

リアルタイム PCR および SSCP 法を用いた志賀毒素 STX1 ,STX2 の毒素型別・遺伝子型別に関する研究

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

腸管出血性大腸菌感染事例から分離された志賀毒素(STX)産生菌 28 株の stx 遺伝子について Light Cycler™(Roche)を用いたリアルタイム PCR の Tm 値解析と SSCP 電気泳動解析による遺伝子型別の検討を行った。MK プライマーを用いて PCR 増幅した stx1 および stx2 の共通領域の Tm 値解析の結果 ,STX1 産生株は 82.0 付近に 1 峰性のピークを示し ,STX2 産生株は ,STX2e 産生の OUT:H-株の 81.0 を除き 83.5 付近に 1 峰性のピークを示した。一方 ,STX1 および STX2 産生株は ,2 峰性のピークを確認できた。リアルタイム PCR 増幅産物を用いた SSCP 電気泳動解析の結果 ,STX1 および STX2 産生株の間に泳動像の明瞭な差が認められ ,STX2 産生株には 4 種類の像がみられた。泳動バンドの遺伝子配列を調べた結果 ,stx1 の配列は 1 種類のみ ,stx2 は 4 種類の遺伝子配列が確認され ,SSCP 電気泳動パターンの違いは塩基配列の違いと一致した。塩基配列の異なった 5 種類の stx 断片を組み込んだプラスミドを作製し ,リアルタイム PCR の Tm 値の比較を行った結果 ,DNA の GC 含量が高い順に Tm 値も高値を示した。MK プライマーを使用したリアルタイム PCR-Tm 値解析は ,STX 産生性株における stx1 および stx2 遺伝子の毒素型別において ,SSCP 法は遺伝子型別において有用な検査法と考えられた。

キーワード： 志賀毒素(STX)産生大腸菌 , リアルタイム PCR , Tm 値 , SSCP 電気泳動法 , GC 含量

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)検出とイミュノクロマトグラフィーキットを使用した STX 毒素検出を多用してきた。STX には大別して STX1 , STX2 の 2 種類の毒素があり , その遺伝子 stx1 , stx2 の配列は , stx2 においては , stx2c , stx2d , stx2e , stx2f に分類され¹⁾⁻⁵⁾ , 部分的配列の異なったバリエーションが存在していることが知られている。当衛生研究所の山本らは , Light Cycler™ (Roche) を用いた迅速検出と stx1 および stx2 遺伝子型別の検討を行い , リアルタイム PCR 法の有用性を示唆した⁶⁾。そこで , 今回の研究では , リアルタイム PCR 法による

Tm 値解析および Single Strand Conformation Polymorphisms(SSCP)法の stx 解析の有用性を , 臨床分離株から得られた PCR 産物およびそれらを導入したプラスミドの塩基配列の解析を行い , 検討した。その結果 , これらの方法論の有効性を示す結果が得られたので報告する。

方 法

1 使用機器

リアルタイム PCR には Light Cycler™(Roche)を , SSCP 電気泳動法には , Gene Amp PCR System 2400 -R(Perkin Elmer)と電気泳動装置 SEA-2000(Elechem)を , 塩基配列解析には ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer(Perkin Elmer)を用いた。

2 材料

(1) 供試菌株

他都市より分与された 10 株および当衛生研究所で分離された 18 株計 28 株の腸管出血性大腸菌 (STX1 産生 2 株 , STX2c , STX2e 産生の 4 株を含

*1：現 社会局保健部食品保健課

*2：現 市立舟入病院検査科

*3：現 経済局中央卸売市場食肉市場

んだ STX2 産生株 9 株, STX1, 2 産生株 17 株)を用いた。なお, 血清型は, O157: 19 株, O26: 3 株, O111: 2 株, OUT: 4 株である。

