

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究」
分担研究報告書

サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

研究分担者 泉谷秀昌 国立感染症研究所細菌第一部第二室 室長

研究要旨

食水系細菌感染症にはサルモネラ症、赤痢、コレラなどがあり、これらは国内外でさまざまな汚染ルートを通じて多くの患者を発生させており、公衆衛生上重要な感染症である。本研究では、こうした細菌感染症を対象に、海外での流行情報を収集すること、ならびに国内侵入への対応のため、分離菌株の解析手法の検討を行うことを目的とする。サルモネラは、国内外で多くの食中毒を起こしており、欧米では国際的な流行に発展することもある。本年度ではインドから輸入されたマグロが原因で食中毒が発生した。また、細菌性赤痢は途上国を中心に発生しており、わが国では海外渡航者による輸入例が多い。本年度はトルコツアーによる集団事例が発生した。

A. 研究目的

サルモネラ症、赤痢、コレラなどは、汚染された飲料水・食品を介して感染する経口感染症の代表的なものである。

サルモネラは、国内外で多くの食中毒の原因となっている。わが国では1990年代にサルモネラ食中毒のピークがあったが、現在でもなお、細菌性食中毒発生の原因物質別で上位を占めている。サルモネラは2,500種以上の血清型から成り、海外でも多様な原因食品を介して多くの食中毒が発生している。とくに、サーベイランス体制が確立されている欧米からの報告が多い。

細菌性赤痢は赤痢菌に汚染された食品や水を介して感染する。国内の患者発生数は年間100名前後であり、大半は海外渡航者による輸入例である。しかしながら、近年発生した集団事例の中には海外からの輸入食品との関連が示唆されたものもあった。一方で、国内例はそのほとんどが散発もしくは家族内事例などの小規模なものであり、感染源の究明にいたることはほとんどないのが現状である。細菌性赤痢

は主として途上国で発生しており、菌株解析を通じて輸入例と国内例の対比を行うことは重要な工程である。

上記の現状から、本研究では、海外で発生した食中毒の情報収集とともに、分離菌株の解析を通じて国内外の流行菌型を特徴づけ、そのデータベースの構築を行う。前者についてはサルモネラを、後者については赤痢菌を主な対象とする。

B. 研究方法

海外事例の情報収集は論文雑誌・米国CDC、欧州CDCからの資料などを参考にした。

赤痢菌分離株に関しては、パルスフィールドゲル電気泳動法（pulsed-field gel electrophoresis; PFGE）、もしくは複数遺伝子座を用いた反復配列多型解析（multilocus variable-number tandem-repeat analysis; MLVA）を使用した。得られたデータをBioNumericsソフトウェアに取り込み、データベースの構築、並びにクラスター解析を行った。

C. 研究結果および考察

今年度を中心に最近海外で発生したサルモネラ食中毒の中から、輸入食品もしくは複数国が関連した事例を表 1 にまとめた。起因菌の血清型はほぼ全て異なっていた。推定原因食品は果物・魚介類などがあった。わが国では、ヒトから分離される血清型の多くを Enteritidis が占める (図 1)。また、国内のサルモネラ食中毒としては、血清型 Enteritidis と鶏卵を原因食品とする事例がよく知られているが、海外では多様な血清型-食品の組み合わせで食中毒が発生していることが窺える。殊に、2012 年 1-7 月にかけて米国で発生したマグロ (キハダマグロ) の中落ちによる事例では、原因食品がインドから輸入されており、2 つの血清型の菌に汚染されていた。マグロはわが国でも身近な食品であり、こうした事例が発生したことは注目すべきであろう。

2012 年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は 97 株であった。うち、輸入例は 45 株で、南アジア 16 株、東南アジア 6 株であった。これらについて、MLVA による解析を行った。上記輸入例はそれぞれ、これまでに収集したデータベース上にて各地域に相応するグループに振り分けられた。2012 年夏にトルコツアーに関連した集団事例が発生した。当該事例関連の 12 株は MLVA において結果が一致し、単一の菌の暴露であることが示唆された。データベース上で類似の菌株の検索を行ったところ、2004 年にトルコ渡航者 (散发例) から分離された菌株と 2 遺伝子座ちがいであることが判明した (図 2)。これまで中東地域からの輸入例は少なかったが、2004 年および 2012 年の菌株が同じグループに含まれ、本解析法の有用性が示唆された。

