

リアルタイム PCR を用いた腸管出血性大腸菌 志賀毒素遺伝子迅速検出・型別法の検討

山本美和子 河本 秀一 古田 喜美 橋渡 佳子
毛利 好江 下村 佳 石村 勝之 佐々木敏之
萱島 隆之 平崎 和孝 荻野 武雄

はじめに

腸管出血性大腸菌感染事例では、分離菌株の志賀毒素(STX)産生性の確認が必要である。また、迅速性も求められることから、当所ではPCR法による志賀毒素遺伝子(stx)検出を多用してきた。このPCR法は反応開始から目的遺伝子の検出まで3時間程度で行える。一方、炭疽菌テロ対策を主目的として当市に導入されたリアルタイムPCR装置(Light Cycler™)は、反応チューブにガラスキャピラリーを使用するため、熱伝導率が高く、約1時間の反応で目的遺伝子を検出する性能を有する。また、融解曲線分析により、増幅された遺伝子DNAの融解温度(Tm)が確認できるため、従来法で必要とする電気泳動、染色等の確認操作が不要である。そこで今回、この装置で行えるリアルタイムPCR手法のなかで、従来法と同じプライマーを使用することができ、PCR検出条件の構築が比較的しやすいSYBR Green 法について基礎的検討を行った結果、検出および毒素型別において有効性を示す結果が得られたので報告する。

方 法

1 供試菌株

1998年から2001年までに広島市において分離された患者由来の腸管出血性大腸菌23株(STX1産生株5株、STX2産生株7株、STX1,2産生株11株)を用いた。

2 PCR法

菌株を蒸留水に懸濁し、10分間煮沸後鋳型DNAとした。Faststart DNA Master SYBR Green (Roche製)およびSTX1,STX2共通のMKプライマーを用いてReaction Mixtureを調製した。装置はロシュ・ダイアグノスティクス(株)製のLight Cycler クイックシステム330を使用し、初期変性を95℃, 600sec, 1cycle行った後、変性を95℃, 15sec, アニールを51℃, 5sec, 伸長反応を72℃, 16secで35cycles行った。融解曲線は上昇開始温度を60℃, 15secとした。

3 至適MgCl₂濃度の設定

STX1, STX2およびSTX1,2産生株各1株を用い、MgCl₂濃度2mM, 3mM, 4mMおよび5mMの4系列について至適濃度を検討した。プライマー濃度は0.5μM, Mastermix SYBR濃度2.0μMとした。

結 果

1 至適MgCl₂濃度の設定

各系列でのMgCl₂濃度での融解温度を比較したところ、2mM MgCl₂に設定した系での融解分析曲線のピークが最もクリアであった。2mM MgCl₂における3株の蛍光強度ピークおよびTm値ピークはSTX1では82℃付近に、STX2では84℃付近に認められ、毒素型により異なった(データ示さず)。

2 STX1,STX2 遺伝子の検出

2mM MgCl₂におけるSTX1産生株、STX2産生株、STX1,2産生株計23株について目的遺伝子の増幅および融解曲線分析を行った結果を図1、および表1に示した。STX1産生株は1株(菌株No.22)を除いてTm値82℃付近(PCR産物1)にピークを示した。STX2産生株も1株(菌株No.23)を除いてTm値84℃付近(PCR産物2)にピークを示した。一方、STX1,2産生株では、全ての株でTm値81℃付近および84℃付近にピークを示した。

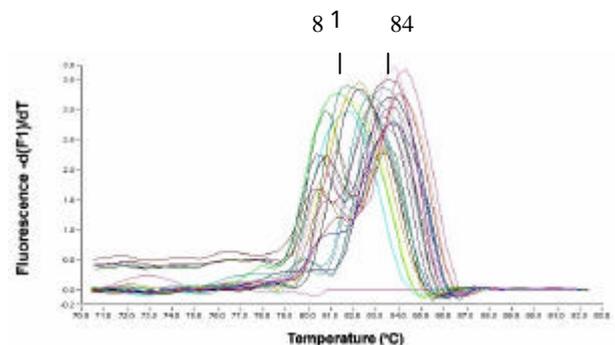


図1 STX 遺伝子の蛍光強度および Tm 値(23 株)

表1 供試腸管出血性大腸菌の融解温度 (Tm)分析結果

菌株No.	血清型	毒素型	PCR産物1の Tm値()	PCR産物2の Tm値()
1	O157:H7	1	82.1	
2	O157:H7	1	82.1	
3	O26:H-	1	81.9	
4	O26:H11	1	82.3	
5	O26:H11	1	81.6	
6	O157:H7	2		83.6
7	O157:H7	2		83.5
8	O157:H7	2		83.5
9	O157:H7	2		83.1
10	O157:H7	2		82.9
11	O157:H-	1,2	80.7	83.7
12	O157:H7	1,2	81.1	84.0
13	O157:H7	1,2	80.9	84.0
14	O157:H7	1,2	80.8	83.6
15	O157:H7	1,2	80.8	83.7
16	O157:H7	1,2	80.7	83.5
17	O157:H7	1,2	80.8	83.5
18	O157:H7	1,2	80.3	83.5
19	O157:H7	1,2	80.5	83.2
20	O26:H11	1,2	80.4	83.3
21	O111:H-	1,2	80.6	83.7
22	O111:Hut	1		84.2
23	Oout:H-	2	81.4	

今回設定したリアルタイム PCR 条件で、供試 23 株すべてにおいて約 1 時間で STX 遺伝子の増幅が認められた。また、従来我々が行ってきた PCR 法では、STX1、STX2 遺伝子の型別は別種類の PCR 法によるか、制限酵素切断による確認が必要であるが、今回の検討では 2 株(菌株 No. 22 および No. 23)を除く 21 株について、STX1、STX2 遺伝子の毒素型の区別を、増幅サイクル後自動的に行われる融解曲線分析(約 10 分)により、Tm 値ピークの違いとして確認することができた。今後、異性を示した 2 株の STX 遺伝子を解析して本法の精度を向上させれば、より迅速な STX 遺伝子検出・型別方法として活用が図れると考えられた。