(2) プライマー

今回使用したプライマーは通常検査に使用している STX1 および STX2 遺伝子の共通領域を増幅させる MK プライマー⁷⁾(MK-1:TTTACGATAGACTTCTCGAC, MK-2:CACATATAAATTATTTTCGCTC)を用いた。

3 リアルタイム PCR 法

供試菌を蒸留水にけん濁液させ, 10 分間煮沸し, 鋳型 DNA テンプレートとした。Light Cycler Fast SYBR Green I KIT(Roche)と MK プライマーを用いて, MgCl₂ 濃度を 4mM に設定し, 1 検体あたりの反応液を, 精製水 10.2 μl, MgCl₂ 2.4 μl, MK-1 プライマー 0.1 μl, MK-2 プライマー 0.1 μl, Light Cycler Fast SYBR Green I Mix 2.0 μl およびテンプレート 2.0 μl として調製した。

反応条件は, 初期変性を 95 °C, 10 分, 1 サイクル行った後, 変性 95 °C, 15 秒, アニーリング 51 °C, 5 秒, 伸張反応 72 °C, 16 秒とし, この 3 ステップを 35 サイクル行った。蛍光の測定は伸張反応後に行った。融解曲線は上昇開始温度を 60 °C から 15 °C ごとに 1 °C 上昇するように設定した。PCR 反応にかける際には必ず, 対照として, O157:H7 株^{8), 9)}の stx1 および stx2 遺伝子断片を組み込んだプラスミドを同時に反応させた。

4 SSCP 電気泳動解析^{10), 11)}

リアルタイム PCR で増幅した遺伝子産物を使用し, 990 μl の変性緩衝液(0.25% bromophenol blue 加 formamide に使用直前に 1M の NaOH を 10 μl 加えたもの)をチューブに 10 μl 入れ, さらに等量の PCR 産物を加え, よく混合した。混合液を Gene Amp PCR System 2400-R で 95 °C 5 分間加熱後, 氷上で急冷させ 10 分以上そのまま放置させた。その後, 50% glycerol を 5 μl 加えて混合した後, 0.75 × TAE で 9 × 10⁶ に設定した電気泳動槽を使用し, ポリアクリルアミドゲル(150-300bp 用, エムエス テクノシステムズ)で泳動した。電圧 60V(5V/cm)に設定し約 15 時間電気泳動させた。DNA 染色液は 10 μl の SYBR Gold を 100ml の 0.75 × TAE に加え 1 万倍希釈となるように調整したのを用いた。ゲルを染色液に浸し, 37 °C の暗所にて 40 分間染色した。染色後, SYBR フィルターを使用し, 254nm の波長下で写真を撮影した。

5 シークエンスによる遺伝子配列解析

SSCP 解析で得られた DNA バンドをゲルから切り出し, DNA 抽出を行った。抽出した DNA は, MK プライマーを用いて stx の増幅条件で PCR 増幅した。それを BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応し, Auto SeqTM G-50 (Amersham Biosciences) で DNA 精製を行った後, PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) により塩基配列の解析を行った。

6 5 種類の STX 遺伝子を組み込んだプラスミドの調製

(1) 増幅産物のプラスミドへの組み込み

シーケンス解析で得られた異なった配列の stx1, stx2 の増幅産物をプラスミドベクターである pGEM-T vector System I (promega)に 16 °C, 24 時間反応させ, stx 増幅 DNA を組み込んだ。

(2) 大腸菌への導入

JM109 Z-competent cell (フナコシ)100 μl に stx 増幅 DNA を組み込んだプラスミド 4 μl を加え, 氷上で 1 時間静置した。その後, SOC medium 1 ml を加えて, 37 °C 1 時間振盪培養した。培養後の菌液 100 μl に IPTG (Promega) 5 μl と X-gal (フナコシ) 10 μl を加え, LB 寒天培地(ダイゴ) 100 ml に 20mg/ml アンピシリン溶液を 200 μl 加えて作製した平板に菌液を広げ, 37 °C 24 時間培養し, 生えてきた白色コロニーを釣菌し, 内部プライマーチェックで確認後, プラスミドの抽出を行った。

