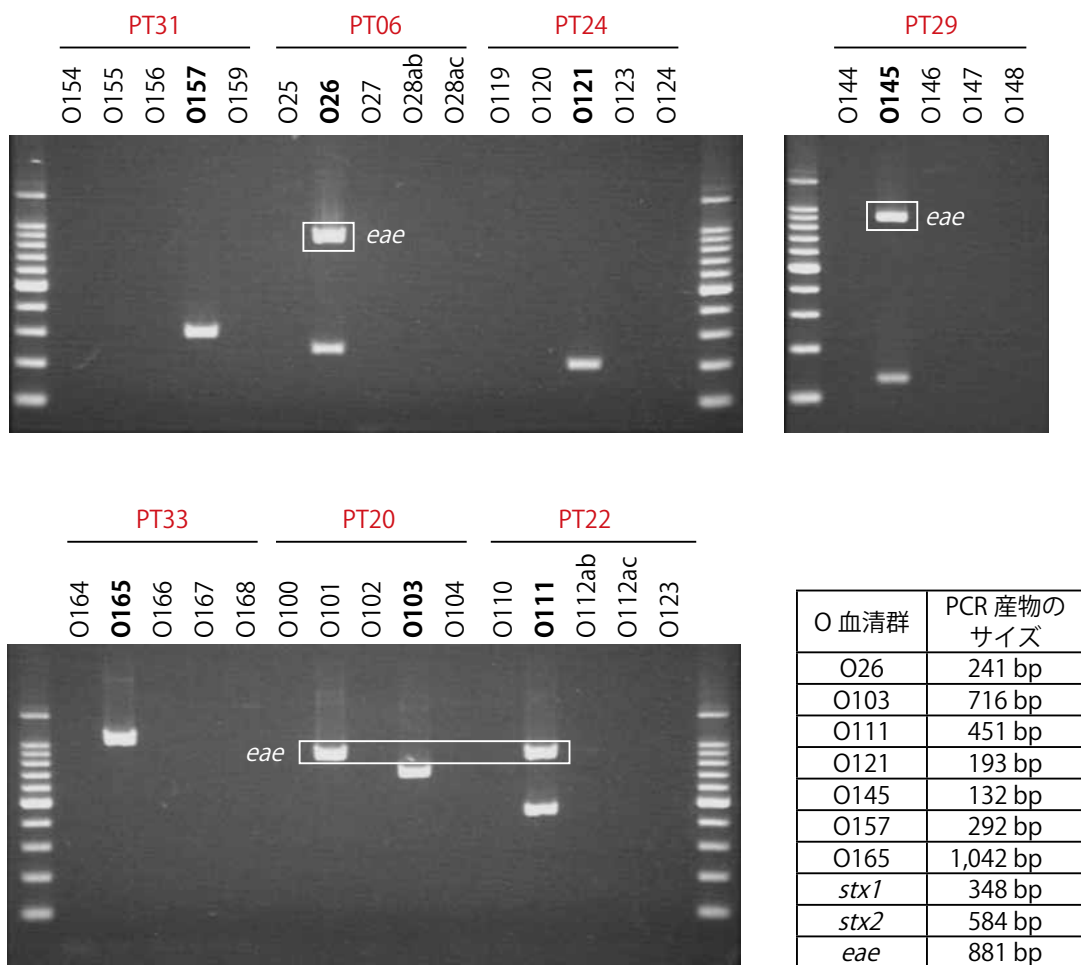


図3. 単独 DNA を用いた PCR キットの結果 (プール DNA でバンドが検出されたもののみ)

