

## 取扱説明書

## シカジーニクス® 分子疫学解析POTキット (大腸菌用)

Cica Geneus® *E. coli* POT KIT

## 1. はじめに

本キットは、大腸菌の菌種同定、クローン同定および菌株識別を行なうための遺伝子型別キットです。藤田医科大学の鈴木匡弘先生と中部大学の研究グループが開発したPCR-based ORF Typing 法 (POT 法) を基に製品化しました。本キットでは1検体につき2種類のマルチプレックスPCRを行ない、目的サイズのバンドの有無を判定することで、大腸菌の菌種同定、クローン同定および菌株識別を遺伝学的に決定します。

## 2. 製品形態

製品名	シカジーニクス® 分子疫学解析 POT キット(大腸菌用)
製品番号	Cica Geneus® <i>E. coli</i> POT KIT
製品番号	08362-97
容量	30 回分
保管温度	冷凍 (-20 °C ~ -25 °C)

## 3. キット構成 (30 回)

個別名称	容量
試薬 A (ラベル白) AptaTaq DNA Master (5 × Conc.) <sup>※1</sup>	240 μL × 1 本
試薬 B (ラベル赤) PCR サプリメント	240 μL × 1 本
試薬 C (ラベル紫) プライマーミックス α	120 μL × 1 本
試薬 D (ラベル緑) プライマーミックス β	120 μL × 1 本
試薬 E (ラベル黄) ポジティブコントロール	240 μL × 1 本
試薬 F (ラベル青) 6 × ローディングバッファー	240 μL × 1 本

<sup>※1</sup>AptaTaq DNA Master は、Roche Diagnostics K. K. の商品です。

## 4. 本キット以外に必要な試薬 (別売)

製品番号	製品名	容量	用途
08178-96	シカジーニクス® DNA 抽出試薬	120 回	テンプレート調製
本キットは上記シカジーニクス® DNA 抽出試薬の使用を推奨しております。			
01089-23	アガロース KANTO HC	100 g	電気泳動用
46510-79	10 × TBE 緩衝液	1 L	電気泳動用
14575-43	臭化エチジウム溶液 (2 mg/mL)	10 mL	電気泳動用
49898-89	PCR ラック	1 個	チューブ用ラック
49898-70	NEB COOLER	1 個	試薬冷蔵保存用クーラー

## 5. 原理

単離培養した大腸菌から DNA を抽出します。DNA 抽出液をテンプレート DNA として、マルチプレックス PCR で菌種特異的 ORF (オープンリーディングフレーム)、進化の過程で取り残された Genomic Islet、外来遺伝子の遺伝子クラスターである Genomic Island、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) の CTX 遺伝子を検出します。検出された遺伝子の保有パターンから菌種の推定同定および菌株識別を行ないます。

表1 検出 ORF の種類とその PCR 増幅産物サイズ

	POTNo.	増幅サイズ (bp)	ターゲット領域
Reaction mixture 1	PCR PC	652	<i>E. coli</i> 判定領域
	POT 1-1	511	Genomic Islet-1
	POT 1-2	415	Genomic Islet-2
	POT 1-3	363	Genomic Islet-3
	POT 1-4	307	Genomic Islet-4
	POT 1-5	253	Genomic Islet-5
	POT 1-6	222	Genomic Islet-6
	POT 2-1	178	<i>bla</i> CTX-M-2
	POT 2-2	146	Genomic Island-1
	POT 2-3	123	Genomic Island-2
Reaction mixture 2	POT 2-4	98	Genomic Island-3
	POT 2-5	80	Genomic Island-4
	PCR PC	652	<i>E. coli</i> 判定領域
	POT 2-6	527	Genomic Islet-7
	POT 2-7	436	Genomic Island-5
	POT 2-8	361	<i>bla</i> CTX-M-1
	POT 3-1	311	Genomic Island-6
	POT 3-2	250	Genomic Island-7
	POT 3-3	219	Genomic Islet-8
	POT 3-4	179	Genomic Island-8
POT 3-5	154	Genomic Island-9	
POT 3-6	122	Genomic Islet-9	
POT 3-7	102	Genomic Island-10	
POT 3-8	79	<i>bla</i> CTX-M-9	

PCR PC は、大腸菌検出用の PCR ポジティブコントロールを指します。

## 6. 適用範囲

大腸菌

## 7. プロトコール

## ① DNA 抽出

単離した大腸菌を液体培地もしくは寒天培地で培養し、別売のシカジーニクス® DNA 抽出試薬 (製品番号: 08178-96) を用いて DNA を抽出して下さい。