(3) リアルタイム PCR 反応による Tm 値の測定

抽出したプラスミド(stx1, stx2(4 種)) の 5 検体をリアルタイム PCR 反応にかけ, Tm 値の測定を行った。

結 果

1 リアルタイム PCR の stx1 および stx2 の Tm 値の測定結果

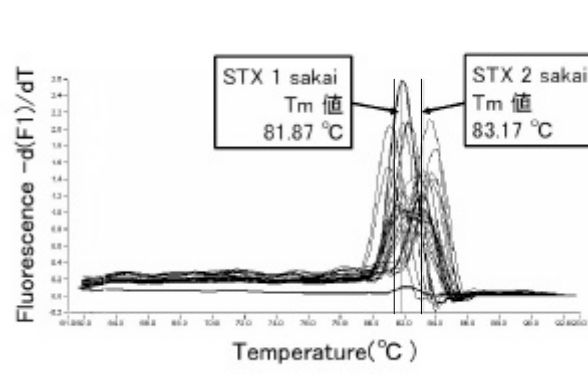


図 1 リアルタイム PCR による志賀毒素型別結果

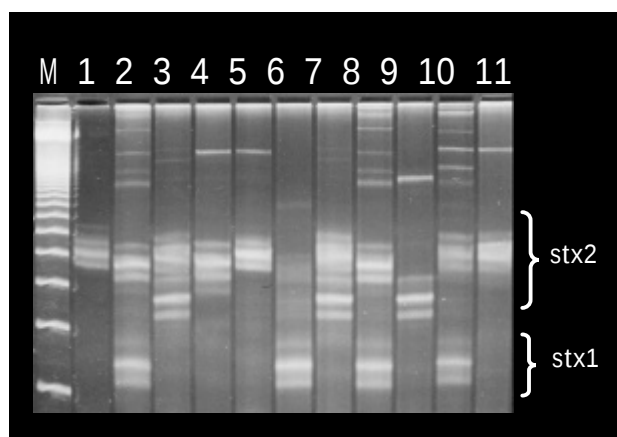
T_m 値解析で得られた融解曲線を図 1 に示した。T_m 値は, stx1 および stx2 で異なっており, stx1 は, 平均 82.0 で 1 峰性のピークを示し, stx2 は, OUT:H-株を除くと平均 83.5 で 1 峰性のピークを示した。また, stx1 および stx2 両毒素産生株においては, それぞれの陽性コントロールの温度付近に 2 峰性のピークを示した。

また, 分与された stx2e 株と OUT:H-株は, STX2 産生性を示すものの, その T_m 値は 81.1 と他の stx2 産生株よりも低い温度となっていた。

2 PCR 産物の SSCP 解析

PCR 増幅産物の遺伝子多型分析を行うために SSCP 電気泳動を行った(図 2)。STX1 単独産生株(図 2, レーン 6)は見かけ上約 100~200bp 付近に, STX2 単独産生株(図 2, レーン 1, 3, 4, 5, 7, 9, 11)は約 200~600bp 付近にバンドがみられた。一方, STX1, STX2 産生株(図 2, レーン 2, 8, 10)は, STX1 単独産生株のバンドの位置および約 300~500bp 付近にバンドがみられた。すなわち, STX1 産生株はすべて約 100~200bp 付近の同一位置にバンドがみられ, STX2 産生株はそれより高分子量側にバンドがみられたことから, 約 100~200bp 付近のバンドが stx1 増幅産物であり, それより高分子量側の約 200~600bp の位置にみられたバンドが stx2 増幅産物であると考えられた(後述の塩基配列解析により確定)。

