

Application News

No. B51

マイクロチップ電気泳動法
Microchip Electrophoresis

大腸菌 O-157 タイピングシステム IS-printing System (TOYOBO) への適用

Application to IS-printing System (TOYOBO)

食品感染症の起因菌である腸管出血性大腸菌 O157 を対象とした分子疫学解析は、パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE 法) が最も一般的な方法として用いられてきました。しかしながら、PFGE 法は操作が煩雑な上、結果を得るまで 1 週間程度の時間を要するという課題があります。

この課題を解決するため、IS-printing System (IS 法) は PFGE 法より簡便な疫学解析法として開発されました^{*1)}。大腸菌のゲノム中に分布する Insertion Sequence (IS) に対しマルチプレックス PCR を実施し、アガロースゲル電気泳動でバンドパターンを分析し菌株を同定する方法です。

各 IS 領域に対する PCR 増幅産物の有無をコード化することにより、他株との判別が容易に実施できます。IS 法を利用することで解析に要する時間は大幅に短縮することが可能となりましたが、その一方で分析に手作業が介在する点は従来と同じであり、特に 3 % のアガロースゲルを安定的に作成するには技量と手間を要します。ここでは、アガロースゲル電気泳動を用いた IS 法よりも迅速且つ明瞭な結果が得られる自動電気泳動装置 MCE-202 MultiNA を利用した IS 法への適用をご紹介します。

(※ IS-printing System は東洋紡(株)から販売されています)
H. Kumagai Y. Sogabe

■ 分析方法

Experimental Procedure

MultiNA で IS 法を利用するには、以下の条件を満たす必要があります。

- ・全フラグメントのピークが分離できていること
- ・目視によるピークの誤判定を起こさないこと

これらの条件を満たすため、IS 法に適した MultiNA の分析方法を検討しました。分析の流れを Fig. 1 に示します。

この方法では、下記に示されるような標準分析方法とは異なった作業を実施する必要があります。

- ・マーカ溶液を市販品によってユーザー側で調製する。
- ・蛍光色素 (GelStar) の終濃度を通常の 5 倍濃度で使用する。
- ・サンプル調製キット付属のポジティブコントロールをユーザーラダーとして登録する。
- ・分析終了後、手動編集モードにてユーザーラダーの LM (低分子マーカ) および UM (高分子マーカ) を再設定する。

【MultiNA の IS 法専用マーカの調製】

IS 法マーカは以下の組成で調製します。

<バッファ>

5 × TBE (318-90041)
(ニッポンジーン社製)
終濃度：1x

< LM >

DNA Quantitation Standard, 100 bp Fragment (QS-100)
(Gensura Laboratories, Inc. 社製)
終濃度：2.25 ng/μL

< UM >

NoLimits 1200 bp DNA Fragment (SM1681)
(Fermentas (Thermo) 社製)
終濃度：0.75 ng/μL

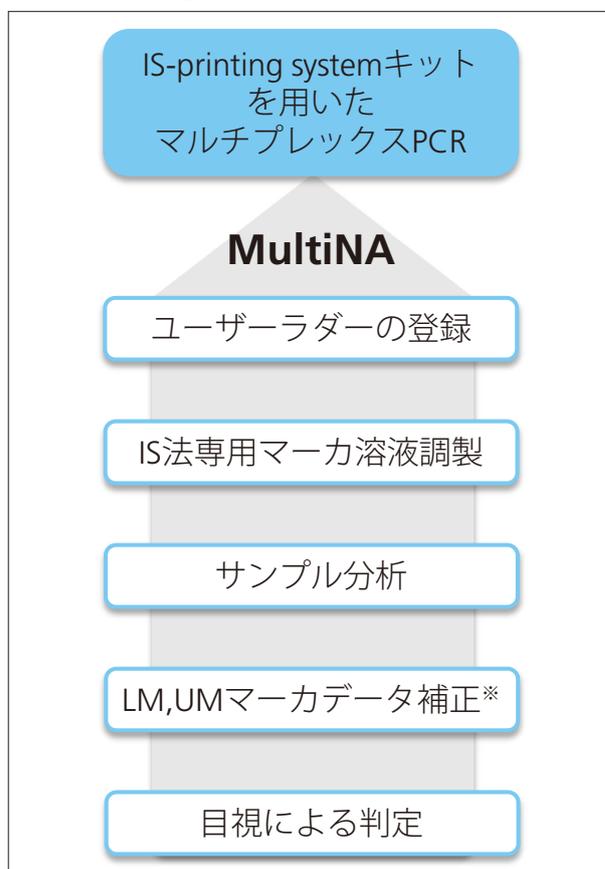


Fig. 1 IS 法分析の流れ
Experimental Procedure of IS Method

*分析に用いるマイクロチップの枚数分の補正が必要になります。

IS-printing System の 1st set で調製された同サンプルにおけるアガロースゲル電気泳動および MultiNA の分析結果を Fig. 2 (a) (b) に示します。MultiNA の分析結果は、アガロースゲル電気泳動とほぼ同じ結果が得られ、さらに MultiNA を利用した場合、次に示す利点が挙げられます。

