

## 取扱説明書

シカジーニクス® 病原遺伝子検出PCRキット(下痢原性大腸菌用)2  
Cica Genus® Pathogenesis Gene Detection PCR Kit (for Diarrheagenic *E. coli*)2

## 1. はじめに

下痢原性大腸菌(Diarrheagenic *Escherichia coli*)とは、ヒトに腹痛・下痢症を引き起こす大腸菌の総称であり、性質や症状の違いにより5種類及び他の下痢原性大腸菌に分類されます。また、近年、大腸菌と近縁の下痢症起因菌である *Escherichia albertii* (*E. albertii*)を原因とする食中毒や集団感染事例がたびたび発生しております。本キットではマルチプレックスPCR法により、下痢原性大腸菌のうち主な5種類である腸管出血性大腸菌またはベロ毒素産生性大腸菌(EHEC/VTEC)、腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、腸管凝集集着性大腸菌(EAggEC)及び *E. albertii* の病原性に関わる遺伝子を同時に、かつ区別して検出できます。

## 2. 製品形態

製品名	シカジーニクス® 病原遺伝子検出 PCR キット(下痢原性大腸菌用)2 Cica Genus® Pathogenesis Gene Detection PCR Kit (for Diarrheagenic <i>E. coli</i> )2
製品番号	08377-96
容量	50 回分
保管温度	冷凍 (-25 °C ~ -20 °C)

## 3. キット構成 (50 回)

個別名称	容量
試薬 A(ラベル白) AptaTaq DNA Master (5 × Conc.) <sup>※1</sup>	400 µL × 1 本
試薬 B(ラベル赤) PCR サプリメント	700 µL × 1 本
試薬 C(ラベル紫) プライマーミックス 1	200 µL × 1 本
試薬 D(ラベル緑) プライマーミックス 2	200 µL × 1 本
試薬 E(ラベル黄) ポジティブコントロール	250 µL × 1 本
試薬 F(ラベル青) 6 × ローディングバッファー	400 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 回分	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
46509-79	10 × TAE 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

## 5. 原理

下痢原性大腸菌または *E. albertii* の菌種判定領域・病原遺伝子領域を特異的に増幅するプライマーを用いて、マルチプレックス PCR で遺伝子増幅を行ない、アガロースゲル電気泳動に供して増幅産物のサイズを確認します。

## 6. 適用範囲

下痢原性大腸菌のうち腸管出血性大腸菌またはベロ毒素産生性大腸菌(EHEC/VTEC)、腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、腸管凝集集着性大腸菌(EAggEC)及び *E. albertii*

## 7. プロトコール

## ①DNA 抽出

単離した大腸菌または *E. albertii* 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 溶液として下さい。

## ②PCR

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 1 に従って 1 検体あたり Reaction mixture 1 と 2 の 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 1 PCR 反応液の調製

組成	Reaction mixture 1	Reaction mixture 2
テンプレート DNA 溶液	5.0 µL	5.0 µL
試薬 A(AptaTaq DNA Master)	4.0 µL	4.0 µL
試薬 B(PCR サプリメント)	7.0 µL	7.0 µL
試薬 C(プライマーミックス 1)	4.0 µL	-
試薬 D(プライマーミックス 2)	-	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。

94 °C: 15 秒 } 30 回繰返し  
60 °C: 60 秒

## ③アガロースゲル電気泳動

- 1) 1 × TAE 緩衝液を用いて、3 %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 アプラインして下さい。
- 4) 電気泳動条件は、100 V、35 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プ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 100 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。染色したゲルは 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。

## 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<sup>※2</sup>に入力して下さい。uidA、lysP、インターナルコントロールを除いた 7 個の増幅産物にはそれぞれ係数が割り振られています(表 2)。

<sup>※2</sup>解析用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す。

表 2 検出される遺伝子の種類とその PCR 増幅産物サイズ

	遺伝子名	増幅サイズ(bp)	係数
Reaction mixture 1	uidA ( <i>E. coli</i> 判定領域)	652	-
	stx1	532	32
	stx2	413	64
	lysP ( <i>E. albertii</i> 判定領域)	252	-
	eae	199	1
インターナルコントロール			
Reaction mixture 2	aggR	499	2
	invE	379	4
	elt	270	8
	est	191	16
	インターナルコントロール	120	-

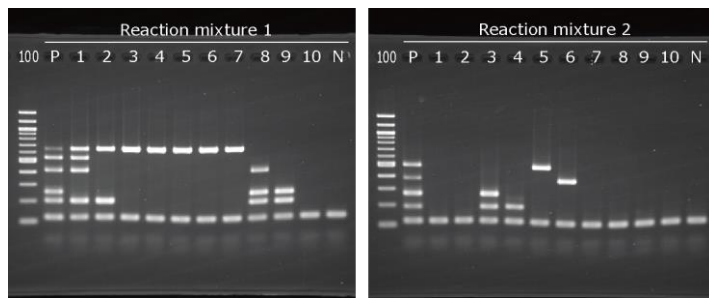


図 1 電気泳動例

下記の 10 株について本キットを用いて解析した電気泳動パターンの実例

100:100 bp DNA Ladder, P: ポジティブコントロール(試薬 E)、1: *E. coli* ATCC® 35150(EHEC/VTEC)、2: *E. coli* ATCC® 43887(EPEC)、3: *E. coli* ATCC® 35401(ETEC)、4: *E. coli* NCTC® 11603(ETEC)、5: *E. coli* 分離株(EAggEC)、6: *E. coli* ATCC® 43893(EIEC)、7: *E. coli* ATCC® 11775(非病原性)、8: *E. albertii* 分離株(*stx2f*, *eae* 保有)、9: *E. albertii* LMG 20976(*eae* 保有)、10: *Citrobacter freundii* ATCC® 8090、N: ネガティブコントロール(TE 緩衝液)

