

DEC Primer Mix 日本語使用説明書

下痢原性大腸菌 (DEC) の PCR 検出用プライマーMIX

* 英文の添付文書も必ずご確認ください

特徴

DEC Primer Mix は単離したコロニーから下痢原性大腸菌 (DEC) の毒性遺伝子を検出するための製品です。

DEC Primer Mix はそれぞれ 7 つの毒性遺伝子に対するプライマーとインターナルコントロールとして 16S rDNA に対するプライマーの合計 8 つのプライマーペア *intimin (eae)*, *verocytotoxin 1 (vtx1)*, *verocytotoxin 2 (vtx2)*, *heat stable enterotoxin, human variant (estA-human)*, *heat stable enterotoxin, porcine variant (estA-porcine)*, *heat labile enterotoxin (eltA)*, *invasive plas-mid antigen (ipaH)* and 16S rDNA (positive internal control) の混合物を含んでいます。全てのプライマーは合成シングルストランドオリゴヌクレオチドで、フリーの 5'末端と 3'水酸基を持っています。それぞれのプライマーペアはマルチプレックス PCR で最適になるように個々の濃度が最適化されており、プライマー Mix は PCR100 テストに十分な 520 μl (1 テスト 4 μl) です。パッケージには 2 つのコントロール DNA セットが含まれています。コントロール 1 は非病原性大腸菌から精製した DNA 及び、*eae*, *vtx1*, *vtx2* 遺伝子を持った菌株由来の DNA から構成されており、コントロール 2 は非病原性大腸菌株、*ipaH* 遺伝子を持った大腸菌株、*eltA* と *estA* 遺伝子を持った大腸菌株より精製された DNA の混合物から構成されています。それぞれのコントロールはバイアルに 1ml づつ含まれており、少なくとも 100 テストの PCR が行えます (1 テスト 8 μl)。

腸管病原性大腸菌株の様々なグループの中でも特に重要な DEC のグループは、腸管出血性大腸菌 (VTEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC & A/EEC) の 4 種です。DEC の同定に使用される遺伝子とサイズが以下のリストに記してあります。

Gene	DEC	Amplicon size (bp)
16S rDNA ^a	-	1062
<i>ipaH</i> ^b	EIEC	647
<i>eltA</i>	ETEC	479
<i>vtx2</i>	VTEC	420
<i>eae</i>	EPEC, A/EEC ^c	377
<i>vtx1</i> ^d	VTEC	260
<i>estA-porcine</i> ^e	ETEC	160
<i>estA-human</i> ^e	ETEC	151

- PCR 評価のためのほとんどのグラム陰性菌で増幅されるフラグメント。
- Shigella spp* にも存在
- EPEC と A/EEC の区別はセロタイプに基づく
- Shigella dysenteriae I* にも存在
- 通常のアガロースゲル電気泳動では増幅サイズの違いが見られない

必要な器具試薬 (キットには含まれておりません)

- PCR 装置: MJ Research Tetrad 2, Applied Biosystems 9700 と 9600 では試験済み
- TE-buffer (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH8)
- 10% Chelex-100 in TE-buffer
- PCR grade water
- 10 x PCR buffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl)
- 50 mM MgCl₂
- dNTP-mix (each 1.25 mM)
- Platinum[®] Taq Polymerase 5 U/μl (Invitrogen)
- 1.5 - 2.0% agarose gel
- Loading buffer
- DNA marker

使用方法

- 1 度にあまり PCR を行わない場合は、プライマー Mix をいくつかのチューブに分注し、一度の使用で 1 本使うようにする
- 培養プレートから 10 個のコロニーを釣菌し、200 μl の 10% Chelex-100 TE-buffer を含むチューブに懸濁する
- 懸濁液を 5 分間ボイルし、遠心する (2200 x g で 5 分)
- 15 μl の上清を 100 μl の 1 x TE-buffer で希釈し、8 μl を直接 PCR に使用する (他の市販の DNA 抽出法も使用可能)
- サンプルの調整と PCR のセットアップはコンタミネーションの可能性のない場所で行う。サンプル数に合わせて Master Mix を調整し、31.6 μl をそれぞれのチューブに分注する。それぞれのチューブでの試薬の割合は次のようになっている

Mastermix:

PCR grade water	11.1 μL
10 x PCR buffer	5.0 μL
50 mM Mg Cl ₂	3.5 μL
dNTP-mix (each 1.25 mM)	8.0 μL
Primer Mix	4.0 μL
Total	31.6 μL

- 8 μl のテンプレート DNA (サンプルもしくはコントロール) をそれぞれのチューブに添加し、混ぜる
- 最後に 0.40 μl の Platinum Taq Polymerase 5U/μl をそれぞれのチューブに添加し、混ぜる
- 以下の条件で PCR 反応を行う

Step	Temp. (°C)	Time
Initial denaturation	95	2 min
35 cycles of:		
Denaturation	94	50 sec
Annealing	62	40 sec
Extension	72	50 sec
Final extension	72	3 min

- アガロースゲル (1.5 - 2.0%) のウェルに PCR 産物を 5 - 15 μl ずつアプラインし、増幅産物を泳動してサイズを確認する

解析結果の解釈

以下の図は、様々な異なるテンプレートを含む PCR 結果を 100bp の DNA マーカーと比較している

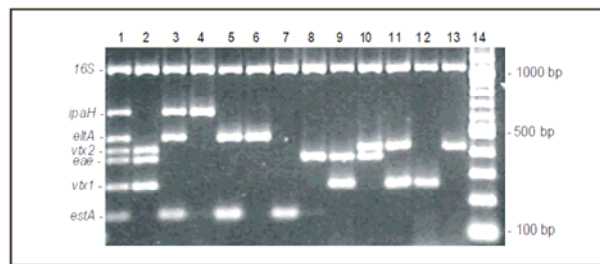


図: 13 の異なるテンプレートの解析

レーン 1: *estA*, *vtx1*, *eae*, *vtx2*, *eltA*, *ipaH*, レーン 2: *vtx1*, *vtx2*, *eae*, レーン 3: *estA*, *eltA*, *ipaH*, レーン 4: *ipaH*, レーン 5: *estA*, *eltA*, レーン 6: *eltA*, レーン 7: *estA*, レーン 8: *eae*, レーン 9: *vtx1*, *eae*, レーン 10: *vtx2*, *eae*, レーン 11: *vtx1*, *vtx2*, レーン 12: *vtx1*, レーン 13: *vtx2*, レーン 14: 100 bp DNA marker

特異性

"The International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre (WHO)", Statens Serum Institut, Denmark から合計 142 の Reference Strain がマルチプレックス PCR によってテストされた。その菌株は広く異なるセロタイプと毒性遺伝子の組み合わせを示した。同じ遺伝子をターゲットとした DNA ハイブリッド化法と比較して、PCR 法は 100% の特異性を示した。13 の非大腸菌種もテストしたが 16S rDNA のコントロールバンドのみ検出された。

保存と使用期限

DEC Primer Mix は -20°C で保存した場合、1 年間安定です。分注して 4 - 8°C で保存した場合 2 週間まで安定です。使用期限がラベルに記載されています。

参考文献

- Nataro, J. P. and J. B. Kaper. 1998. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol Rev. 11:142-201.

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>