

表5 感染研のPFGE結果がその他のPFGE型であったO157菌株又は不明のO157菌株

県名	菌分離 年月日	総数	血清型	毒素型	感染研でのPFGE結果			患者・ 保菌者	患者主臨床症状					
					<100 kb	100-200 kb	>350 kb		腹痛	下痢	血便	嘔吐	発熱	HUS
福岡市	2001/8/2~8/15	5	O157:H7	1+2				患者	5	5	3	0	1	0
佐賀県	2001/8/4	1	O157:H7	1+2				保菌者	0	0	0	0	0	0
長崎県	2001/8/16~8/18	2	O157:H7	1+2				患者	1	2	2	0	1	0
長崎市	2001/5/20	1	O157:H7	2	IIIb	ND	III	患者	0	0	0	0	0	0
	2001/5/11	1	O157:H7	2	ND	ND	ND	患者	1	1	1	0	1	0
	2001/5/30	1	O157	1+2	ND	IIc	ND	患者	1	0	0	0	0	0
	2001/9/20	1	O157:H7	2				患者	1	1	1	0	0	0
宮崎県	2001/7/30	1	O157:H7	2	IIIg	ND	IIIa	患者	0	1	0	0	1	0
	2001/8/7	1	O157:HNM	2	IIIa	ND	IIIa	保菌者	0	0	0	0	0	0
沖縄県	2001/8/15	1	O157:H7	2	IIIc	ND	III	患者	1	1	0	0	1	0
	2001/9/19	1	O157:H7	1+2	IIa	IIc	ND	患者	1	1	1	0	0	0
合計		0							12	12	8	0	6	0

表6 PFGE方法についての各種条件の検討

a. 菌の培養及びアガロースブロックの作成

項目	菌の培養及び菌液作成 菌液保存温度	アガロースブロックの作成	最終アガロース濃度
統一した方法	菌をTSBに接種し、16〜18時間、培養後、500μlを50℃で10分加熱し、菌液を500μlに希釈する。	アガロース名 低融点アガロース、BIO-RAD	1.2% 寒天を予めガラスのビネットで 称量し、500μlの菌液を注ぎ、 63℃で凝固しておく。
理由・参考事項	菌の培養は、菌の濃度はOD600が0.5〜1.0の間で、菌の生長を確認し、菌の濃度を調整する。菌の濃度が低い場合は、菌の濃度を調整する。菌の濃度が低い場合は、菌の濃度を調整する。	感染源の方法では10分だが、扱いやすいので、15分を採用。ただし、濃度を高くしたので、あとの洗浄等を充分にする必要がある。	

b. Lysozyme処理

項目	Lysozyme濃度	Lysozyme溶解液名	反応時間	Lysozyme洗浄回数
統一した方法	1mg/ml	0.5MEDTA	3時間	1回
理由・参考事項			原則として菌液が凍る3時間前、しかし1時間〜overnightでも良い。	ブルーチップを管壁につけて液を洗い取る。寒天を洗い取ることを避けるため。

c. Proteinase K処理と失活

項目	ProteinaseK処理				ProteinaseKの失活	
	ProteinaseK処理回数	ProteinaseK濃度	ProteinaseK溶解液名	反応時間	ProteinaseK洗浄回数	反応時間
統一した方法	1回	1mg/ml、17ブロックにつき1ml	0.5MEDTA, 1MN-lauroylsarcosine	Over night	1回	50℃で90分
理由・参考事項			長くて可(72時間まで)。ブロックの保存はこの状態で行い、冷蔵保存する。		ProteinaseK液から取り出したブロックはTE(シヤール)をぐらせ、新チューブに入れpefblotsSCで反応させる。	Peblots SC溶解液をイエローチューブで除去後、TEで3回(チップ先端は管壁につけて液を洗い、液中で洗い上げる)と寒天を洗い上げる(ことがある。)

d. 制限酵素処理とXbaI電泳泳動

項目	制限酵素による消化反応		アガロース名	7ガロース濃度	サイズマーカー(ラダー)
	XbaI 濃度 / Sample plug 量	反応時間			
統一した方法	30 units, BSAを加える	Over night	PFCT7 agar-7, BIO-RAD	1%	前もってラダーがうまく流れるかどうかが確認する。もしバンドの濃さが薄い場合は加熱処理後使用する。加熱処理は45℃3-5分(温度厳守)。加熱時間はロットによって異なるので、各自前もって確かめておく。
理由・参考事項					昨年夏、サイズマーカー(ラダー)が薄くて見えなかったり、加熱するときにラダーが溶けてしまったりして良好な結果が得られなかった。今年は上記加熱条件を決めた。

e. ガルの染色及び撮影

項目	ガルの染色および撮影			画像取り込み装置名	7日保存形式	画像解像度など
	染色時間	洗浄時間	使用フィルム名			
統一した方法	0.3μg/ml in TBE	2時間位	特になし(各施設で使い回している)	UV波長	TIFF (JPEGはダメ)できない時は写真のみとする。濃度2枚。	
理由・参考事項					互換性は画像が荒く解像できないので、TIFF形式で保存する。	

表7 大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

九州ブロック統一マニュアル

第1日目	(菌の培養)
3mlのTSBに菌を接種し、35-37°C、16-18時間、静置培養	
↓	
第2日目	(集菌)
1) 1.5mlのマイクロチューブに培養液を500μlとり、12,000 rpmで5分間冷却遠心	
2) 上清を除去後、滅菌生理食塩水またはPBS1,000μlを加え混和後、12,000 rpm、5分間冷却遠心	
3) 2)の操作を繰り返す(2回洗浄)。	
4) 上清を除去後、滅菌超純水 500μlを加え、懸濁	
↓	
(アガロースブロックの作成)	
1) アガロースブロック作成用プラスチック・ウエルに番号を付け、氷上で冷す。	
2) 1.2%低沸点アガロース(BIO-RAD) in 滅菌超純水を電子レンジで溶かし少し冷ました後に、予め、ガラスのピペットで1.5mlのマイクロチューブに500μlずつ、検体数の本数、分注し、63°Cで保温しておく。 (量が正確でないと寒天濃度が一定しない)	
3) 菌の不活化と、ゲルとの混和準備のために菌液を63°Cのウォーターバスに10分程度浮かす。	
4) 2)のチューブに3)の菌液を全量500μl入れ混和。	
5) 4)を1)のウエルに注入。	
6) 5)を氷上で固める。少なくとも30分間放置。	
↓	
(Lysozyme 処理)	
1) Lysozymeを1mg/ブロックあたりに秤量し、0.5M EDTAで1mg/mlとなるよう溶解し、14mlチューブに2mlずつ分注(2ブロック作成用)。	
2) 固化したアガブロックを1)のチューブに落とし入れる。	
3) 37°Cで3時間(1-2時間~over nightでも可)振盪反応	
↓	
(ProtenaseK 処理)	
1) 恒温槽から取り出したチューブを氷中で冷やした後、Lysozyme液を丁寧に抜取る。	
2) ProtenaseKを1mg/ブロックあたりに秤量し、1%N-lauroylsarcosine加0.5M EDTAで1mg/mlとなるよう溶解し、Lysozyme液を抜取ったチューブに2mlずつ分注(2ブロック作成用)。	
3) 50°Cでover night 振盪反応。(72時間まで可)。ブロックの保存はこの状態で行い、冷蔵保存。 (ここで止めても良い)	
↓	
第3日目	(プロテナーースKの洗浄)
1) 恒温槽から取り出したチューブを氷中で冷やした後、アガロースブロックを取り出す。	
2) 半分を切り取りTE(シャーレ)をくぐらせ次の操作へ、半分はProtenaseK液に戻す。	
↓	
(プロテナーースKの不活化)	
1) 新しいチューブに4mM Pefabloc in TEを0.5ml加え、アガロースブロック半分を入れ、50°C30分間振盪反応(1回目)。	
2) 恒温槽から取り出したチューブを氷中で冷やした後、Pefabloc液を丁寧に抜取る。 新しい4mM Pefabloc in TEを0.5ml加え50°C30分間振盪反応(2回目)。	
3) 2)の操作を繰り返す。(3回目)。	

