

志賀毒素遺伝子 DNA のプラスミドへの導入とリアルタイム PCR 法の検討

下村 佳 古田 喜美 橋渡 佳子*¹ 山本美和子
毛利 好江*² 石村 勝之 佐々木敏之*¹ 萱島 隆之
河本 秀一 平崎 和孝*³ 松本 勝 荻野 武雄

腸管出血性大腸菌の検査において、Light Cycler(Roche)を用いたリアルタイム PCR 法による定性および定量検査を行うためには、志賀毒素遺伝子(stx)の標準 DNA が必要である。そこで、腸管出血性大腸菌の志賀毒素遺伝子の DNA 断片をプラスミドへ導入し、その組み換えプラスミドの抽出および精製を行い、stx1 および stx2 の 2 種類の標準 DNA を作製した。この標準 DNA を用いて、SYBR Green 法によるリアルタイム PCR 法の検討を行った。その結果、stx1、stx2 の 2 種類の標準 DNA とも増幅が確認できた。さらに、stx1、stx2 の T_m 値はそれぞれ 82.9、84.5 で両者に差が認められた。これらの結果から、本法は短時間で検出と同時に毒素型の型別を行える可能性が示唆された。

一方、生菌における検出限界を測定した結果、検体中に約 1,000 個の生菌が存在しなければ増幅が確認できなかった。このことから、SYBR Green 法は食品など少数の菌しか含まれていない検体の定量を行うには感度が低いと考えられ、その向上方法をさらに検討する必要がある。

キーワード： 腸管出血性大腸菌，志賀毒素(STX)，プラスミド，Light Cycler，T_m 値

はじめに

腸管出血性大腸菌(EHEC, Enterohemorrhagic Escherichia coli)は志賀毒素(STX)を産生し、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群(HUS)を引き起こす。1996 年には大阪府堺市で小学校給食が O157:H7 に汚染したために、10,000 人を超える患者が発生した^{1,2)}。その後も、全国で毎年約 1500 例の患者が報告されている。

STXはタンパク毒素で大別してSTX1、STX2の2種類があり、STX1、STX2の両方あるいは単独で産生する。腸管出血性大腸菌の同定ではこのSTX産生性を確認することが必須である。

現在、当所では腸管出血性大腸菌の検査において、PCR法を用いて菌の検出や毒素型の判定を行っている。現在は判定に4時間程度を必要とするが、Light Cycler (Roche)を使用したリアルタイムPCR法による検査法では、1時間のPCR反応で目的遺伝子を検出することが期待できることから、その検査法の検討を行った。また、この方法を用いると、定量PCRや増幅した遺伝子DNAの融解温度(T_m 値)分析による確認法も行えることから、

分子量による測定とは異なった確認法が用いられる。これにより、従来法で必要な電気泳動によるDNA確認作業が不要となる。

また、毒素型STX1、STX2の配列の違いによって、それぞれの増幅DNAのT_m値に差が認められれば、同時に毒素型の判定も行えると期待される。

そこで、今回、腸管出血性大腸菌の志賀毒素遺伝子(stx)を、定性および定量、あるいは型別に使用することを目的として、その増幅領域をプラスミドベクターに組み込み、このプラスミドを大腸菌に導入した後、標準DNAを作製した。また、この標準DNAを用いて、腸管出血性大腸菌のリアルタイムPCR法の増幅条件、stx1およびstx2のT_m値の測定および、プラスミドDNAと生菌煮沸液におけるLight Cyclerによる検出限界について検討したので報告する。

方 法

1 材料

(1) 供試菌株

堺市でのO157集団発生事例由来株(堺株)を使用した。

(2) 使用機器

PCR機としてGene Amp PCR System 2400-R (PERKIN ELMER)を、リアルタイムPCRにはLight

*1：現 社会局保健部食品保健課

*2：現 広島市舟入病院検査科

*3：現 経済局中央卸売市場食肉市場

Cycler (Roche)を使用した。

(3) プライマー

stx1 ,stx2 の共通部分を利用したプライマーである MK プライマー³⁾を使用した。

2 標準 DNA の作製

(1) PCR による stx1 および stx2 の DNA テンプレートの増幅

堺株から煮沸法により DNA を抽出した。この DNA を ,通常の検査と同じ表 1 ,2 に示す条件下で増幅した。その産物について ,その中の stx1 とstx2 を分離することのできる SSCP(single-strand conformation polymorphism)法⁴⁾⁻⁵⁾を用いて ,stx1 および stx2 それぞれの DNA テンプレートを作製した。その後 ,それぞれの DNA テンプレートを PCR により増幅した。増幅の確認は ,PCR 増幅産物を 2%アガロースゲル上でエチジウムブロマイド加の 0.5×TBE を泳動バッファーとして電気泳動した後 ,紫外線照射下で行った。

