



PFGE 解析報告書(細菌)

シリアル番号 XXXXXxx
管理番号 SIID 00000
作業完了日 202x 年 xx 月 xx 日
発行日 202x 年 xx 月 xx 日

極秘資料

本報告書の使用にあたっての確認事項

1. 本報告書は株式会社テクノスルガ・ラボ 技術責任者による承認済みです。
2. 研究発表(論文投稿)や特許明細書への転用を除き、本報告書の一部または全部をそのままあるいは改変して第三者へ転用などされた場合には、株式会社テクノスルガ・ラボは一切の責任を負いかねます。
3. 当社受託サービス等は、試験・研究用途を目的として販売しております。当社受託サービスを医療や臨床診断などの試験・研究目的以外へご使用される場合、これに起因する損失・損害等については、当社では一切の責任を負いかねます。

技術責任者

印

株式会社テクノスルガ・ラボ 研究センター 技術部

〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎 388 番地の 1

TEL : 054-349-6211 FAX : 054-349-6121

Mail : tsl-contact@tecsrg.co.jp



検体情報

検体名	SIID	受取日
SAMPLE1	00000-01	202x 年 xx 月 xx 日
SAMPLE2	00000-02	202x 年 xx 月 xx 日

備考

--

目的

PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) 法により得られるバンドパターンより、検体間のゲノム DNA の多型を比較し、菌株間の異同を推定します。

方法

PFGE 解析の手法は Rice らの方法¹⁾に基づいて行いました。

1. 培養条件

- ・ 培地 標準寒天培地 (Nissui Pharmaceutical, Japan)
- ・ 培養温度 25°C
- ・ 培養時間 24 時間
- ・ その他条件 好気培養

2. サンプルプラグの作製・溶菌酵素

- ・ サンプルプラグ アガロース (1.0 % SeaKem Gold Agarose, Takara Bio, Japan)
- ・ 溶菌酵素 1 mg/ml リゾチーム, 50 µg/ml ムタノリシン, 0.05% サルコシル

3. 除タンパク処理

- ・ 除タンパク処理 1% SDS, 1 mg/ml プロテイナーゼ K

4. 制限酵素処理

- ・ 制限酵素 Bln I (Takara Bio, Japan)

5. 電気泳動

電気泳動条件は、Rice ら¹⁾の条件を参考にしました。

- ・ ゲル 1.0% PFC アガロース (Bio-Rad, USA)
- ・ マーカー ProMega-Markers Lambda Ladders (Promega, USA)
- ・ 泳動装置 CHEF Mapper XA システム (Bio-Rad, USA)

* 会社名、製品名は一般に各社の日本および各国での商標または登録商標です

PFGE 解析によるバンドの解釈基準

菌株間のバンドパターンの変化に影響する事象とその結果についての理論を表 1 および図 1 に示します。

DNA 断片内での塩基配列の点変異の出現により、I. 制限酵素認識部位を取得する場合、II. 制限酵素認識部位を喪失する場合、III. 遺伝子断片の挿入、IV. 遺伝子断片の脱落などが想定されます。

表 1. 細菌 DNA 制限酵素断片のバンドパターンの変化に影響する事象とその結果

遺伝子変異の種類	結果
I. 点変異による制限酵素認識部位の生成	比較株から 1 断片欠き、比較株にはない新たな 2 断片が出現。この 2 断片の分子量の合計は比較株の断片に相当する。結果として 3 バンドの違いとして認められる。
II. 点変異による制限酵素認識部位の喪失	比較株にはない新たな大きい分子量の断片が出現。これに伴い小さな分子量の 2 断片を喪失する。結果として 3 バンドの違いとして認められる。
III. 制限酵素認識部位への DNA の挿入 (挿入 DNA には制限酵素認識部位無し)	比較株と同じ数のバンドを認める。しかし小さな分子量の 1 断片を失い、大きなサイズの新しいバンドが出現する。結果として 2 つのバンドの変化は断片移動となる。
IV. 制限酵素処理断片からの DNA の欠失 (欠失 DNA には制限酵素認識部位無し)	小さいサイズの新たなバンドが出現し、大きなサイズの断片を失う。結果として 2 バンドの違いとして認められる。