D. 結論

近年の食および人のグローバル化により、海外から様々な食品および人が国内に入りやすくなっている。と同時に、食中毒菌により汚染された食品が入ってくる機会も増加している

と考えられる。今後も、海外の発生状況の情報収集および国内の監視体制の整備、ならびに分離菌株のデータベースの拡充を図る必要がある。

E. 研究発表

論文発表

H. Izumiya, J. Terajima, S. Yamamoto, M. Ohnishi, H. Watanabe, A. Kai, T. Kurazono, M. Taguchi, T. Asai, M. Akiba, Y. Matsumoto, and Y. Tamura: Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emerg. Infect. Dis.* (in press)

F. 知的所有権取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案
なし
3. その他
なし

【資料】

表 1. 海外で発生した主なサルモネラ食中毒事例

| 時期 | 起因菌 | 推定原因食品 | 発生国 | 患者 | 死者 | その他情報 |
|---------------|------------------------------|--------------|------------------|-------|----|---------------------|
| 2012年10月 | Salmonella Thompson | スモークサーモン | オランダ | ~1000 | 3 | オランダおよび米国でリコール |
| 2012年7月-9月 | Salmonella Braenderup | マンゴー | 米国 | 127 | | メキシコでパック |
| 2012年1月-7月 | Salmonella Bareilly, Nchanga | マグロ | 米国 | 425 | | インドから輸入 |
| 2011年8月-12年9月 | Salmonella Stanley | 七面鳥 | オーストリア、ハンガリー他7か国 | 421 | | |
| 2011年12月 | Salmonella Newport | スイカ | 英国、ドイツ他6か国 | 54 | 1 | |
| 2011年8月-12月 | Salmonella Bovismorbificans | タヒーニ(ゴマペースト) | 米国 | 23 | | レバノンの製造業者、カナダでも患者発生 |
| 2011年7月-10月 | Salmonella Enteritidis | パインナッツ | 米国 | 43 | | トルコ産 |
| 2011年1月-8月 | Salmonella Agona | パイア | 米国 | 106 | | メキシコから輸入 |
| 2008年2月-10月 | Salmonella Agona | ファストフード | イギリス、アイルランド他7か国 | 163 | 2 | アイルランドA社 |

図 1. 人から分離されたサルモネラ血清型 (2011 年, n=902, 病原微生物検出情報)