↓
(Pefabloc 液の洗浄)

- 1) 恒温槽から取り出したチューブを水中で冷やした後、Pefabloc 液を除去し、TE を数 ml 加え直ちに除去、さらに TE を数 ml 加え、氷上で 30 分以上穏やかに振盪。
- 2) TE を捨て、新しいチューブにブロックを入れ、さらに TE を数 ml 加え、振盪器を用いて氷上で 30 分以上穏やかに振盪洗浄。
- 3) TE を捨て、TE を数 ml 加える。 (ここで止めても良い)

↓
(制限酵素による消化)

- 1) ブロックを出し、新しいチューブに制限酵素を含まない buffer を 200 μ l に入れ、氷上で 30 分以上振盪
- 2) buffer を丁寧に抜き取る。制限酵素の入った buffer (XbaI、30unit / sample plug、BSA を加える、ペーリンガー・マンハイム) をチューブに入れ、37°C cover night 振盪反応 (ここで止めても良い)

↓
第 4 日目 (泳動用ゲルの作成 及び 泳動)

- 1) 恒温槽から取り出したチューブを水中で冷やす。
- 2) 泳動用緩衝液 $\times 0.5$ TBE を 2,700ml 作成
 - ・泳動槽に TBE を入れ、予め 14°C まで Cool down する。
 - ・ $\times 0.5$ TBE で 1% PFGE ゲルを作成寒天が固化した後、TBE を表面に流し、コームを取り除き、冷蔵庫で冷却させる。(30~60 分)
- 3) 制限酵素処理したマイクロチューブに TE を 300 μ l 入れ氷上に置き寒天が堅くなるのを待つ
- 4) 冷蔵庫から取り出した泳動用ゲルにプラグを詰める。この時ウエルの中に緩衝液が入っていることを確認する。また、詰める時に気泡が入らないように丁寧にやる。
- 5) マーカーを冷凍庫から取り出し、良く TE buffer で洗浄する。場合によっては加熱処理後使用する。
 - ・注 マーカーの加熱処理をする場合は 45°C で実施する(温度厳守)。時間は 3~5 分が良いが、ロットによって違うので各自前もって確かめる。時間が長すぎると火の玉みたいにポーツと膨れる。予め 45°C の恒温槽で TE 0.5ml を入れたチューブを 10 分間暖め、使用量分だけのマーカーを 1 チューブに 1 個ずつ入れ、3~5 分加熱。加熱後は直ちに急冷。
- 6) マーカー及びサンプルのプラグを入れ終わったら、穴の前方にプラグを寄せる。
プラグの後方の隙間に 0.6% 低融点アガロースを入れ固める。
- 7) 泳動槽にブロックを装填したゲルを装着し、泳動する。泳動の温度は 14°C。
泳動条件は、200V 又は 6.0V/cm、4 to 8 sec 9 時間、8 to 50 sec 13 時間

↓
第 5 日目 (染色・写真撮影)

- 1) 泳動が終わったら、電源を切り、ゲルを取り出す。泳動槽は 2 度蒸留水で洗浄。
- 2) 染色 : ゲルは暗室で染色。0.3 μ g/ml のエチジウムブロミド 300ml (TBE) で 30 分(時間厳守) 振盪・染色。
アルミフویلなどで染色槽に蓋をする。
- 3) 脱色 : ゲルを蒸留水で振盪しながら 2 時間洗浄。こまめに DW を替える。特に最初が肝心。
アルミフویلなどで槽に蓋をする。
- 4) 写真撮影 : イルミネーターにサランラップをひき、染色・脱色済みの寒天を載せ写真を撮る。
- 5) 写真は上はコームの真上、下は寒天の真下にとる。拡大されていた方が取り込みやすいため。
コームの跡が分かり、下の寒天の位置が分かるようにする。
- 6) 写真は最低限 2 枚撮影(露出時間を長めにしてバンドが良く読める写真 1 枚、露出時間が普通の写真 1 枚)
- 7) コンピューター取り込み用は背景が暗めの方が良い。JPEG は画像が解析できないので、TIFF 形式で保存する。

サンプル、マーカーの並べ方

ゲル														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

- 1: 入ラダー
- 2: 各地研のO157分離株、できれば#577株
- 3: 各地研のO157分離株、できれば#577株
- 4: 入ラダー
- 5: 標準菌株 96002
- 6: 標準菌株 96212
- 7: 標準菌株 981553
- 8: 入ラダー
- 9: 標準菌株 970753
- 10: 標準菌株 960132
- 11: 入ラダー
- 12: 各地研のO157分離株、できれば#577株
- 13: 各地研のO157分離株、できれば#577株
- 14: 各地研のO157分離株、できれば#577株
- 15: 入ラダー