## ・シカジーニクス® DNA 抽出試薬の使用法

- 1) 別途調製したシカジーニクス® DNA 抽出試薬混合液 100 μL をマイクロチューブに入れて下さい。
- 2) 菌液 10 μL を 1) のマイクロチューブに入れて軽く混合して下さい。液体培養の場合は、培養液の原液を菌液として下さい。平板培養の場合は、コロニーを滅菌水に懸濁し、マクファーランド比濁法を用いて濁度標準液 第 1~3 番程度となるように懸濁したものを菌液として下さい。菌濃度は濃すぎないように注意して下さい。
- 3) 72 °C で 6 分間、94 °C で 3 分間インキュベートして下さい。
- 4) 遠心分離し、その上清をテンプレート DNA として下さい。

## ② PCR

各試薬を室温で融解して下さい。融解後、直ちに転倒混和もしくはタッピングで穏やかに混和してスピンドアウン後、氷冷して下さい。表 2 に従って 1 検体につき 2 種類の PCR 反応液を PCR チューブに調製して下さい。ポジティブコントロール (試薬 E) を検体にする場合は、テンプレート DNA と置き換えて使用して下さい。なお、調製した PCR 反応液の室温放置は避けて下さい。

表2 PCR 反応液の調製

組成	Reaction mixture 1	Reaction mixture 2
テンプレート DNA 溶液	8.0 μL	8.0 μL
試薬 A (AptaTaq DNA Master)	4.0 μL	4.0 μL
試薬 B (PCR サプリメント)	4.0 μL	4.0 μL
試薬 C (プライマーミックス α)	4.0 μL	
試薬 D (プライマーミックス β)		4.0 μL
合計	20.0 μL	20.0 μL

PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、下記のパターン I もしくはパターン II の条件で PCR を行なって下さい。反応終了後は 4 °C で保存して下さい。

## パターン I

94 °C: 15 秒  
60 °C: 30 秒 + 6 秒<sup>※2</sup> } 30 回繰返し

<sup>※2</sup> は下記のようにインキュベーション時間を 1 サイクル毎に 6 秒ずつ延ばして下さい。

- 1 サイクル目 30 秒
- 2 サイクル目 36 秒
- 3 サイクル目 42 秒
- ...

## パターン II

94 °C: 15 秒  
60 °C: 180 秒 } 30 回繰返し

## ③ アガロースゲル電気泳動

- 1) 1 × TBE 緩衝液を用いて、4 % アガロースゲルを作製して下さい。
- 2) PCR 反応後のチューブに 4 μL の試薬 F (6 × ローディングバッファー) を加え、良く混合して下さい。
- 3) この混合液をアガロースゲルのウェルに 6 μL アプライして下さい。
- 4) 電気泳動条件は、100 V、60 分間程度を目安にして、ローディングバッファーに含まれるブロモフェノールブルー (青紫色) の色素がゲルから抜け出す前に電気泳動を止めて下さい。分子量マーカーは 50 bp DNA Ladder が好適です。

## ④ 検出

電気泳動後のゲルを 0.5 μg/mL の臭化エチジウム溶液に約 30 分間浸し、DNA を染色して下さい。染色後のゲルは UV トランスイルミネーターを用いて観察し、泳動像を写真撮影して下さい。



## 取扱説明書

## シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット (大腸菌用)

Cica Geneus® E. coli POT KIT

## 8. バンドパターンの変換

バンドパターンの読み取りは濃淡に関わらず目的サイズのバンドがある場合は(1)、無い場合は(0)を解析用エクセルシート※に入力して下さい。参考例として図1の電気泳動例を解析した結果を表3に示します。まず、PCR PCのバンドが検出されたかどうかで、大腸菌であるか否かを判定します。次に、PCR PCを除いた22本のバンドには、それぞれPOT1~3に分類されるPOT No.が割り振られています。また、各POT No.には表3のように1、2、4、8、16、32、64、128のPOT係数が割り振られています。POT値1はPOT No. 1~1~1~6で検出されたPOT係数の合計値、同様にPOT値2はPOT No. 2~1~2~8の合計値、POT3値はPOT No. 3~1~3~8の合計値になります。

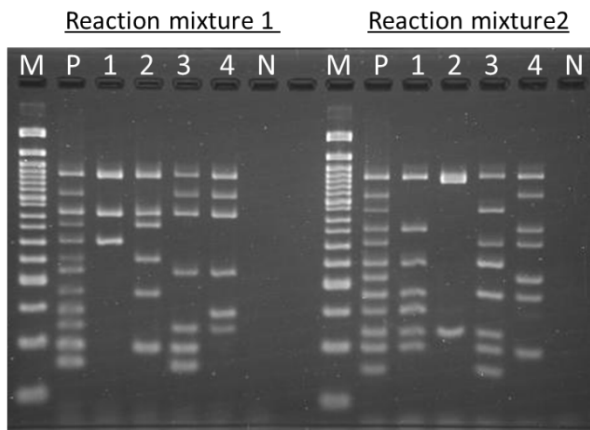


図1 電気泳動例

下記の4株についてPOT法解析した電気泳動パターンの実例  
M: 50 bp ラダー、P: ポジティブコントロール、N: ネガティブコントロール (TE 緩衝液)、1~4: 大腸菌の分離株

