

***E. coli/Shigella* Multiplex PCR 試験報告書**

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 : 054-349-6155 FAX : 054-349-6121

Mail : tsl-contact@tecsrg.co.jp

目的

E.coli/Shigella に含まれる菌種*を Multiplex PCR 法により簡易推定します。またベロ毒素遺伝子 (VT1 および VT2)、腸粘膜接着因子インチミン遺伝子 (*eaeA*) の保有の有無を確認します。さらに主要な腸管出血性大腸菌 O 抗原型 (O157, O26, O111) に含まれるか否かを推定します。

* 本試験における対象菌種は、*Escherichia* 属でバイオセーフティレベル 2 以上となる *E. coli*、*E. albertii* および *Shigella* spp. となります。

方法

1. DNA 抽出

- 抽出方法 NucleoSpin Microbial DNA (MACHEREY-NAGEL, GER)

2. PCR 条件*

- 酵素 Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (Takara Bio, Japan)

* Multiplex PCR に使用するプライマー情報は開示していません

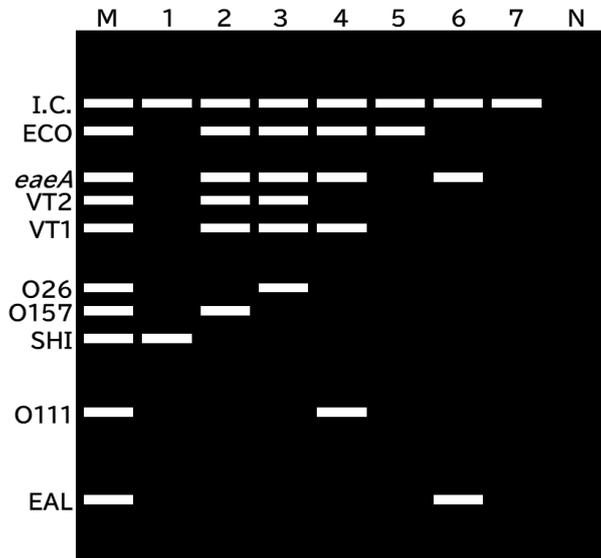
3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

- PAGE 条件 15%ポリアクリルアミドゲル: e・パジエル (ATTO, Japan)
泳動バッファー: WSE-7055 EzRun TG (ATTO)
ミニスラブ電気泳動条件: 42 mA, 85 min

Multiplex PCR の成否については、1) 検体のインターナルコントロール (16S rRNA 遺伝子) で PCR 産物が得られていること、2) 陽性対照 (マーカー) で PCR 産物が得られていること、3) 滅菌水を鋳型にした場合に増幅産物が認められないこと、これらを元に本試験における PCR 反応および鋳型 DNA に問題が無いことを判断しています。

* 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

<結果の見方>



マーカー	
I.C.	細菌 16S rRNA遺伝子
ECO	<i>E. coli</i> (大腸菌)
<i>eaeA</i>	腸粘膜接着因子インチミン遺伝子保有株
VT2	ペロ毒素2型遺伝子保有株
VT1	ペロ毒素1型遺伝子保有株
O26	腸管出血性大腸菌 O26
O157	腸管出血性大腸菌 O157
SHI	<i>Shigella</i> 属
O111	腸管出血性大腸菌 O111
EAL	<i>E. albertii</i>

- レーン番号 M: 陽性対照 (マーカー)
- レーン番号 1: SIIDxxxxx-01
- レーン番号 2: SIIDxxxxx-02
- レーン番号 3: SIIDxxxxx-03
- レーン番号 4: SIIDxxxxx-04
- レーン番号 5: SIIDxxxxx-05
- レーン番号 6: SIIDxxxxx-06
- レーン番号 N: 陰性対照 (滅菌水)

判定結果例:

- SIIDxxxxx-01 *Shigella* 属
- SIIDxxxxx-02 *E. coli* (O157), VT1 +, VT2 +, *eaeA* +
- SIIDxxxxx-03 *E. coli* (O26), VT1 +, VT2 +, *eaeA* +
- SIIDxxxxx-04 *E. coli* (O111), VT1 +, *eaeA* +
- SIIDxxxxx-05 *E. coli*
- SIIDxxxxx-06 *E. albertii*, *eaeA* +
- SIIDxxxxx-07 その他

結果

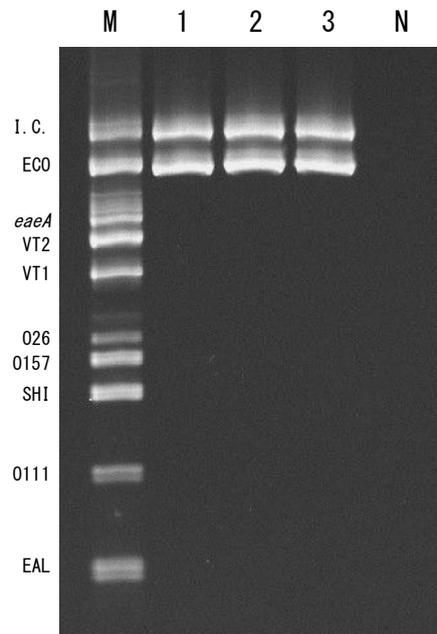


図 1. Multiplex PCR による PCR 増幅産物の PAGE 像

- レーン番号 M: 陽性対照 (マーカー)
- レーン番号 1: SIID00000-01
- レーン番号 2: SIID00000-02
- レーン番号 3: SIID00000-03
- レーン番号 N: 陰性対照 (滅菌水)

まとめ

	SIID00000-01	SIID00000-02	SIID00000-03
推定される菌種	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
ベロ毒素遺伝子	—	—	—
インチミン遺伝子	—	—	—
O157, O26, O111 判定	—	—	—

+：陽性，-：陰性を示します

- * 本結果は Multiplex PCR 法による簡易的な種推定となります。種同定にはゲノム解析が必要です。
- * 本試験は、菌種や抗原型などを確定する試験ではございません。
- * 16S rDNA塩基配列解析による結果と、推定される菌種（属）が異なる場合がございます。
- * Multiplex PCR 法による各種遺伝子の検出結果は、当該遺伝子を保有していることを示すものであり、当該遺伝子の発現、当該遺伝子産物の産生を証明するものではありません。
- * 各種毒素遺伝子が検出されない場合においても、毒素の非産生株であることを保証するものではありません。
- * 非特異的な増幅産物が検出される場合がありますが、マーカーにない増幅産物は結果の判定に使用しておりません。
- * 新種の場合、既知の遺伝子配列と異なる可能性があるため、各遺伝子保有株においても、PCR増幅産物が得られない可能性があります。またインターナルコントロールの増幅が弱い場合におきましても、特異的なPCR産物の増幅が認められる場合、試験結果に影響はありません。

本報告書に付随する電子データ一覧

データ内容	形式
PAGE 像	JPEG

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。