表8 各施設におけるPFGE条件-1

地研	菌の培養		DNAの調製-アガロース包埋					DNAの調製-Lysozyme処理					DNAの調				
	使用培地	培養時間	培養条件(静置・振盪)	菌液浄化緩衝液名	菌液作成用液名	菌液保温温度	アガロース名	使用アガロース濃度	最終アガロース濃度	Lysozymeの有無	Lysozyme濃度	Lysozyme溶解液名	反応時間	Lysozyme洗浄回数	ProteinaseK処理回数	ProteinaseK濃度	ProteinaseK溶解液名
1	TSB	18時間	静置	滅菌生理食塩水	滅菌超純水	63℃	低融点アガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	37℃, 3時間, 振盪	無	1回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
2	TSB	18時間	静置	滅菌PBS	滅菌超純水	63℃	クロモソールグレートアガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	37℃, 3時間, 振盪	TE 4回	1回	1mg/ml	Lysis buffer
3	TSB	18時間	静置	滅菌生理食塩水	滅菌超純水	63℃	低融点アガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	3時間	無	1回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
4	TSB	17時間	静置	SE Buffer	SE Buffer	63℃	低融点アガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	2mg/ml	0.5MEDTA	3時間	無	1回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
5	TSB	18時間	振盪	滅菌PBS	滅菌超純水	63℃	低融点アガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	3時間	無	1回	キット付属品	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
6	TSB	18時間	静置	滅菌生理食塩水	滅菌超純水	63℃	低融点アガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	3時間	無	1回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
7	TSB	18時間	静置	滅菌生理食塩水	滅菌精製水	63℃	低融点アガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	4時間	無	2回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
8	TSB	17.5時間	静置	滅菌PBS	遺伝子用蒸留水	63℃	クロモソールグレートアガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	18時間	無	1回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
9	TSB	18時間	静置	滅菌PBS	滅菌蒸留水	63℃	低融点アガロース	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	3時間	無	1回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
10	TSB	18時間	静置	滅菌生理食塩水	滅菌超純水	63℃	低融点アガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	Over night	無	1回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
11	TSB	18時間	静置	滅菌生理食塩水	滅菌超純水	63℃	低融点アガロース, BIO-RAD	1.20%	0.60%	有	1mg/ml	0.5MEDTA	2時間	無	1回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine
12	TSB	18+2時間	静置→振盪	滅菌PBS	滅菌超純水	55℃	低融点アガロース			有	1mg/ml	0.5MEDTA	5時間	無	1回	1mg/ml	0.5MEDTA, 1%N-lauroylsarcosine

表8 各施設におけるPFGE条件-2

製-Proteinase処理及び失活					制限酵素による消化反応					パルスフィールド電気泳動					ゲルの染色および撮影				
反応時間	ProteinaseK洗浄回数	ProteinaseK洗浄液名	Proteinase失活試薬名	反応時間×回数	洗浄回数	XbaI溶解緩衝液による馴化の有無	XbaI濃度/Sample plug	反応時間	アガロース名	アガロース濃度	PFGE装置名	PFGE装置メーカー名	エチジウムブロマイド濃度	染色時間	洗浄時間	使用フィルム名	UV波長	ファイル保存形式	画像解像度
Over night	2回	TE	Pefabloc SC	30分×3回	3回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	Mapper	0.3 μg/ml	30分	2時間	ホワロイト665	302nm	TIFF	
Over night	4回	TE	PMSF	1時間×3回	5回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII	0.3 μg/ml	30分	2時間	ホワロイト3200B	302nm	TIFF	
Over night	1回	TE	Pefabloc SC	30分×3回	2回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII	0.3 μg/ml	30分	2時間	ホワロイト667	302nm	TIFF	760×490
Over night	2回	TE	Pefabloc SC	30分×3回	2回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII	0.3 μg/ml	30分	2時間	ホワロイト667		TIFF	400
Over night	1回	TE	Pefabloc SC	30分×3回	3回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII	0.3 μg/ml	30分	2時間	フジFP3000B	254nm	TIFF	280dpi
Over night	1回	TE	Pefabloc SC	30分×3回	3回	有	30 units	Over night	Proteoseq Agarose, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII	0.3 μg/ml	30分	2時間	ホワロイト667		TIFF	
Over night	1回	TE	Pefabloc SC	30分×3回	3回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII	0.3 μg/ml	30分	2時間	ホワロイト667 ホワロイトコーレス インスタンバク71 ルム	312nm	TIFF	
Over night	3回	TE	Pefabloc SC	60→45→45	2回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	Gene Path	0.3 μg/ml	30分	2時間	ホワロイト667		TIFF	
Over night	無		Pefabloc SC	30分×3回	3回	有	10 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII	0.3 μg/ml	30分	2時間	感熱記録紙	302nm	TIFF	768×494ドット/セル
Over night	1回	TE	Pefabloc SC	30分×3回	3回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII	0.3 μg/ml	30分	2時間	フジFP3000B	365nm	TIFF	200×200dpi
Over night	1回	TE	Pefabloc SC	30分×3回	3回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	CHEF-DRIII	0.3 μg/ml	30分	2時間	フジFP3000B	302nm	TIFF	
Over night	2回	TE	Pefabloc SC	30分×2回	2回	有	30 units	Over night	PFC7カボース, BIO-RAD	1%	BIO-RAD	Gene Path	0.3 μg/ml	30分	2時間	ホワロイト3200B		TIFF	300dpi

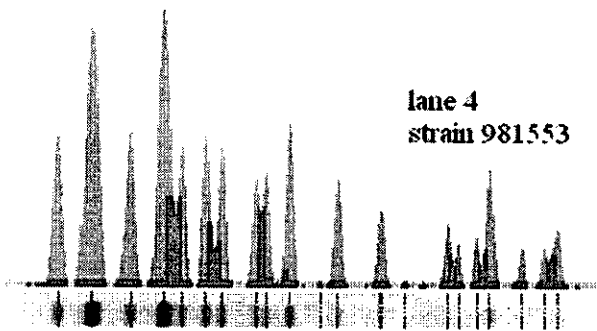
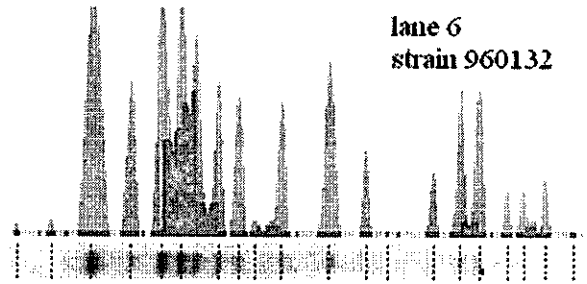
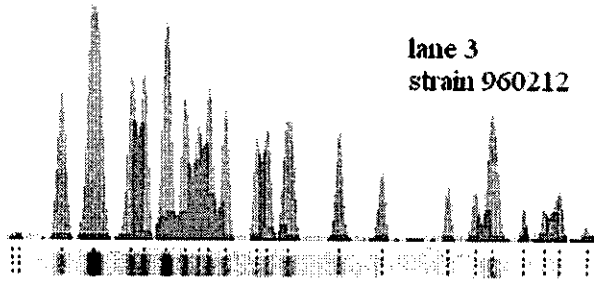
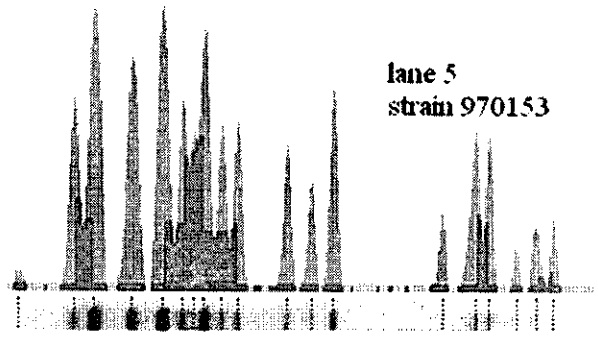
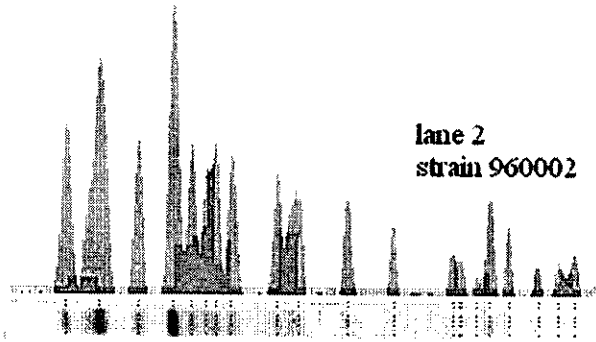
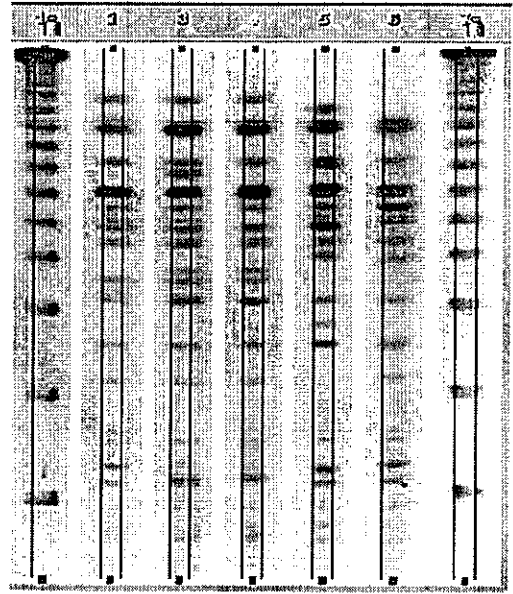
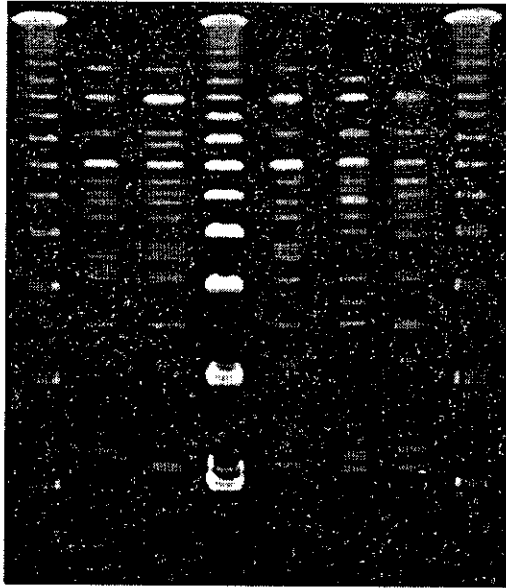