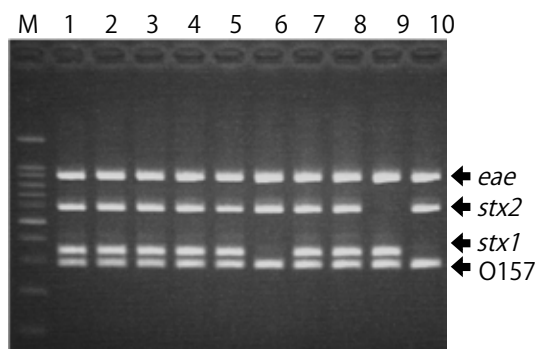
表 1. 参考株とプール DNA 番号の対応表

O 血清群	プール DNA 番号	O 血清群	プール DNA 番号	O 血清群	プール DNA 番号	O 血清群	プール DNA 番号
O1	PT01	O51	PT11	O105	PT21	O154	PT31
O2		O52		O106		O155	
O3		O53		O107		O156	
O4		O54		O108		O157	
O5		O55		O109		O158	
O6	PT02	O56	PT12	O110	PT22	O159	PT32
O7		O57		O111		O160	
O8		O58		O112ab		O161	
O9		O59		O112ac		O162	
O10		O60		O113		O163	
O11	PT03	O61	PT13	O114	PT23	O164	PT33
O12		O62		O115		O165	
O13		O63		O116		O166	
O14		O64		O117		O167	
O15		O65		O118		O168	
O16	PT04	O66	PT14	O119	PT24	O169	PT34
O17		O68		O120		O170	
O18ab		O69		O121		O171	
O18ac		O70		O123		O172	
O19		O71		O124		O173	
O20	PT05	O73	PT15	O125ab	PT25	O174	PT35
O21		O74		O125ac		O175	
O22		O75		O126		O176	
O23		O76		O127a		O177	
O24		O77		O128		O178	
O25	PT06	O78	PT16	O129	PT26	O179	PT36
O26		O79		O130		O180	
O27		O80		O131		O181	
O28ab		O81		O132		O182	
O28ac		O82		O133		O183	
O29	PT07	O83	PT17	O134	PT27	O184	PT37
O30		O84		O135		O185	
O32		O85		O136		O186	
O33		O86		O137		O187	
O34		O87		O138			
O35	PT08	O88	PT18	O139	PT28		
O36		O89		O140			
O37		O90		O141			
O38		O91		O142			
O39		O92		O143			
O40	PT09	O95	PT19	O144	PT29		
O41		O96		O145			
O42		O97		O146			
O43		O98		O147			
O44		O99		O148			
O45	PT010	O100	PT20	O149	PT30		
O46		O101		O150			
O48		O102		O151			
O49		O103		O152			
O50		O104		O153			

評価 2：対象 O 血清株各 10 株を用いた安定性の評価

7 種類の O 血清群に属する腸管出血性大腸菌各 10 株の精製ゲノム DNA (10 ng/μl) を用いて、同一 O 血清群株内での安定性の評価を行った。供試菌株には 2007 年以降に国内で分離され、分離源や分離地域がそれぞれ異なるものを使用した。本キットで得られた結果は、事前に単独プライマーセットで確認した結果とすべて同じであった (図 4)。さらに、判定に影響を及ぼす非特異的なバンドも確認されなかった。以上の結果より、本キットの各対象 O 血清群における安定性が確認された。

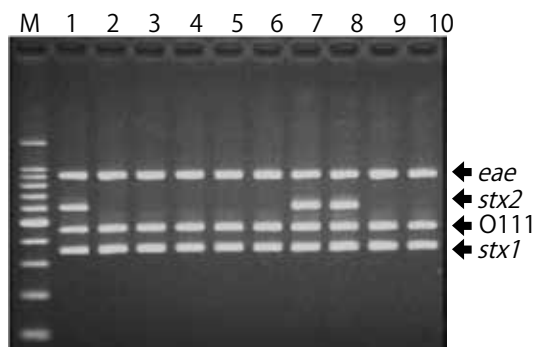
1. O157



供試菌株の遺伝子プロファイル

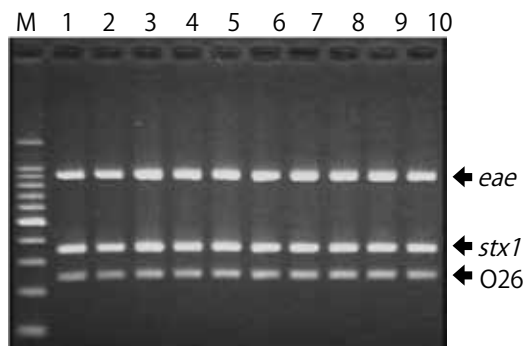
レーン	O 血清群 (292 bp)	<i>stx1</i> (348 bp)	<i>stx2</i> (584 bp)	<i>eae</i> (881 bp)	菌株 ID
1	O157	+	+	+	OT-141
2	O157	+	+	+	OT-147
3	O157	+	+	+	OT-148
4	O157	+	+	+	OT-149
5	O157	+	+	+	OT-156
6	O157	-	+	+	OT-157
7	O157	+	+	+	OT-159
8	O157	+	+	+	OT-163
9	O157	+	-	+	OT-164
10	O157	-	+	+	OT-168