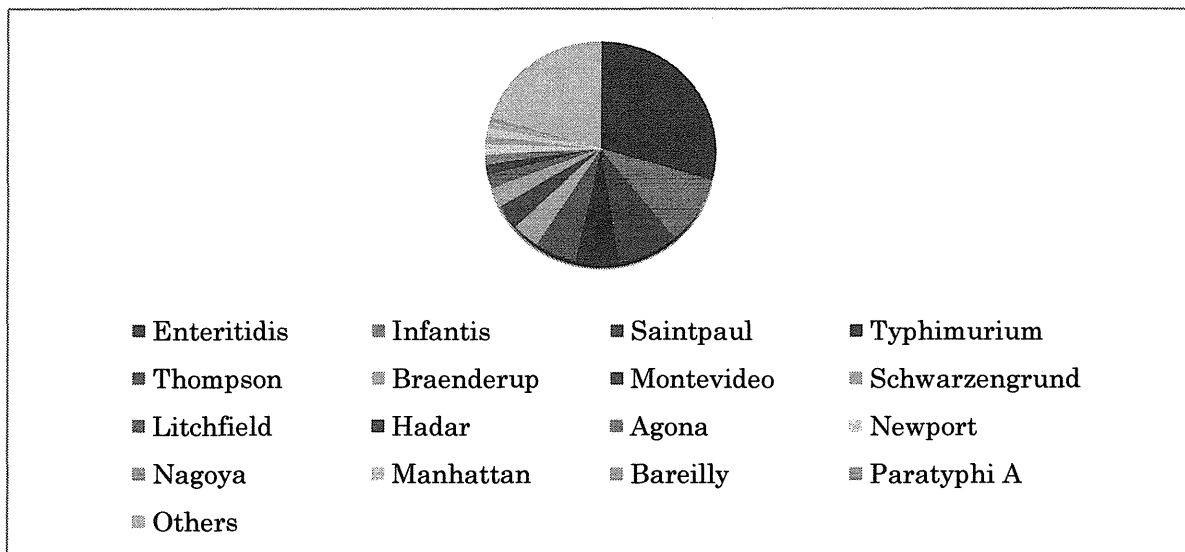
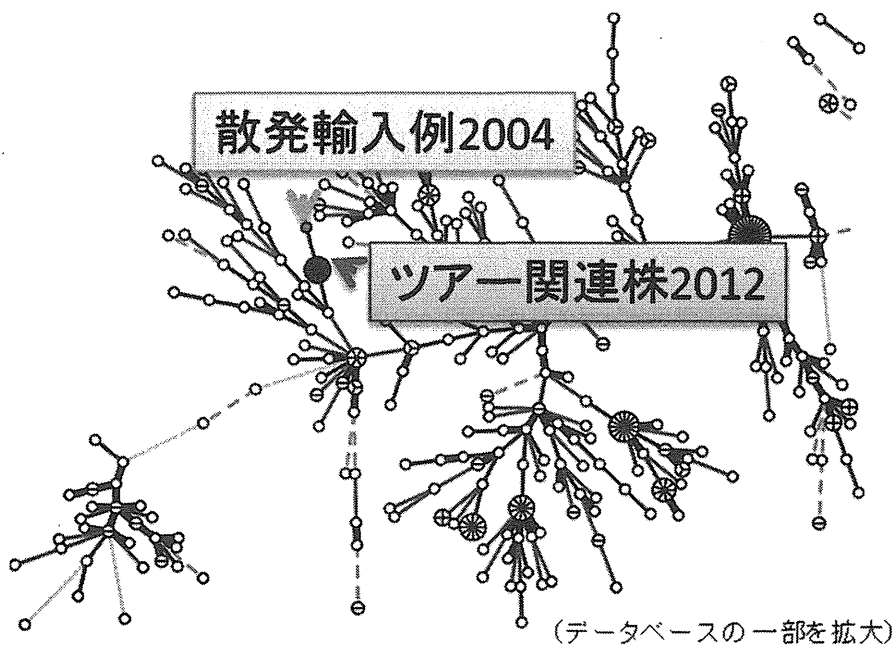


図 2. MLVA データベース上における、2012 年トルコツアー関連株と 2004 年トルコ輸入例



厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
「国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究」
分担研究報告書

各国におけるリステリア症発生状況
及び *Listeria monocytogenes* による食品汚染実態に関する研究

分担研究者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 主任研究官
協力研究者 門田修子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者 鈴木穂高 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 主任研究官

研究要旨

汚染食品の摂取により人に媒介されるリステリア症は、グラム陽性の短桿菌である *Listeria monocytogenes*（リステリア）を原因とする。本菌は自然界に広く分布しており、動物の腸管内、河川水、土壌等から分離されるため、農産物の一次汚染を防止することは困難である。また、本菌は低温や高食塩濃度等への抵抗性が強く、食品製造環境における汚染の排除が難しいことが知られている。そのため、生ハム・サラミ等の非加熱食肉製品やナチュラルチーズ等の輸入食品や、水産加工品等の国内産食品からは一定の割合で本菌の検出が報告されている。リステリア症の集団感染事例は、日本国内ではほとんど見られていないが、欧米諸国では頻繁に起こり、非加熱食肉製品、乳製品、サラダ類などがその原因食品として知られている。一方日本国内で発生しているリステリア症はその大半が散发例であり、潜伏期間が長期にわたるため、その原因食品が同定されず、ほとんどの症例が原因不明となっている。