Fig.1 Original

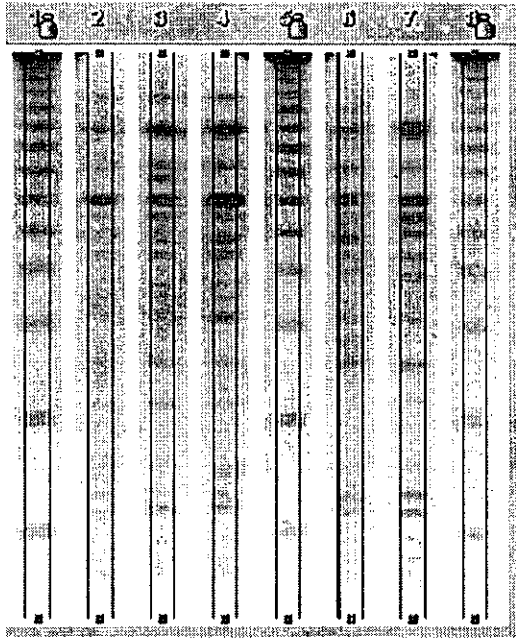


Fig. 2 Lab1

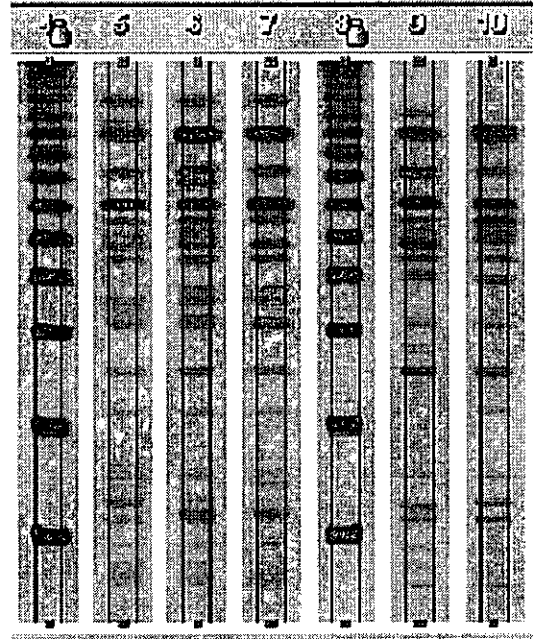


Fig. 3 Lab2

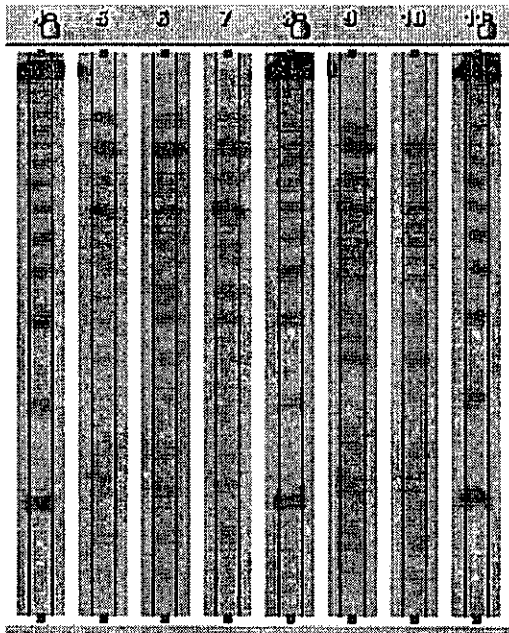


Fig. 4 Lab3

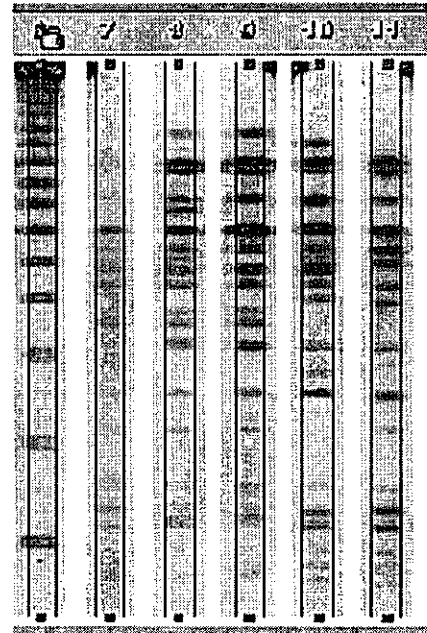


Fig. 5 Lab4