2. O111



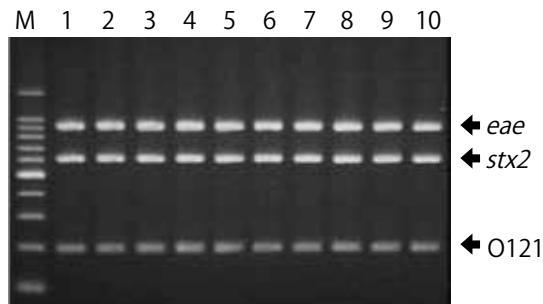
レーン	O 血清群 (451 bp)	<i>stx1</i> (348 bp)	<i>stx2</i> (584 bp)	<i>eae</i> (881 bp)	菌株 ID
1	O111	+	+	+	OT-80
2	O111	+	-	+	OT-118
3	O111	+	-	+	OT-120
4	O111	+	-	+	OT-127
5	O111	+	-	+	OT-132
6	O111	+	-	+	OT-135
7	O111	+	+	+	OT-143
8	O111	+	+	+	OT-151
9	O111	+	-	+	OT-158
10	O111	+	-	+	OT-165

3. O26



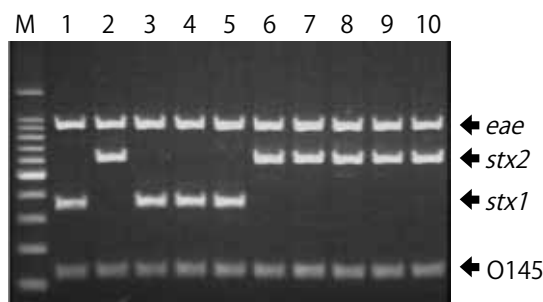
レーン	O 血清群 (241 bp)	<i>stx1</i> (348 bp)	<i>stx2</i> (584 bp)	<i>eae</i> (881 bp)	菌株 ID
1	O26	+	-	+	OT-78
2	O26	+	-	+	OT-87
3	O26	+	-	+	OT-96
4	O26	+	-	+	OT-108
5	O26	+	-	+	OT-114
6	O26	+	-	+	OT-119
7	O26	+	-	+	OT-125
8	O26	+	-	+	OT-126
9	O26	+	-	+	OT-142
10	O26	+	-	+	OT-150

4. O121



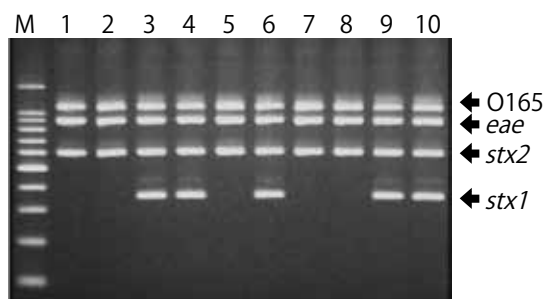
レーン	O 血清群 (193 bp)	<i>stx1</i> (348 bp)	<i>stx2</i> (584 bp)	<i>eae</i> (881 bp)	菌株 ID
1	O121	-	+	+	OT-63
2	O121	-	+	+	OT-65
3	O121	-	+	+	OT-68
4	O121	-	+	+	OT-109
5	O121	-	+	+	OT-115
6	O121	-	+	+	OT-123
7	O121	-	+	+	OT-128
8	O121	-	+	+	OT-134
9	O121	-	+	+	OT-166
10	O121	-	+	+	EHO-32

5. O145



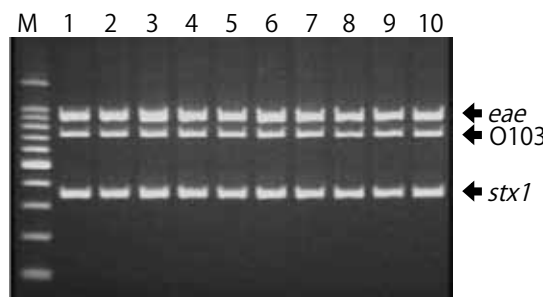
レーン	O 血清群 (145 bp)	<i>stx1</i> (348 bp)	<i>stx2</i> (584 bp)	<i>eae</i> (881 bp)	菌株 ID
1	O145	+	-	+	OT-69
2	O145	-	+	+	OT-89
3	O145	+	-	+	OT-93
4	O145	+	-	+	OT-99
5	O145	+	-	+	OT-124
6	O145	-	+	+	OT-131
7	O145	-	+	+	OT-137
8	O145	-	+	+	OT-160
9	O145	-	+	+	OT-162
10	O145	-	+	+	OT-167