stx2 増幅産物についてみると, 泳動パターンは



STX2 産生株 : 1, 3, 4, 5, 7, 9, 11
STX1, 2 産生株 : 2, 8, 10
STX1 産生株 : 6
M: 100bp ラダー

図 2 増幅 stx1, 2 の SSCP 電気泳動パターン

約 300~450bp (図 2, レーン 2, 4, 8), 約 250bp 前後(図 2, レーン 3, 7, 9), 約 300~500bp(図 2, レーン 3, 7, 10, 11), 約 350~550bp (図 2, レーン 1, 5) の異なる位置にバンドがみられ, 4 種類に分類された。また, 図 2 のレーン 3 とレーン 7 に示す株は, レーン 9 の株のバンドとレーン 11 の株のバンドの両方のバンドがみられた。

以上より, stx1 増幅産物は 1 種類, stx2 増幅産物は 4 種類の SSCP 泳動パターンに分類され, STX2 産生株の中には, 2 種類の異なる stx2 増幅産物の SSCP パターンを持つ株が認められた。

3 SSCP 泳動バンドのシーケンス解析結果

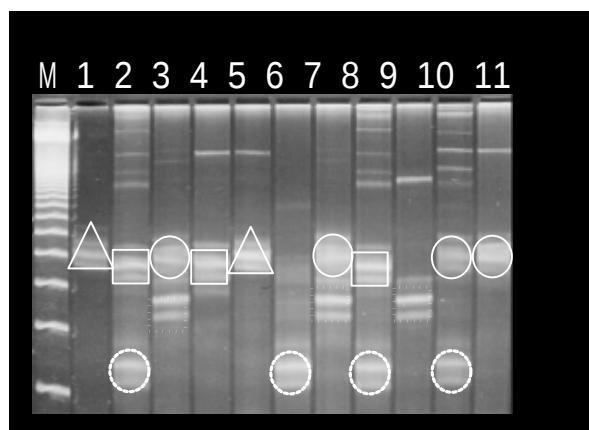
SSCP 解析によって得られた泳動パターンの違いが増幅産物の塩基配列の違いを反映しているかを確かめるために, 各バンドから DNA を抽出し, 塩基配列を決定した(図 3)。STX1 産生株の約 100~200bp のバンドの塩基配列は, すべて堺株 stx1 の配列と一致した。

STX2 産生株では, 図 4 の 2-1 のバンドは堺株 STX2 と同じ塩基配列, 2-2 のバンドは堺株と 1 塩基異なる配列, 2-3 のバンドは 2 塩基異なる配列, 2-4 のバンドは 20 塩基異なる配列を示した。すなわち, 異なる泳動パターンから得られたバンドの塩基配列は異なり, 同じ泳動パターンから得られたバンドの塩基配列は同じであった。また, 2 種類の泳動パターンを持つ株(図 4, レーン 3, 7)からはそれぞれの泳動パターンに対応する 2 種類の異なる塩基配列が得られた。以上の結果から, SSCP 電気泳動パターンによる分類と塩基配列の違いは完全に一致した。

得られた塩基配列をすでに報告されている stx 遺伝子の配列と比較した結果, 増幅遺伝子領域において, 堺株と 2 塩基異なる配列は stx2c の配列

堺株 Stx 2	ccacaaagttatgtctcttctgtaaatagtagtatacggacagagatatoga
Stx 2-df 1	a.....
Stx 2-df 2	a.....
Stx 2-df 20	a.....
堺株 Stx 1	tgc.a.g.cg.....aga.....c.g...gtc...ct.t.ca...ggt.
堺株 Stx 2	ccctcttgaacatatatctcagggaacacatcggtgtgtgttattaa
Stx 2-df 1	ag.t.....a.c.....t
Stx 2-df 2	ag.t.....a.c.....t
Stx 2-df 20	ag.t.....a.c.....t
堺株 Stx 1	t..at.ac.gac...t..atca...aggt..g...tt.actga.g...g.t
堺株 Stx 2	ccacccacacggggcagttattttgtgtgtgatacaggggttgatgt
Stx 2-df 1	
Stx 2-df 2	t.c.a...a...a...c...a...g...t
Stx 2-df 20	t.c.a...a...a...c...a...g...t
堺株 Stx 1	agtgg.a.gg..at.a.tg...a..t..g.ca...a.a...cc
堺株 Stx 2	ctatcagggggttttgacatctctgtgtgattatt
Stx 2-df 1	
Stx 2-df 2	
Stx 2-df 20	
堺株 Stx 1	ag.gg.a.g...g...a.ca...a...g...t...g...