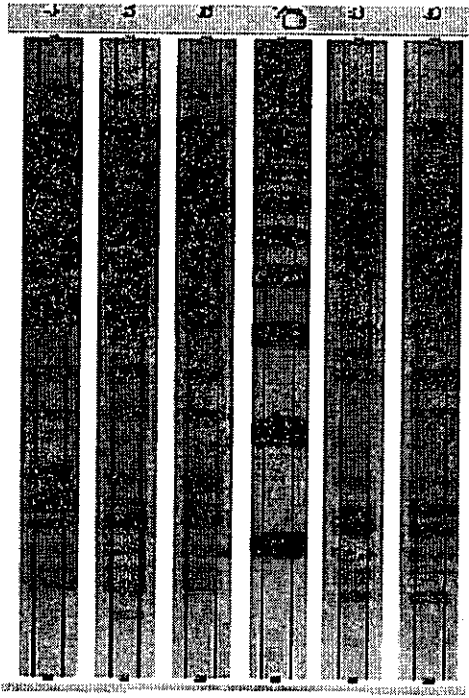


Fig. 6 Lab 5

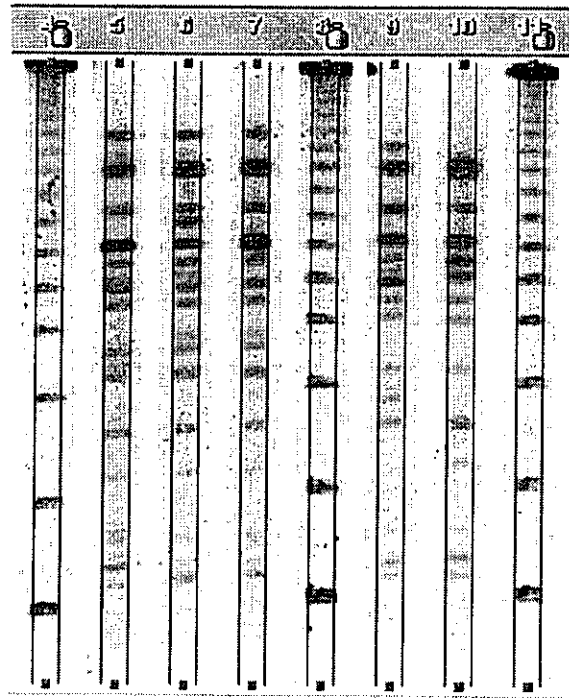


Fig. 7 Lab 6

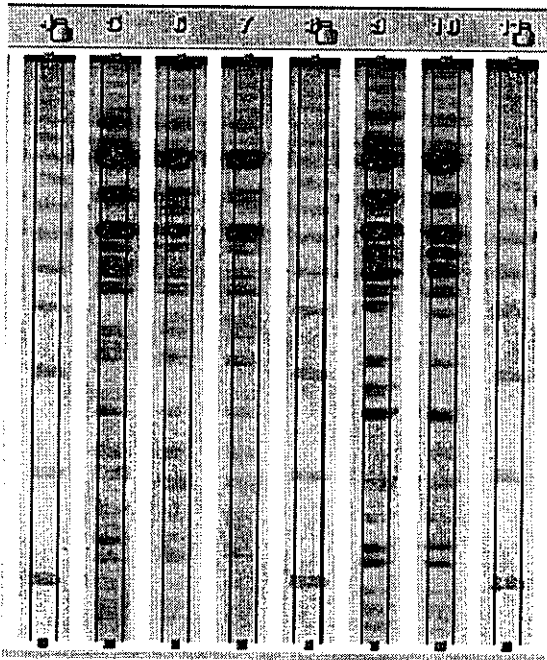


Fig. 8 Lab 7

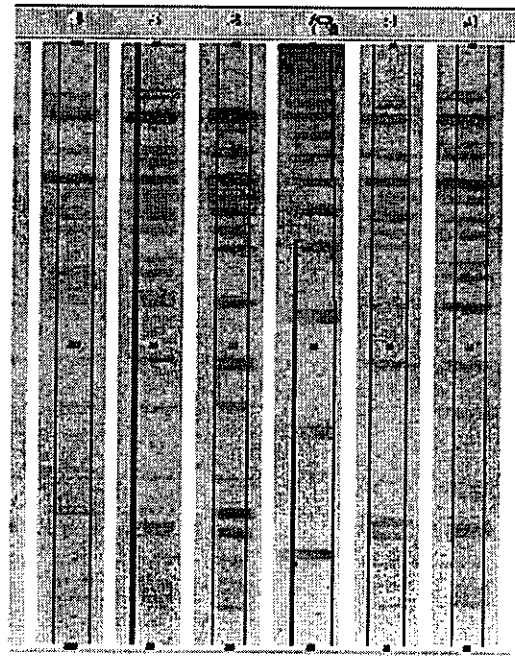


Fig. 9 Lab 8