6. O165



レーン	O 血清群 (1,042 bp)	<i>stx1</i> (348 bp)	<i>stx2</i> (584 bp)	<i>eae</i> (881 bp)	菌株 ID
1	O165	-	+	+	OT-17
2	O165	-	+	+	OT-18
3	O165	+	+	+	OT-24
4	O165	+	+	+	OT-52
5	O165	-	+	+	OT-58
6	O165	+	+	+	OT-76
7	O165	-	+	+	OT-91
8	O165	-	+	+	OT-111
9	O165	+	+	+	OT-139
10	O165	+	+	+	OT-144

7. O103

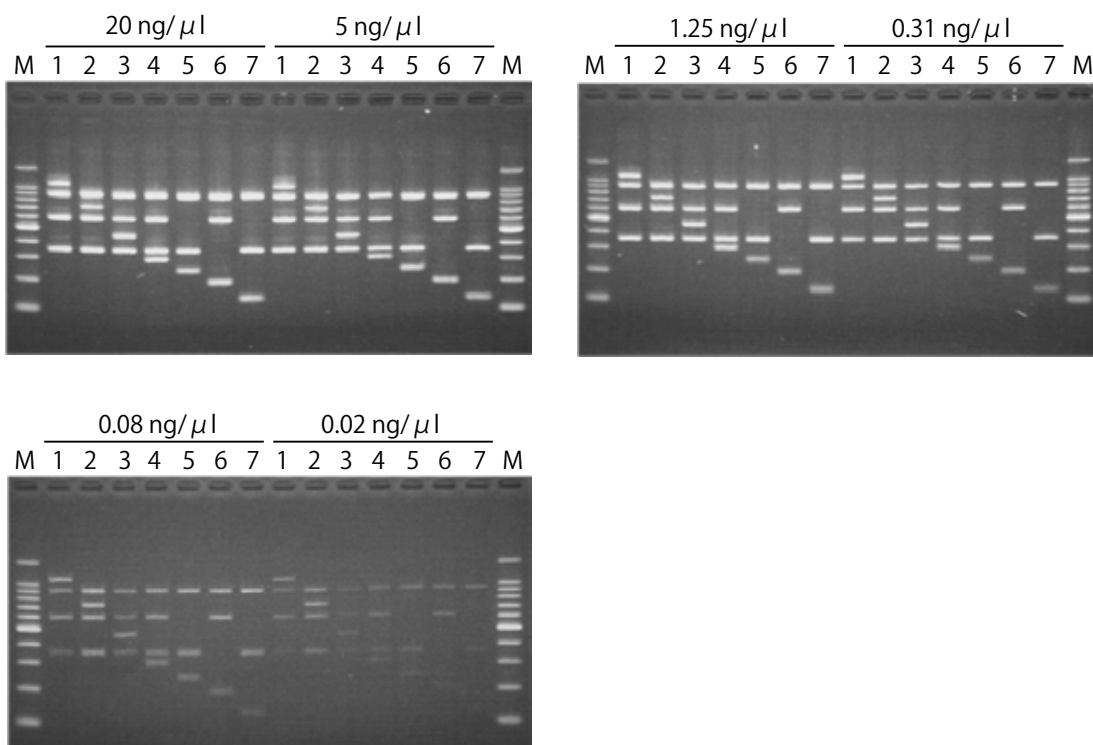


レーン	O 血清群 (716 bp)	<i>stx1</i> (348 bp)	<i>stx2</i> (584 bp)	<i>eae</i> (881 bp)	菌株 ID
1	O103	+	-	+	EHO-11
2	O103	+	-	+	EH23-16
3	O103	+	-	+	EH23-17
4	O103	+	-	+	EH23-18
5	O103	+	-	+	EH23-24
6	O103	+	-	+	EH23-26
7	O103	+	-	+	EH23-29
8	O103	+	-	+	EH23-28
9	O103	+	-	+	EH23-31
10	O103	+	-	+	EH23-3