図 3 SSCP 泳動バンドの塩基配列解析結果



- (2-1): 堺株 stx2 と同一配列
- ◻ (2-2): 堺株 stx2 と 1 塩基異なる配列
- (2-3): 堺株 stx2 と 2 塩基異なる配列
- △ (2-4): 堺株 stx2 と 20 塩基異なる配列
- (1): 堺株 stx1 と同一配列

図4 SSCP 泳動パターンと塩基配列の関連

と 20 塩基異なる配列は stx2e の配列と一致した。
4 5 種類の STX 遺伝子を組み込んだプラスミドのリアルタイム PCR

遺伝子配列解析で得られた配列の異なる 5 遺伝子産物を組み込んだプラスミドのリアルタイム PCR の結果を図 5 に示した。堺株 stx1 配列遺伝子組み込みプラスミドの Tm 値は、81.9 であつたのに対し、堺株 stx2 は 83.8、堺株 stx2 と 1 塩基異なるものは 83.9、堺株 stx2 と 2 塩基異なるものは 84.2 となった。一方、stx2 堺株と 20 塩基異なるものは、他の stx2 より低い 81.0 であつた。これらの結果は、プラスミドに組み込んだ DNA を持つ親株から直接 DNA を抽出し、PCR 増幅-Tm 値解析を行った結果と、ほぼ一致した。

5 供試腸管出血性大腸菌分離株の血清群、毒素型、SSCP 泳動型、および stx 増幅部位の塩基配列

供試した腸管出血性大腸菌 28 株の血清型、リアルタイム PCR-Tm 値解析による毒素型別、SSCP 遺伝子型、および stx 増幅部位の塩基配列の解析結果を表 1 に示した。供試 O157 分離株 17 株のうち、12 株(70.6%)は STX1, STX2 産生性、stx2 の SSCP 遺伝子型は 2-1 増幅部位の塩基配列は stx1、stx2 と同堺株と同じ配列であつた。