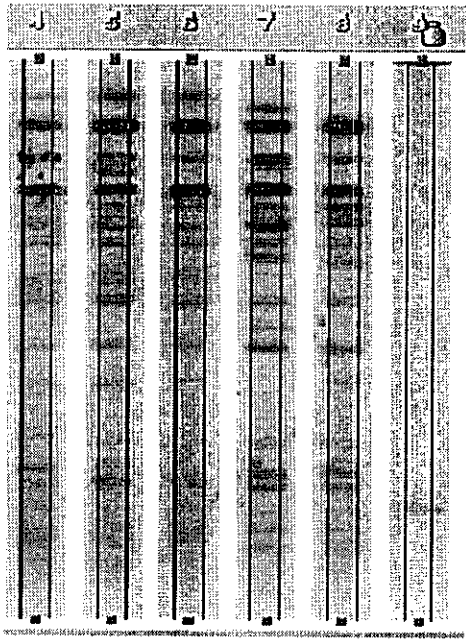


Fig.10 Lab9

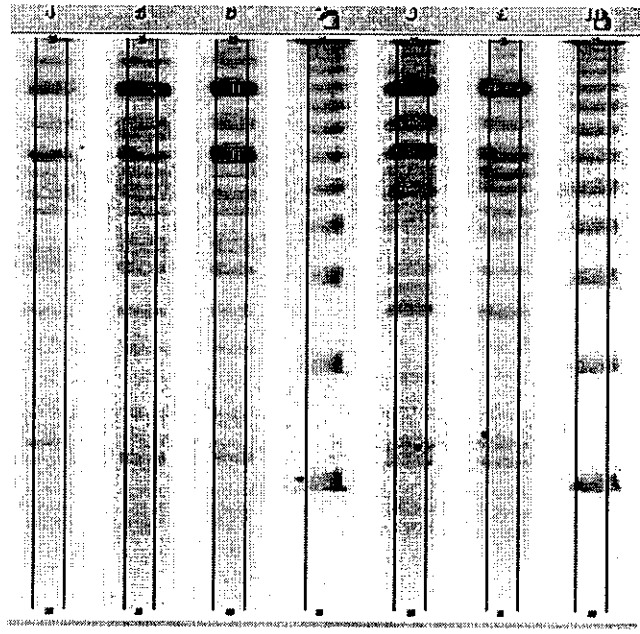


Fig.11 Lab10

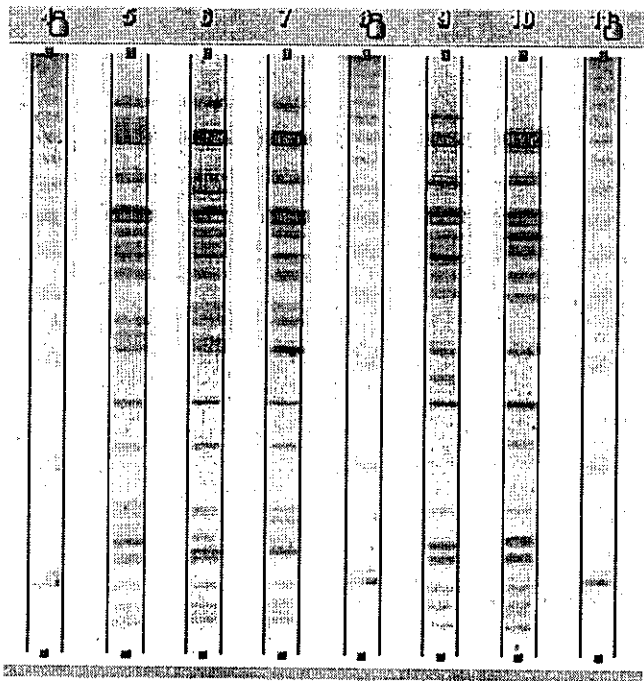


Fig.12 Lab11

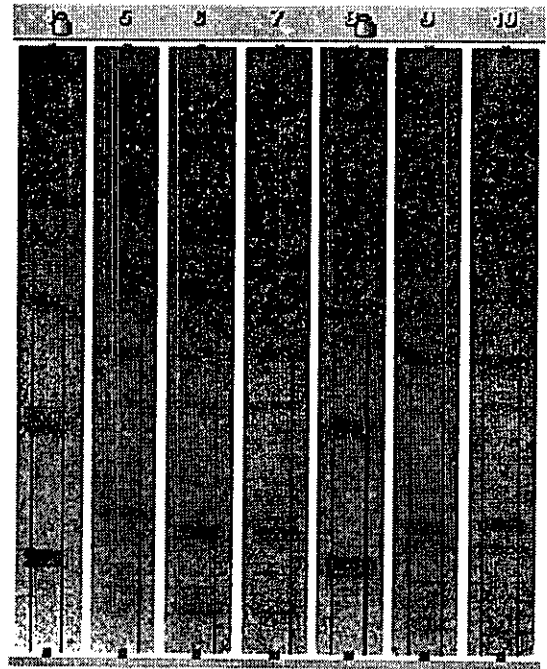


Fig.13 Lab12