(2) プラスミドベクターへのライゲーション

pGEM-T vector System I (Promega)を用い ,目的の PCR 産物を表 3 の組成により ,16 で 1 中夜反応させ ,pGEM-T vector に組み込んだ。確認は ,ベクターと PCR 産物を最初に混合し ,それを 1 μ l 保存しておき ,増幅確認と同様に ,電気泳動により行った。

(3) 大腸菌への導入

JM109 Z-competent cell (フナコシ) 100 μ l にベクター組み込み後の DNA 4 μ l を加え ,氷上で 1 時間ほど静置し ,取り込ませた。その後 ,大腸菌液を SOC medium 1ml 中で 37 ,1 時間振盪培養

表 1 stx の増幅反応液の調製

試薬	容量(μl)/検体
Reaction mix	25
DW	10
10× Gene Taq Buffer (Wako)	5
Gene Taq polymerase (Wako)	0.4

Reaction mix には dNTP ,MK プライマー*を含む。

*MK-1(forward):TTTACGATAGACTTCTCGAC

MK-2(reverse):CACATATAAATTATTTTCGCTC

表 2 stx 増幅 PCR 条件

温度()	反応時間(分)	サイクル数
94	2:00	1
94	0:30	} 25
48	1:00	
72	1:30	
72	5:00	1

表 3 ライゲーション反応液の調製

試薬	容量(μl)/検体
2× Rapid Ligation Buffer	10
pGEM-T vector	1
PCR 産物	10
T4 DNA Ligase	1

した。大腸菌へのプラスミド取り込みの確認のため ,培養後の菌液 100 μ l に IPTG (Promega) 5 μ l と X-gal (フナコシ) 10 μ l を加え ,その菌液を平板 1 枚につき 0.8mg のアンピシリンを加えた LB 寒天培地 (ダイゴ)上で ,37 で 1 日培養し ,目的の DNA の挿入が期待される白色コロニーを釣菌した。次に ,そのコロニーを溶菌させて ,DNA テンプレートを作製した。

(4) インサートチェック

作製した DNA テンプレートのうち ,ベクター内に目的の遺伝子が組み込まれたものだけを取り出すため ,ベクター部分の配列を持つ pUC/M13 primer (Promega)を用いて ,PCR により増幅確認を行った。なお ,反応は表 4 ,5 の条件で行った。

(5) 大腸菌数の計測とプラスミド精製

目的の遺伝子が組み込まれていた大腸菌のコロニーを ,アンピシリンを加えた液体 LB 培地(ダイゴ) 2ml 中で ,37 で 1 日振盪培養した。その増菌液 1ml を標準寒天(メルク)平板上で 37 で 1 日培養し ,コロニー数を計測した。

表 4 インサートの増幅反応液の調製

試薬	容量(μl)/検体
DNA テンプレート	1
DW	6.35
10× Gene Taq Buffer (Wako)	1
dNTP (Wako)	0.8
M13 primer (Promega)	0.4
M13 rev primer (Promega)	0.4
Gene Taq polymerase (Wako)	0.05
M13 primer:CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	
M13 rev primer:TCACACAGGAAACAGCTATGAC	

表 5 インサートチェック PCR 条件

温度()	反応時間(分)	サイクル数
94	2:00	1
94	0:30	} 25
60	0:42	
72	1:30	
72	5:00	1

表 6 標準 DNA のリアルタイム PCR 法による増幅

温度()	反応時間(秒)	蛍光測定モード	サイクル数
95	15	None	} 30
51	5	None	
72	16	Single	

一方,同時に,その増菌培養液から Invisorb Spin Plasmid Mini Kit (Invitex)を用いて組み換えプラスミドの抽出,精製を行った。

まず,培養液 1.5ml を 12,000rpm で 1 分間遠心し,上清を除き,200 μl の Solution を加え,再懸濁させる。次に,250 μl の Solution を加え,5 回転倒混和することにより,溶菌させた。さらに,250 μl の Solution を加えて,5 回転倒混和し,中和し,12,000rpm で 3 分間遠心する。スピncラムに上清を移し,12,000rpm,1 分間遠心すると,カラム上にプラスミドが吸着する。