## 取扱説明書

シカジーニアス® 病原遺伝子検出PCRキット(下痢原性大腸菌用)2  
Clca Genus® Pathogenesis Gene Detection PCR Kit (for Diarrheagenic *E. coli*)2

## 9. 病原型の判定

*uidA* が検出された場合は、表 2、3 を参考に、係数と結果(1 または 0) を乗算したものをポイントとし、ポイントの合計を算出して下さい。合計ポイントを表 4 と照らし合わせ、大腸菌の病原型を判定して下さい。*lysP* が検出された場合は、*E. albertii* と判定して下さい。*uidA*、*lysP* の両方とも検出されなかった場合は、菌種判定不能とします。インターナルコントロールが検出されない場合、PCR が正しく行なわれていない可能性が考えられます。

表 3 係数への変換方法例(図 1 のサンプル番号 1 (ATCC® 35150))

	遺伝子名	bp	係数	結果	ポイント
Reaction mixture 1	<i>uidA</i> ( <i>E. coli</i> 判定領域)	652	-	1	
	<i>stx1</i>	532	32	×	1 = 32
	<i>stx2</i>	413	64	×	1 = 64
	<i>lysP</i> ( <i>E. albertii</i> 判定領域)	252	-	0	
	<i>eae</i>	199	1	×	1 = 1
	インターナルコントロール	120	-	1	
Reaction mixture 2	<i>aggR</i>	499	2	×	0 = 0
	<i>invE</i>	379	4	×	0 = 0
	<i>elt</i>	270	8	×	0 = 0
	<i>est</i>	191	16	×	0 = 0
	インターナルコントロール	120	-	1	
合計ポイント					= 97

上記の 97 の場合は、EHEC/VTEC(*stx1+*、*stx2+*)と判定できます。

表 4 合計ポイントと下痢原性大腸菌の分類

合計ポイント	分類
0	EHEC/VTEC、EPEC、ETEC、EIEC、EA <sub>aggEC</sub> 以外の大腸菌
1	EPEC( <i>eae+</i> )
2	EA <sub>aggEC</sub> ( <i>aggR+</i> )
4~7	EIEC( <i>invE+</i> )
8~15	ETEC( <i>elt+</i> )
16~23	ETEC( <i>est+</i> )
24~31	ETEC( <i>est+</i> 、 <i>elt+</i> )
32~63	EHEC/VTEC( <i>stx1+</i> )
64~95	EHEC/VTEC( <i>stx2+</i> )
96~127	EHEC/VTEC( <i>stx1+</i> 、 <i>stx2+</i> )
上記以外	生化学的性状や細胞培養試験等を併用して判断して下さい

下痢原性大腸菌の分類は、下痢原性大腸菌の分類の見直しについて IASR Vol. 33 p.5-7 (2012) に従いました。

表 5 バンドパターンの読み取り(図 1 の電気泳動結果の場合)

	遺伝子名	bp	係数	サンプル番号										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Reaction mixture 1	<i>uidA</i>	652	-	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	<i>stx1</i>	532	32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>stx2</i>	413	64	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	<i>lysP</i>	252	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	<i>eae</i>	199	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	インターナルコントロール	120	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Reaction mixture 2	<i>aggR</i>	499	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	<i>invE</i>	379	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	<i>elt</i>	270	8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>est</i>	191	16	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	インターナルコントロール	120	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
合計ポイント				97	1	24	16	2	4	0	65	1	0	
病原型の判定				EHEC/VTEC( <i>stx1+</i> 、 <i>stx2+</i> 、 <i>eae+</i> )	EPEC( <i>eae+</i> )	ETEC( <i>est+</i> 、 <i>elt+</i> )	ETEC( <i>est+</i> )	EA <sub>aggEC</sub> ( <i>aggR+</i> )	EIEC( <i>invE+</i> )	大腸菌	<i>E. albertii</i> ( <i>stx2+</i> 、 <i>eae+</i> )	<i>E. albertii</i> ( <i>eae+</i> )	菌種判定不能	

## 10. 使用上の注意事項

- 1)本キットでは、志賀赤痢菌が保有する志賀毒素遺伝子も *stx1* として検出します。
- 2)本キットでは、*E. albertii* が保有する *stx2f1* バリエーションも *stx2* として検出します。
- 3)本キットでは、*Citrobacter* 属が保有する *eae* も検出します。
- 4)本キットでは、赤痢菌及び志賀赤痢菌が保有する *invE* も検出します。
- 5)本キットでは、*est* のブタ型(STp)とヒト型(STh)の両方を検出します。
- 6)下記の点を踏まえたうえで、生化学的性状や細胞培養試験等を併用して判断して下さい。
  - ① *aggR*、*invE*、*est*、*elt* はプラスミドにある遺伝子のため、培養中に脱落する場合があります。
  - ② 赤痢菌は大半が *uidA* を保有しているため、本キットで大腸菌と区別することはできません。
  - ③ *uidA*、*lysP* の両方とも陰性の場合、本キットでは菌種の判定はできません。
  - 7)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 -25℃~-20℃ で保存して下さい。
  - 8) 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。反応液の調製は、氷上または PCR クーラーの使用を推奨します。
  - 9) 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あります。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、推奨されたものを選び下さい。
  - 10) DNA を染色する際に使用する臭化エチジウム溶液は強い変異原性と刺激性を有するため、必ず保護具を着用して取り扱って下さい。

## 11. 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)試薬及び器具等を廃棄する場合には、関係法令に従って処理して下さい。