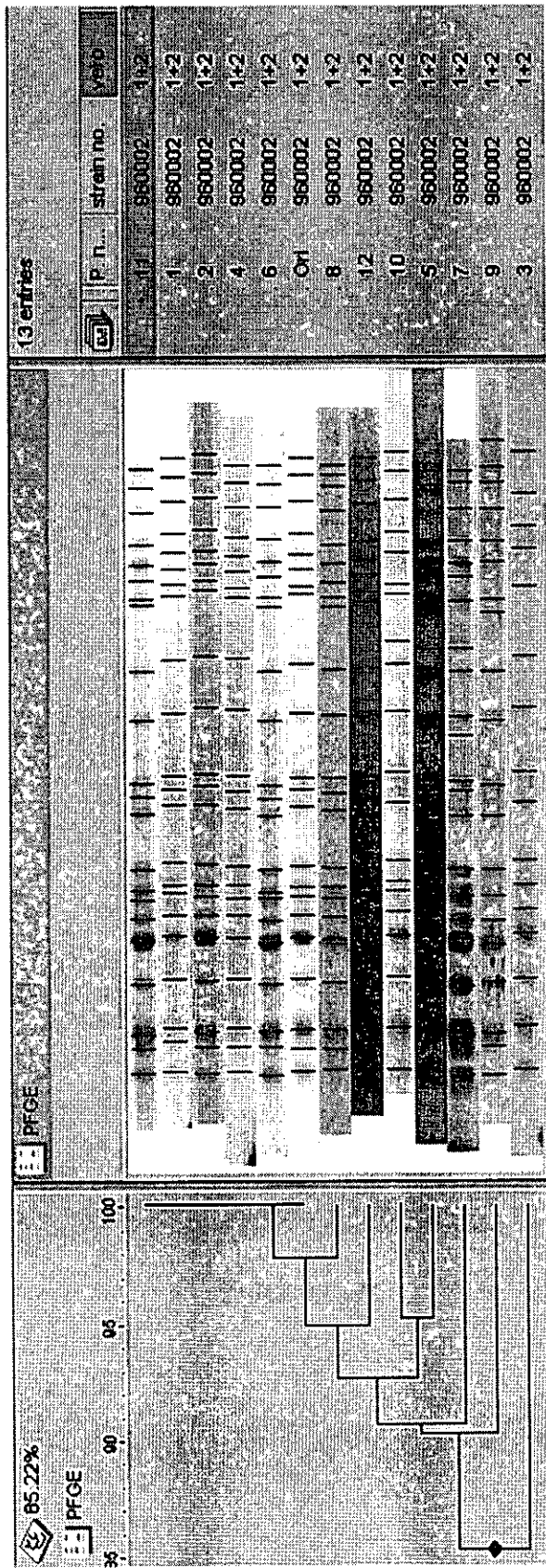


Fig.14 Dendrogram of strain 960002

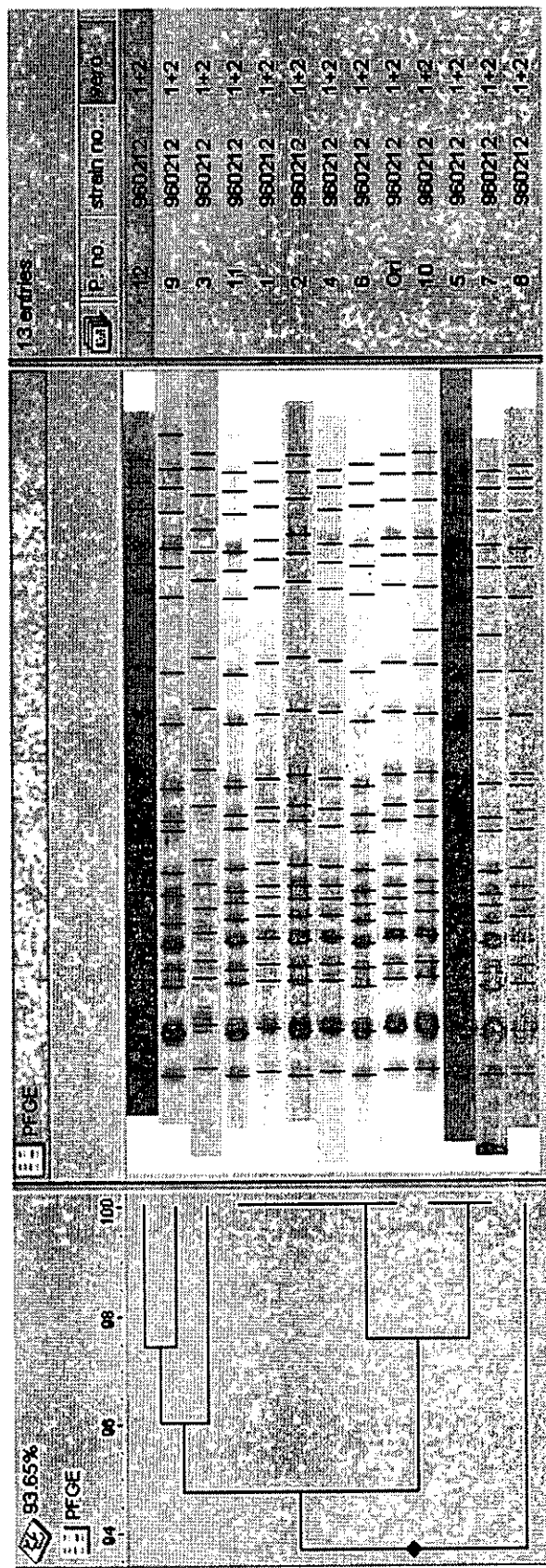


Fig.15 Dendrogram of strain 960212

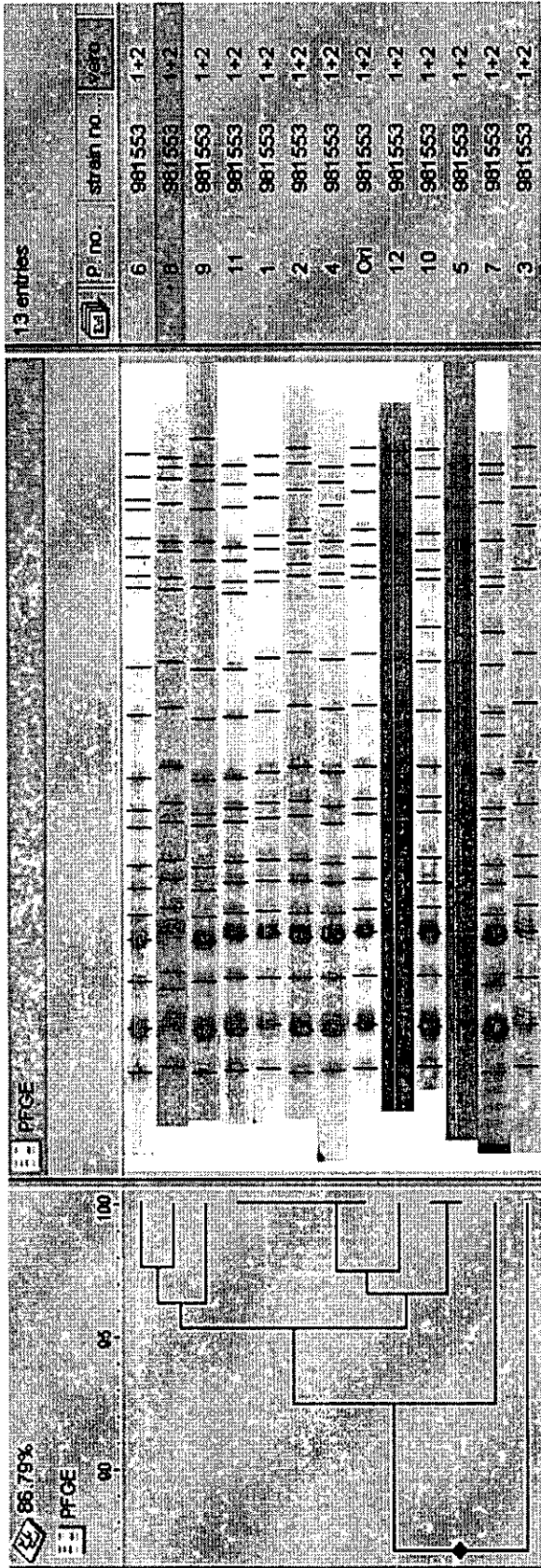


Fig.16 Dendrogram of strain 981553