- ①全自動で電気泳動を実施できるため、実作業時間を 10 ～ 20 分程度に短縮することができます。
- ②アガロースゲル電気泳動で発生する泳動歪みやバンドのスマイリングがないため明瞭な判定結果を得ることができます。
- ③判定したいサンプルデータを選択することで、どのサンプルもポジティブコントロールと直接的な比較判定を行なうことができます。(Fig. 2 (b) (c))
- ④過去に取得した菌株データと比較判定することができます。
- ⑤非特異バンドの有無を高い検出感度で確認できるので PCR 反応の良否を確認することができます。

アガロースゲル電気泳動にて実施されている IS 法に比べ、MultiNA は電気泳動を自動で実施するため手作業を大幅に省力化することができます。また、分析結果は電子データとして取得・保存されるため、比較判定を容易にし、従来の写真画像に比べデータ管理を簡便に行なうことが可能です。

IS-printing System 法に MultiNA を適用することにより、迅速かつ簡便な分析が可能となります。

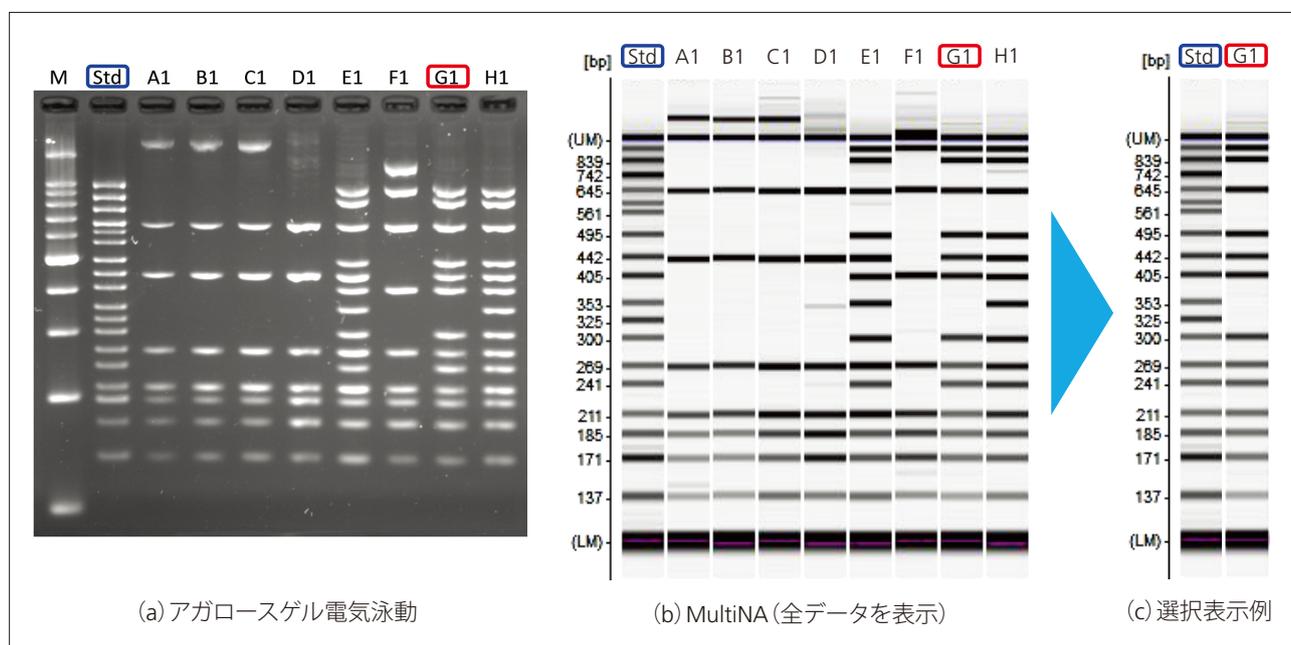


Fig.2 同サンプルにおけるアガロースゲル電気泳動および MultiNA の 1st set の結果
The Result of the Agarose Gel Electrophoresis and MultiNA in the Same Sample Treated by 1st Set

参考文献

*1) 大岡唯祐 *et al.*, 日本細菌学雑誌 61(1): 127, 2006

注 1) 本アプリケーションニュースは分析例の紹介であり、当社製品保証の対象用途外での使用となります。分析結果を保証するものではありません。

注 2) MultiNA の標準分析条件に比べ蛍光色素濃度が高いため、マイクロチップの使用回数に影響を及ぼす可能性があります。分析終了後は、マイクロチップのクリーニング実施をお勧めいたします。

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



関連分野

▶ ライフサイエンス

▶ 微生物

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