図 4. 対象 O 血清群各 10 株を用いた評価

評価 3 : DNA 濃度別の検出評価

7 種類の O 血清群に属する腸管出血性大腸菌の精製ゲノム DNA を用いて、20 ng/μl から 1/4 希釈して計 6 種類の濃度を調整し (20、5、1.25、0.31、0.08、0.02 ng/μl)、濃度別の検出評価を行った。その結果、全ての O 血清群株において概ね 0.31 ng/μl 以上で明瞭なバンドが観察された (図 5)。0.08 ng/μl ではバンドは薄いものの全てのバンドが確認された。0.02 ng/μl では一部のバンドが不明瞭または確認出来なかった。また 1.25 ng/μl 以下の濃度では、サイズの比較的小さいバンド (O26 : 241 bp、O121 : 193 bp、O145 : 132 bp) はサイズが大きいものと比べてバンドが薄くなる傾向が確認された。



レーン	O 血清群	O 血清群 PCR の産物サイズ	<i>stx1</i> (348 bp)	<i>stx2</i> (584 bp)	<i>eae</i> (881 bp)
1	O165	1,042 bp	+	+	+
2	O103	716 bp	+	+	+
3	O111	451 bp	+	+	+
4	O157	292 bp	+	+	+
5	O26	241 bp	+	-	+
6	O121	193 bp	-	+	+
7	O145	132 bp	+	-	+

図 5. ゲノム DNA 濃度別の検出評価

評価 4：食品汚染菌モデルでの検出評価

食品培養液に含まれる夾雑物存在下で調製したテンプレート DNA を用いて、本キットによる対象株検出感度の評価を以下の手順に従って行った。

食品培養液の準備：

牛挽肉 25 g にノボピオシン加 mEC 培地 225 g を加えてストマッカー処理し、42℃で 22 時間培養した。

接種用菌体の準備：

7 種類の O 血清群に属する腸管出血性大腸菌（評価 3 参照）を TSB 培地で一晚培養（37℃）後、各菌液 15 μl を新しい TSB 培地 3 ml に接種して OD₆₀₀ = 0.8 になるまで 37℃で振とう培養した。TSB 培地を用いて段階希釈系を作製し、直ちに各菌液 100 μl を寒天平板培地へ接種して菌体濃度を推測した。