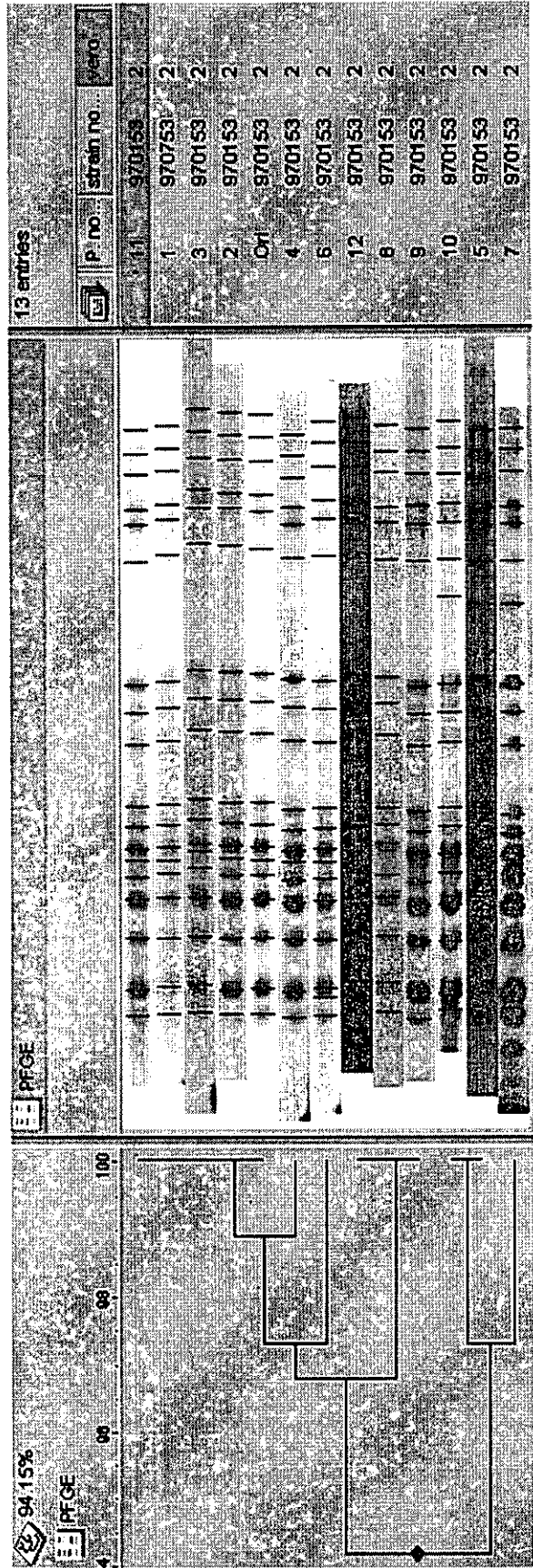


Fig.17 Dendrogram of strain 970153

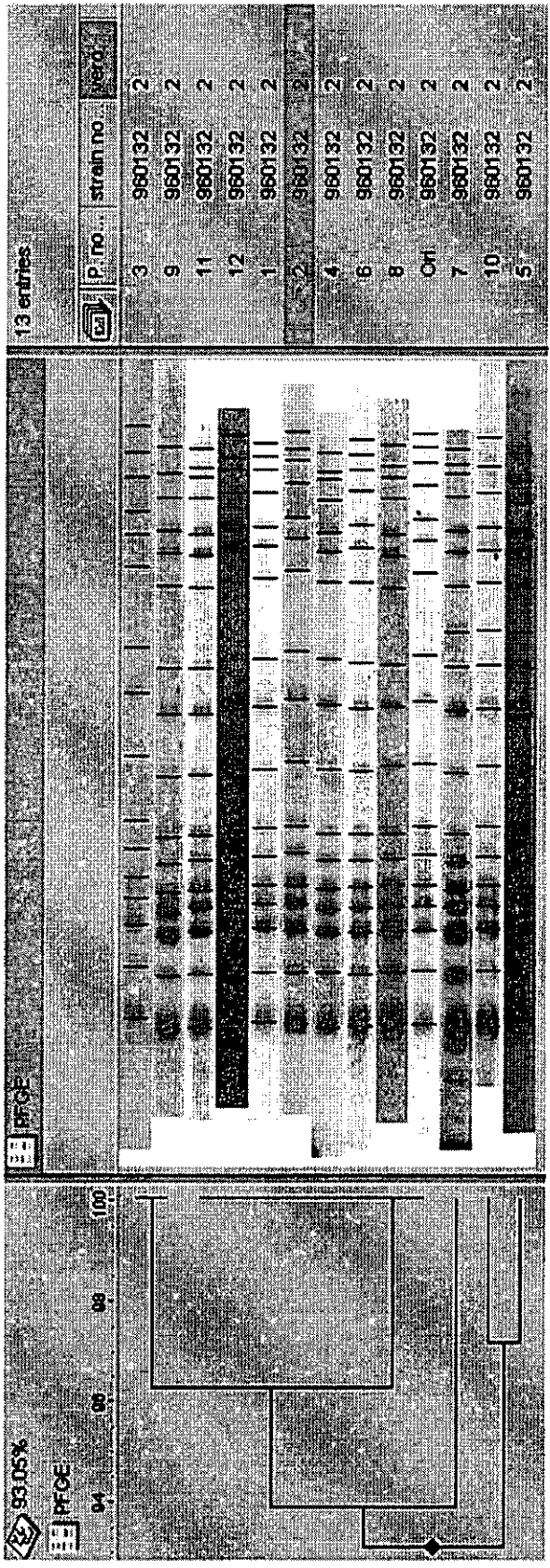


Fig.18 Dendrogram of strain 960132

PFGE

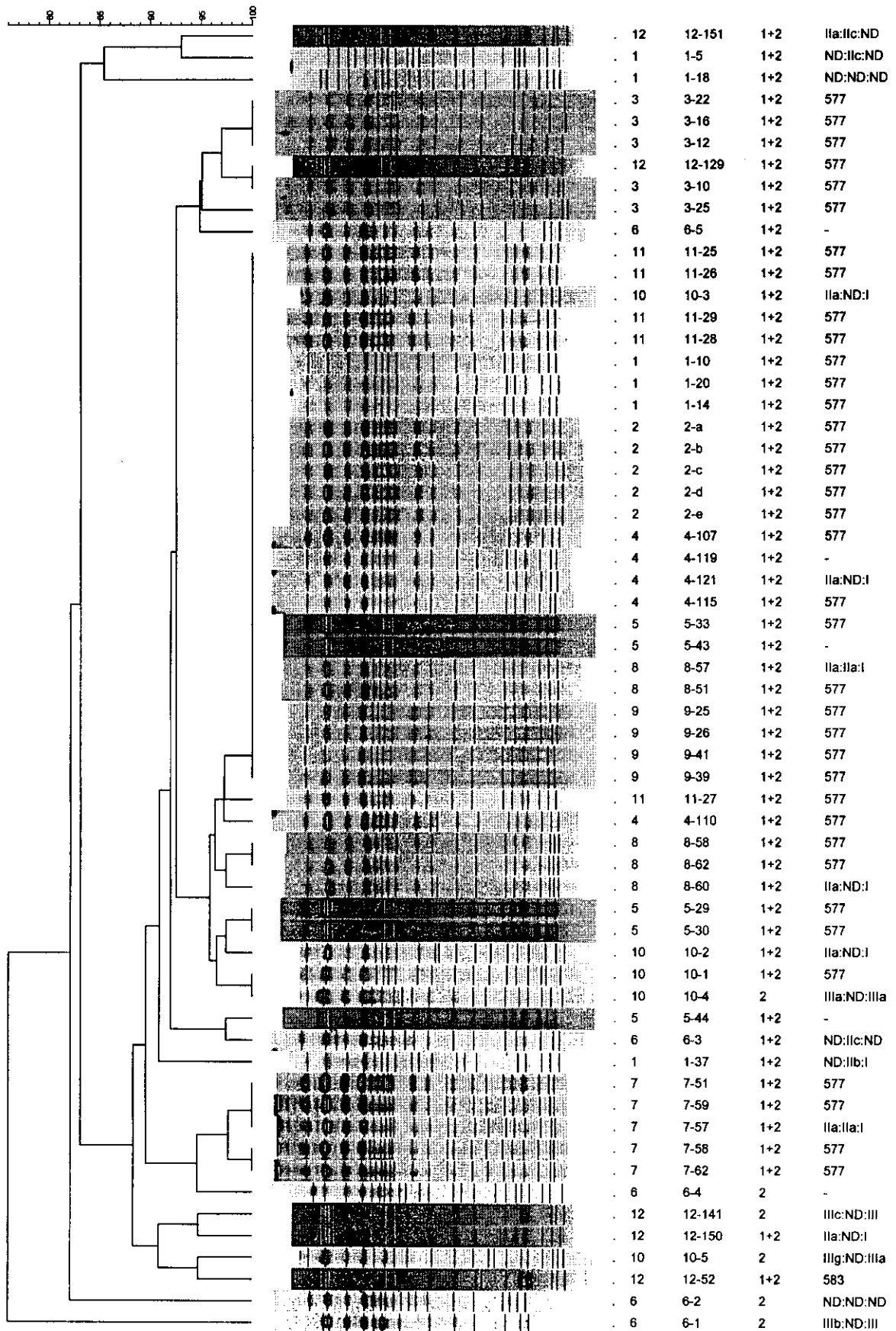


Fig.19 Dendrogram of O157 strains