考 察

腸管出血性大腸菌 stx 遺伝子のリアルタイム PCR 法において、MK プライマーを使用した場合、

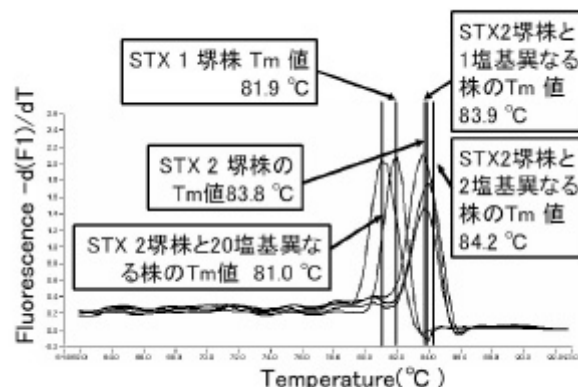


図5 stx 遺伝子導入プラスミドの Tm 値の比較

山本ら⁶⁾が行つた結果と同様に、stx1 および stx2 の Tm 値の異なるピークを再確認することができた。その Tm 値は、stx1 は、平均 82.0 であつたが、stx2 は、Tm 値が 81.0 の OUT:H-の株を除くと、平均 83.5 となつた。一方、堺株の stx をプラスミドに組み込み、作製した stx1 プラスミドは 81.9 であつたのに対し、stx2 プラスミドは 83.8 となり、供試菌株と同様の Tm 値を示した。このことから、この堺株の MK プライマー増幅遺伝子領域を組み込んだプラスミドは陽性コントロールとして使用できると考えられた。しかし、OUT:H-株に関しては、stx2 の示す Tm 値と比較して、2.4 低い温度を示し、stx1 に近いため、Tm 値判定のみでは、stx1 との区別において判定を誤る可能性があると考えられた。従つて、stx2 産生株の中には、このように Tm 値が stx1 に近い温度を示すバリエーションが存在する点は、Light Cycler を使用したリアルタイム PCR で判定する場合、注意しなければならないと考えられる。しかし、このような場合は、分離株の血清型や免疫クロマトグラフィーなどの毒素タンパク検出を

表1. 供試菌株の stx1, stx2 毒素型別と遺伝子型別

血清群 (株数)	リアルタイムPCR 毒素型別	SSCP 泳動型	塩基配列							
			堺株	堺株	堺株	1bp	堺株	2bp	堺株	Out
O26(2)	1	1	○							
O26(1)	1,2	1 2-1	○	○						
O111(2)	1,2	1 2-1	○	○						
O157(12)	1,2	1 2-1	○	○						
O157(1)	1,2	1 2-3	○						○	
O157(1)	2	2-2					○			
O157(1)	2	2-1 2-2			○		○			
O157(2)	2	2-2 2-3					○	○		
Out(2)	2(Out)	2-4								○
STX2c産生O157(1)		1 2-3	○						○	
STX2c産生O157(1)		2-3							○	
STX2c産生Out(2)		2-4								○

併用することで、STX2 産生性を確認できると考えられる。この STX2e 産生株に関しては、豚の浮腫病における大腸菌感染症などから多く検出され、ヒトからの検出は稀なことが報告されている⁴⁾。

SSCP 電気泳動解析では、STX1 産生株、STX2 産生株、STX1 および STX2 産生株間において、STX1 産生株の泳動像は、低分子側に位置しているのに対し、STX2 産生株は STX1 差産生株より高分子側に位置し、STX1 および STX2 産生株間において明瞭な泳動像の差が認められた。また泳動バンドの位置の違いが、増幅遺伝子の部分的配列の違いと一致することを遺伝子配列解析により確認することができた。

今回使用した菌株は、stx1 においては、増幅 DNA の塩基配列が 1 種類しか存在していなかったが、stx2 では 4 種類の異なる配列が認められた(表 1)。O157、O111、O26 は、堺株と比較して、同じ配列の株が主流であったが、O157 には、1 塩基異なる配列を保有する株および 2 塩基異なる配列を保有する株も認められた。一方、OUT:H- の株は、堺株と比較して 20 塩基異なる遺伝子配列を持つものであることが判明した。MK プライマーで増幅させる領域は、stx 遺伝子 A サブユニット領域(全 879bp)のうちの 5' 側の一部の領域(227bp)であり、全体の塩基配列を比較してはいないので、バリエーションを明確に確認することはできない。しかし、今回の解析から、2 塩基配列の異なるものが、増幅 DNA 領域において stx2c と同じ配列であり、20 塩基配列が異なるものは、増幅 DNA 領域において stx2e の配列と同じであった。さらに、増幅塩基配列が堺株と全く同じ配列の株と、1 塩基配列の異なるものは、塩基配列では、stx2c とは完全に一致していないが、解析した塩基配列をアミノ酸レベルでみると、両方とも stx2c のアミノ酸配列と等しい配列を示した(データ示さず)。今回使用した菌株は、MK プライマーでの増幅領域でみた限り stx2c 群と stx2e の 2 種類に大別されるものと推測された。ヨーロッパでの疫学的研究では、ヒトから最も多く検出されるバリエーションは stx2c 株で、次いで MK プライマーで増幅可能な stx2d 株が検出されることが報告されており^{1), 2), 5)}、わが国でも stx2c が主流との報告がある。今回の検討株もこれらと同様な結果であった。また、stx2f は MK プライマーでは増幅されない⁵⁾が、主にヒトから分離されることから、ヒト由来株でこのバリエーションに遭遇する機会は低いと考えられる。