混和液の準備：

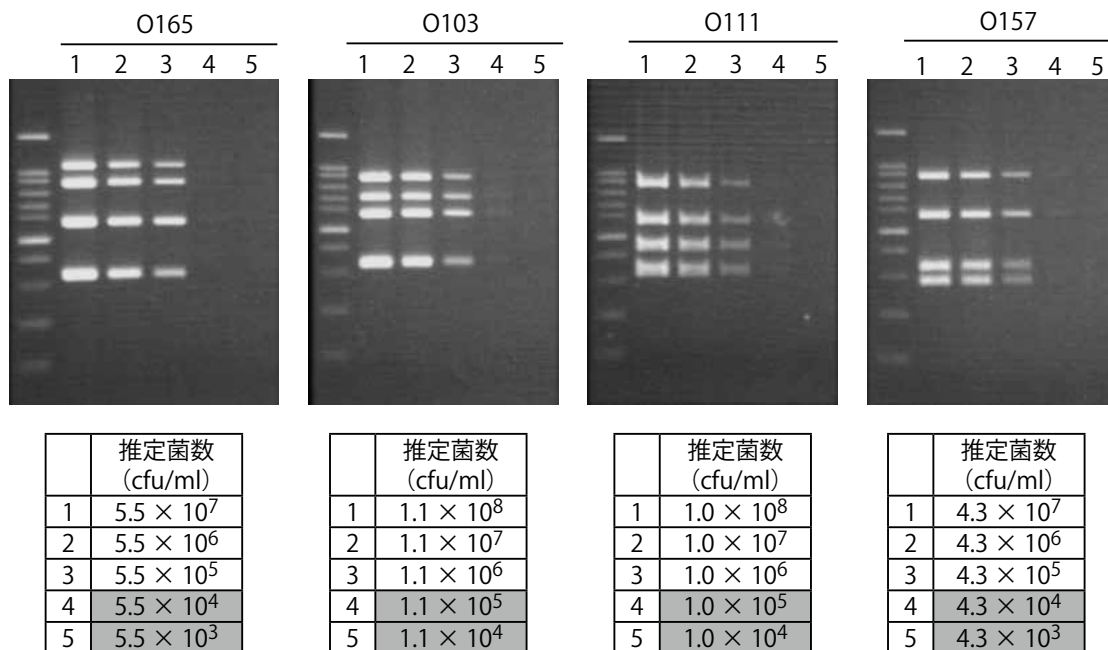
食品培養液 950 μl と段階希釈した接種用菌体 50 μl を混和した。

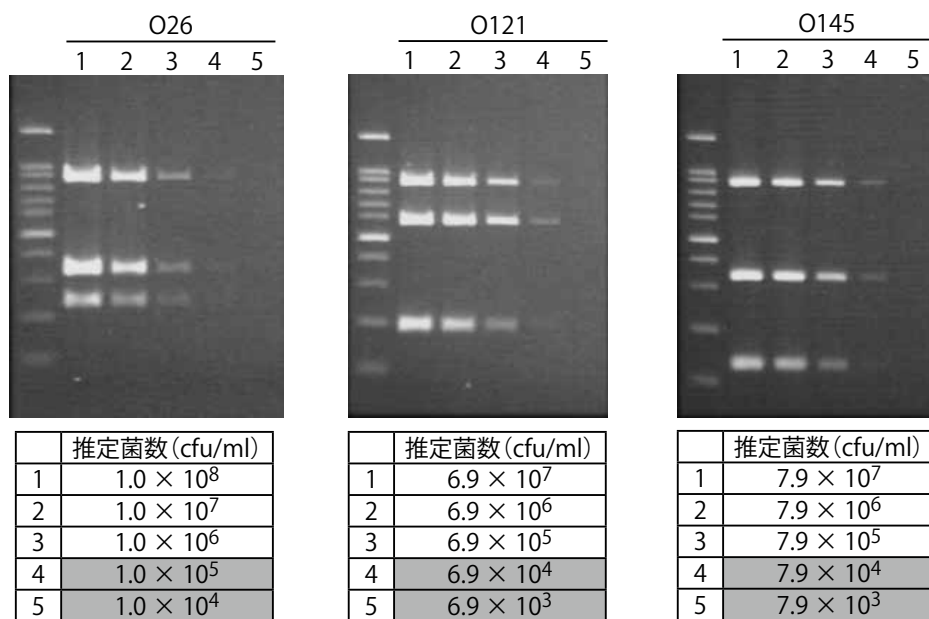
テンプレート DNA の準備：

「腸管出血性大腸菌 O26, O111 及び O157 の検査法について（食安監発 0515 第 1 号）」のアルカリ熱抽出法に従い、それぞれの混和液 100 μl の遠心後沈査に 50 mM NaOH を 85 μl 添加して熱処理後、1 M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μl 加えて中和し、テンプレート DNA として用いた。

結果：

4.3 × 10⁵ ~ 1.1 × 10⁶ cfu/ml 以上の濃度で検出可能であることが確認された（図 6）。なお、食品培養液のみから調製したテンプレート DNA（陰性コントロール）では非特異的バンドを含むいずれのバンドも確認されなかった（データ未掲載）。





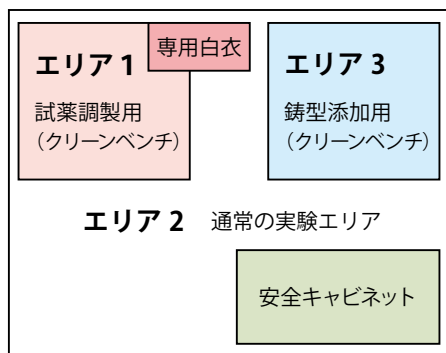
試験回数：全てにおいて1回

図6. 食品汚染菌の検出評価

【まとめ】

本製品は、腸管出血性大腸菌の主要7種類のO血清群および3種類の腸管出血性大腸菌病原因子を1チューブで反応することができ、判定や検出を簡便で迅速に実施することができる。本製品は特異性や安定性において十分な実用性が評価され、単離された大腸菌株のO血清群タイプングおよび腸管出血性大腸菌病原因子の判定に有効であると考えられる。さらに、食品汚染菌の検出評価では 1.1×10^6 cfu/ml 以上の感度で検出可能であったことから、増菌法等と組み合わせて食品や糞便などに含まれる腸管出血性大腸菌の有無およびそのO血清群をスクリーニングする手法としても有効であると期待される。

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。
(鑄型となる 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鑄型 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. 関連製品

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)
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)
TBE (Tris-borate-EDTA) powder (製品コード T905)
Tris-Borate-EDTA Buffer (TBE) Powder, pH8.3 (製品コード T9121)
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)
Mupid-One (製品コード O1-01)

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。
- ・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 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