次に,カラムに 750 μl の Wash Buffer PL を加え,12,000rpm で 1 分間の遠心を 2 回行い,Wash Buffer を完全に除去する。最後に,スピncラムのチューブを新しいチューブに変えて,50 μl の Elution Buffer を加え,12,000rpm で 1 分間遠心することにより,目的の DNA が組み込まれたプラスミドを回収した。

(6) 標準 DNA 液の作製とその増幅確認

コロニー数の計測により,プラスミド抽出液 1ml に含まれるプラスミドのコピー数を求め,コピー数がそれぞれ $10^7 \sim 10^1 / 2 \mu\text{l}$ になるように 10 倍段階希釈し,それぞれの希釈倍率の標準 DNA 液を作製した。得られた標準 DNA 液希釈列をテンプレートとして,LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green (Roche),Light Cycler を用いてリアルタイム PCR を行い,それぞれの標準 DNA の増幅の確認およびその T_m 値の測定を行った。条件を表 6 に示した。反応液の調製は Mg^{2+} 濃度を 4mM で調製し,テンプレートを 2 μl,全量を 17 μl とするにした。

3 腸管出血性大腸菌生菌の検出限界

実際の検査において志賀毒素遺伝子 DNA が検体 2 μl 中に何個以上含まれていれば,LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green を用いて増幅が検出できるかを確かめるため,腸管出血性大腸菌菌液を希釈して,それぞれの希釈段階で 2 μl ずつを標準寒天平板上で培養し,それぞれに生えたコロニー数を求めて,Light Cycler によりそれ

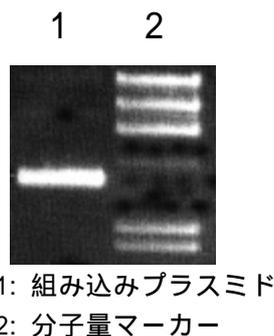


図 1 抽出プラスミドの確認

ぞれの希釈段階の DNA の増幅を検討した。

結 果

1 プラスミドへの組み込みとその抽出

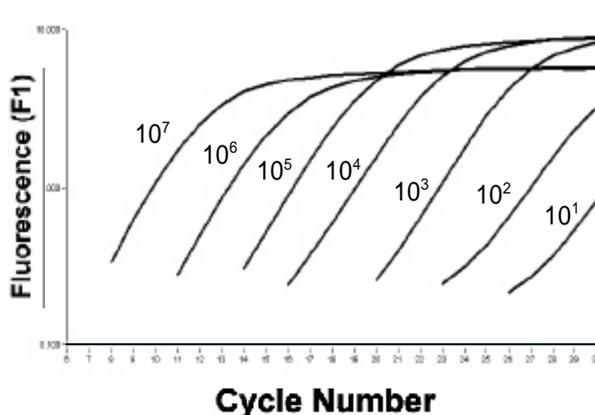
方法に示した各段階での PCR 増幅の電気泳動による確認により,それぞれ増幅が確認できた。ライゲーション反応は,反応前と反応後の泳動バンドの位置のずれにより確認した。

プラスミド抽出の確認は,得られた抽出液を電気泳動により確認した(図 1)。

このプラスミド抽出液 2 μl あたりのコピー数は, stx1 が 3.42×10^7 コピー, stx2 が 2.52×10^7 コピーであった。

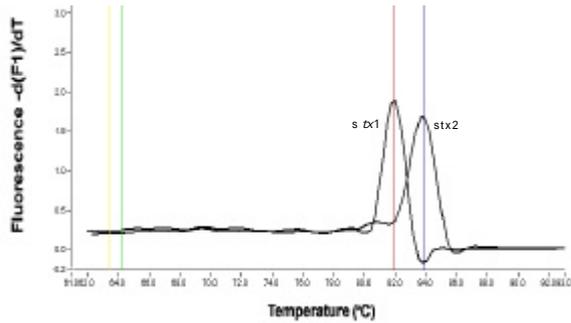
2 標準 DNA 液の作製とリアルタイム PCR

得られたプラスミド抽出液を用いて,2 μl 中に $10^7 \sim 10^1$ 個のコピーが含まれるよう段階希釈を行い,標準 DNA を作製した。作製した標準 DNA 液のリアルタイム PCR の結果, 10^7 から 10^1 までの全て



図中の数値: 2 μl あたりの DNA コピー数

図 2 標準 DNA のリアルタイム PCR 法による増幅



Tm 値: stx1...81.9 ,stx2...83.8

図3 stx1 ,stx2 組みかえプラスミドの Tm 値分析

の希釈段階において標準 DNA が正確に希釈され、かつ増幅していることが確認された(図2)。その Tm 値は、stx1 が 81.9 ,stx2 が 83.8 となり、両者の間に差が認められた(図3)。