一方、菌体内に異なる 2 種類の stx2 遺伝子を保有するものがあり、堺株と同じ塩基配列と 1 塩基配列異なるものの組み合わせ、1 塩基配列異なるものと 2 塩基配列異なるものの組み合わせの 2 種類が存在した。このような 2 種類の stx2 遺伝子を保有する株は、融解曲線解析においてその T_m 値への影響が示唆されるが、実際の T_m 値ピークからは明確に判別することはできなかった。

SSCP の結果から得られた塩基配列をもとに、単一の stx 遺伝子産物を組み込んだプラスミドを作製するために、MK プライマーで増幅し、異なる増幅遺伝子断片を組み込んだプラスミドを作製し、それら 5 種類のプラスミドをリアルタイム PCR 反応で調べた。得られた T_m 値の結果を比較すると、stx1 と 4 種類の stx2 配列(堺株、1 塩基配列が異なる株、2 塩基配列が異なる株、20 塩基配列が異なる株)の T_m 値には違いが認められた。しかし、20 塩基配列が異なる stx2 以外は、堺株 stx2 が 83.8、1 塩基異なる株が 83.9、2 塩基異なる株が 84.2 であった。

T_m 値は目的増幅 DNA の GC 含量と関連し、GC 含量が低いほど、T_m 値も低くなる。今回の使用した DNA の塩基配列から、GC 含量の算出を行った結果、堺 stx2 は、42.3%と最も高く、次いで、堺 stx2 と 1 塩基配列の異なる配列が 41.9%、堺 stx2 と 2 塩基配列の異なる配列は 41.4%、堺 stx1 が 40.1%、そして堺 stx2 と 20 塩基配列が異なる株が 37.9%となっていた。これと、T_m 値を比較してみると、GC 含量 41.4~42.3%の DNA は 83.5 付近を示していた。Light Cycler の測定誤差は、1 未満とされているので、これらの差は、誤差の範囲内であり、この 3 種類を本器の T_m 値解析により区別することは難しいと考えられた。一方、GC 含量 40.1%の堺 stx1 は、それらと比較して、81.9 と 1 以上の温度差を示しており、異なる stx であると判定することが可能である。

今回の検討結果から、PCR 解析および SSCP 解析の有効性が示された。これらは、一連の作業工程を迅速簡便に実施することができ、本市における食中毒も含めた腸管出血性大腸菌感染症の菌同定および疫学的解析に寄与できると考えられた。

謝 辞

STX2c および STX2e 産生株を分与していただいた東京都健康安全研究センターの甲斐明美先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Schmitt CK et al : Two copies of shiga-like toxin -related genes common in enterohemorrhagic Escherichia coli strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511, Infect Immun, 59, 1065 ~ 1073(1991)
- 2) Pierard D et al : Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal Escherichia coli isolates, J Clin Microbiol, 36, 3317 ~ 3322(1998)
- 3) Adrienne W P et al : Comparative toxicity and virulence of Escherichia coli clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type operons, Infect Immun, 63, 2450 ~ 2458(1995)
- 4) Weinstein DL et al : Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type variant from an Escherichia coli strain responsible for edema disease of swine, J Bacteriol, 170, 4223 ~ 4230(1988)
- 5) Schmidt H et al : A new Shiga toxin variant (Stx2f) from Escherichia coli isolated from pigeons, Appl Environ Microbiol, 66, 1205 ~ 1208(2000)
- 6) 山本美和子 他 : リアルタイム PCR を用いた Shiga 毒素型別法の検討, 広島市衛研年報, 22, 109 ~ 110(2003)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) Orita M et al: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction, Genomics, 5, 874 ~ 879(1989)
- 11) 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)