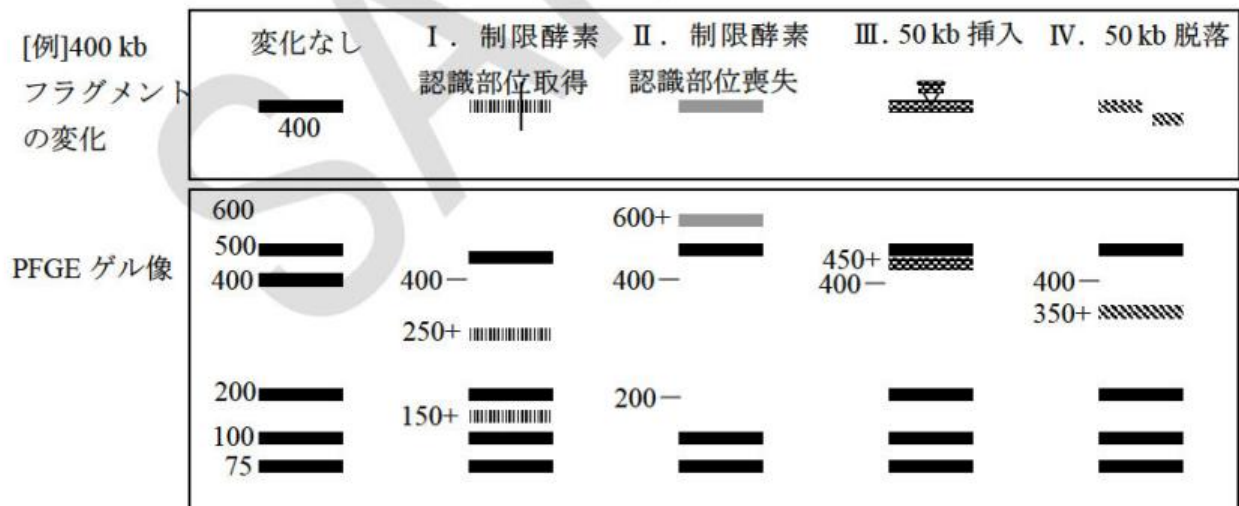


図 1. 細菌 DNA 制限酵素断片のバンドパターンの変化に影響する事象とその結果

米国 CDC の Tenover^{3, 4)}らは PFGE バンドパターン別の評価基準としてゲノム DNA の多型性の確認されている制限酵素と菌種の組み合わせで PFGE 解析をした場合、バンドの変化がなければ同一株、2~6 バンドの相違で同一株の可能性あり、7 バンド以上の相違が認められた場合を別株の可能性が高いとしています。比較する 2 つの菌株のバンドパターンが一致した場合、それらの由来は同じである可能性が高いと考えることができます。しかしバンドパターンの一致は厳密には全く同じ株であることを意味するものではなく、由来が同じである可能性を支持する証拠の一つとされています。たとえバンドのサイズが一致しても、それぞれのバンドの塩基配列まで同じかどうかは分からないためです。注意すべき点は、この基準を適応してよいのは制限酵素断片が 10 個以上得られた場合であり、それ以下の場合の意義については確証がないとされていることです。

表 2. PFGE 解析の評価基準³⁾

分類	遺伝子変異数	バンドの違い	評価
区別できない	0	0	同一株の可能性が高い
きわめて関連あり	1	2~3	同一株の可能性がある
関連の可能性あり	2	4~6	同一株の可能性がある
異なる	≥3	≥7	別株の可能性が高い

結果

得られたバンドパターンから判定を行った結果、SIID000000-01 および 02 は同一バンドパターンを示すことから、両者は同一株の可能性が高いと考えられます。

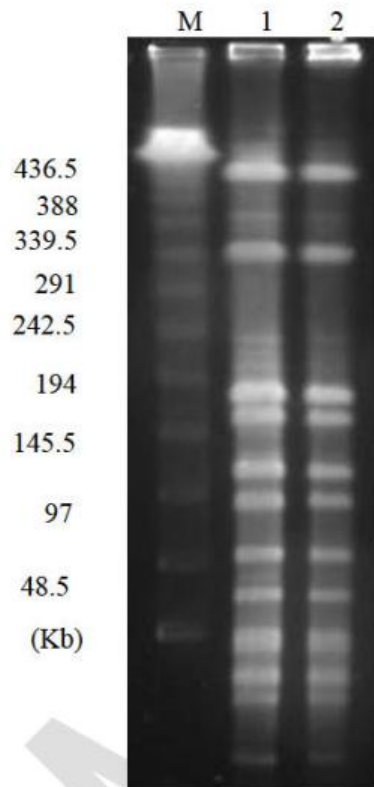


図 2. PFGE ゲル像

M: ProMega-Markers Lambda Ladders

数字は SIID 番号の末尾枝番号を示します。



本報告書に付随する電子データ一覧

データ内容	形式
PFGE ゲル写真	JPEG
デンドログラム	PDF

補足

本報告書に関するご質問等につきましては、株式会社テクノスルガ・ラボ 技術部まで
お問い合わせください。

引用文献

- 1) **Rice DH, Mcmenamin KM, Pritchett LC, Hancock DD, Besser TE.** Genetic subtyping of *Escherichia coli* O157 isolates from 41 Pacific Northwest USA cattle farms. *Epidemiol Infect* 1999;122:479–484.
- 2) **Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., Mickelsen PA, Murray BE et al.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–2239.
- 3) **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Goering V.** How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. *Infect Control* 1997;18:426–439.