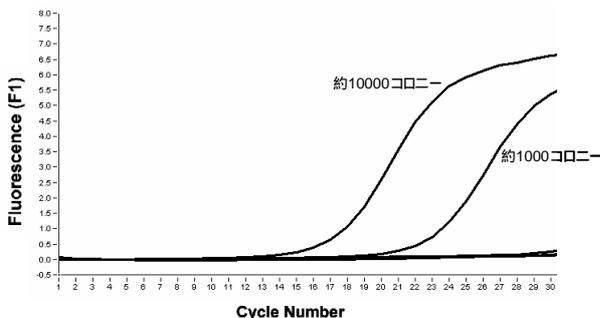
3 腸管出血性大腸菌生菌の検出限界

希釈したそれぞれの菌液の DNA は、2μl 中に約 1,000 コロニー含まれているものまでの増幅が確認できたが、それ以上希釈した DNA 液からは、増幅を確認することはできなかった(図4)。

考 察

腸管出血性大腸菌の検査の際、リアルタイム PCR 法による検査を行うためには、志賀毒素遺伝子(stx)の標準 DNA が必要であるが、当所には標準 DNA がなく、食中毒発生時にリアルタイム PCR を行うことができなかった。一方、標準 DNA を作製するためには、目的の DNA 断片をプラスミドに組み込まなければならない。

そこで、stx の DNA をプラスミドに導入し、その組み換えプラスミドの抽出および精製を行い、目的の DNA 断片のプラスミドへの導入法が確立



図中の数値: 2μl あたりのコロニー数

図4 腸管出血性大腸菌生菌の検出限界

できた。また、プラスミド抽出液から stx1 ,stx2 の各希釈段階のコピー数が含まれている標準 DNA を作製したことにより、これを陽性コントロールとしてリアルタイム PCR 法を利用した検査を行えると考えられた。

一方、Light Cycler を用いて、stx1 ,stx2 の Tm 値を測定し、それぞれの Tm 値に有意な差が認められた。この Tm 値の差は、DNA 増幅部分の塩基配列の GC 含量が stx1 と stx2 で異なることから生じたものである。

以上より、実際の検査において、陽性の判定時間の短縮だけでなく、毒素型の判定も同時に行えることが分かった。したがって、この方法は定性検査を行う上で有効な方法となると考えられる。

次に、作製した標準 DNA 液を用いた増幅確認により、検体中に約 10 個というわずかな数のプラスミド DNA でも含まれていれば、その増幅が検出できることがわかった。しかし、腸管出血性大腸菌の生菌を使用した検出限界の測定では、2μl 中に約 1,000 個というかなりの菌数が検体中に含まれていなければ、増幅が検出できないことが判明した。この原因としては、プラスミド DNA は精製度が高いために検体中にわずかな数の DNA しか含まれていなくても、増幅が検出できるのに対し、生菌中の DNA は煮沸法により DNA を溶菌、抽出しているため、DNA 精製度が低く、検出ににくいと考えられる。

このことから、以上の方法では、食品など、検体中に少数の菌しか含まれていないと思われる検体の定量検査に応用するのは難しいと考えられることから、DNA 抽出方法やプローブ法などの他の方法により感度を上げることが必要となると考えられた。

文 献

- 1) Yokoyama K et al: Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak, Gene, 258, 127 ~ 139(2000)
- 2) Makino K et al: Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 derived from the Sakai outbreak, Genes Genet. Syst, 74, 227 ~ 239(1999)
- 3) Karch H et al: Single primer pair for amplifying

- segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction, J Clin Microbiol 27, 2751 ~ 2757(1989)
- 4) Orita M et al: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction, Genomics, 5, 874 ~ 879(1989)
 - 5) Hayashi K et al: PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detections of mutations in the genomic DNA, PCR Methods Appl, 1, 34 ~ 38(1991)
 - 6) 山本美和子 他: 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, 広島市衛研年報, 22, 109 ~ 110(2003)
 - 7) 須摩春樹: 細胞工学別冊 目で見える実験ノートシリーズ バイオ実験イラストレイテッド 本当にふえる PCR, 秀潤社(1996)
 - 8) 竹田美文 他: 臨床と微生物 第23巻臨時増刊号 病原性大腸菌 O157, 近代出版(1996)
 - 9) 伊豫田淳 他: 志賀毒素産生性大腸菌食中毒, 臨床検査, vol47, 459 ~ 465, 医学書院(2003)