表3 バンドパターンの読み取り(図1の電気泳動例の場合)

	POT No.	bp	POT係数	図1におけるサンプル番号			
				1	2	3	4
Reaction mixture 1	PCR PC	652	—	1	1	1	1
	POT 1-1	511	32	0	0	1	1
	POT 1-2	415	16	1	1	1	1
	POT 1-3	363	8	0	1	0	0
	POT 1-4	307	4	1	0	0	0
	POT 1-5	253	2	0	1	0	0
	POT 1-6	222	1	0	0	1	1
	POT 2-1	178	128	0	1	0	0
	POT 2-2	146	64	0	0	0	1
	POT 2-3	123	32	0	0	1	1
Reaction mixture 2	POT 2-4	98	16	0	1	1	0
	POT 2-5	80	8	0	0	1	0
	PCR PC	652	—	1	1	1	1
	POT 2-6	527	4	0	0	0	1
	POT 2-7	436	2	0	0	1	0
	POT 2-8	361	1	1	0	0	1
	POT 3-1	311	128	0	0	1	1
	POT 3-2	250	64	1	0	1	0
	POT 3-3	219	32	0	0	0	1
	POT 3-4	179	16	1	0	1	1
POT型	POT 1			20	26	49	49
	POT 2			1	144	58	101
	POT 3			94	4	215	178

※解析用のエクセル計算シートは弊社製品ホームページからダウンロードできません。

## 9. 判定

PCR PCが陽性的場合、大腸菌(*Escherichia coli*)と判定します。POT1値は菌株の系統依存的な部位の保有パターンを示します。POT2値とPOT3値は、外来遺伝子からなる遺伝子クラスターである Genomic Island と基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)の遺伝子型である CTX-M-1 group(POT2-8)、CTX-M-2 group(POT2-1)、CTX-M-9 group(POT3-8)の検出パターンから算出しています。同一POT型(POT1~3値の数値がすべて同一)の分離株は、水平伝播の可能性が疑われます。集団感染から得られた分離株は多くの場合、同一POT型となります。関連のない分離株同士が同一POT型になる場合もありますので、被検菌の検出背景(同一集団感染が疑われる要素)を加味して、総合的に判断して下さい。ESBL産生大腸菌で多く分離される multilocus sequence typing (MLST) 法の Sequence Type(ST)である ST131型はPOT1値が49となります。その他のPOT1値には複数のST型が含まれることが多くみられます。POT2値が128以上の場合はCTX-M-2 group、奇数の場合はCTX-M-1 group、POT3値が奇数の場合はCTX-M-9 groupの各ESBL遺伝子を保有しています。なお、プライマーセットに含まれないESBL遺伝子やCTXの遺伝子型によっては検出できないため、ESBL産生株の判定は薬剤感受性試験結果等に従って下さい。

## 10. 菌株識別能力

大腸菌117株(そのうち82株はMLST法でST131型に分類される)について、POT法とXbaIを用いたPFGE法で識別試験を行ったところ、117株は66のPOT型および63のPFGE型に分類されました。Simpson's indexはそれぞれ0.983、0.984となりPOT法はPFGE法と同等の識別能を有していました。

## 11. 使用上の注意事項

- 1) 菌株によっては非特異的なバンドが検出される場合があります。ポジティブコントロールで検出されるバンドサイズのみを判定基準として下さい(図1)。
- 2) PCR反応液は最大50 μL程度までスケールアップすることができます。
- 3) 各試薬は、凍結融解を繰り返すと性能が低下する可能性があります。一度に使用しきれない場合は、小分けして-20℃~-25℃で保存して下さい。
- 4) PCR反応液の室温放置は結果に影響を及ぼす可能性があります。反応液の調整は、氷上またはPCRクーラーの使用を推奨します。
- 5) 使用されるサーマルサイクラーによっては、温度制御誤差や昇温スピード等の違いにより、PCR条件の最適化が必要な場合があります。PCRで95℃以上の加温を行なうと、遺伝子増幅酵素の活性が著しく落ちる場合がございます。また、PCRチューブは必ず使用されるサーマルサイクラーに合わせて、推奨されたものをお選び下さい。

## 12. その他

- 1) 本キットは試験研究用です。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。
- 2) 本キットは愛知県と中部大学から特許許諾を受けて販売しています。他メーカーの製品に関するライセンス・パテントについては、各メーカーにご確認下さい。