現在国内では、腸管出血性大腸菌症や赤痢等において、集団事例の同定や原因食品特定のための分子疫学的解析が実施されて、国際的にも同様の手法が米国 CDC を中心に行われている。今回、海外から食品を通じて国内に侵入しうる感染症の一つとしてリステリア症に着目し、CDC で用いられている手法に基づくプロトコールを作成して輸入食品、国内産食品及び患者由来菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学的解析を実施した。その結果、得られたクラスターが血清型との相関が高いことが示された一方で、同一検体由来の複数の菌株においても識別が可能であり、株の同一性を高感度に示せることが明らかとなった。

A. 研究目的

人及び動物に脳脊髄膜炎、流死産を引き起こし、発症時の致命率が 20–30%にも及ぶリステリア症の原因菌である *Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は、動物の腸管内、土壌、河川水や食品工場、冷蔵庫内など様々な環境に存在している。また、本菌は高度な環境抵抗性をもち、 -1°C もの低温下での

低温増殖能、20%もの高食塩濃度下での生存能を有し、食品の一次汚染並びに加工・保存過程での二次汚染の制御が困難である。欧米諸国ではしばしばリステリア症の集団事例が見られており、2008 年にはカナダで、1 工場で作られたローストビーフ等の食肉加工品数品目を原因食品とする集団事例により、57 名が発症、うち 23 名が死亡した。平成 23 年 9 月

には米国でカンタロープメロンを原因食品とした複数の州にまたがる集団事例が発生し、146名の患者数、うち30名が死亡する事態となった。その他、過去の事例における原因食品としてはナチュラルチーズ等の乳製品、スモークサーモン等の水産物及びその加工品、ローストビーフ等の食肉及びその加工品、サラダ等様々な食品が知られている。我が国のリステリア症は報告義務のない疾患であり、その患者数は2004年の調査で年間約80例と推定されている。集団事例はほとんど報告されておらず、2001年の国内産ナチュラルチーズを原因食品とする1例が確認されているのみである。リステリア症は下痢や風邪様症状を主症状とする非侵襲性リステリア症と流産、髄膜炎、敗血症等を引き起こす侵襲性リステリア症に分類され、潜伏期間は前者で数日、後者は長い場合には3ヶ月にも達する。そのため、侵襲性リステリア症の散发事例で原因食品が特定されることはほとんどない。また、過去の研究から国内で流通する食品がある程度本菌に汚染されていることが明らかとなっている。分担研究者らが実施した平成19年度の厚生労働科学研究「輸入食品における食中毒菌サーベイランス及びモニタリングシステム構築に関する研究」の分担研究「輸入非加熱食肉食品の *Listeria monocytogenes* による汚染状況」では、国内で一般に流通している生ハム、サラミ等の非加熱食肉製品68検体中4検体(5.9%)から、平成21年度の食品等検査費で実施された「一般流通食品におけるリステリア汚染実態調査」においては市販非加熱喫食食品1500検体中21検体(1.4%)から本菌が分離された。輸入時の検疫で非加熱食肉製品とナチュラルチーズのリステリア汚染検査がなされているものの、輸入量の一部にとどまっている。本研究では、海外から汚染食品を媒介して国内に侵入する感染症の一つとしてリステリア症に着目し、その発生状況を正確に把握するための情報を収集するとともに、様々な由来のリステリア菌株の分子型別データを収集、蓄積することによ

り、国内発生事例の原因食品同定に役立てることを目的として、研究室保有の輸入食品、国内産食品及び患者由来株を用いた *L. monocytogenes* のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析を実施した。

B. 研究方法

1. 検体

日本国内で分離された *L. monocytogenes* 64菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株3株、国内産食品由来株42株及び輸入食品由来株17株、調理環境由来株1株及び標準菌株(ATCC19115株)1株であった(表1)。血清型の内訳は、1/2aが30株、1/2bが9株、1/2cが18株、3aが1株、3bが1株、4bが7株、未分類が1株であった。

2. PFGEによる分子型別

米国CDCの方法を基本として *L. monocytogenes* のPFGE解析法の標準的プロトコールを作成した(別添1)。この方法により、研究室保有株のPFGEプラグを作成し、制限酵素 *AscI* で切断後に電気泳動を行い、得られた画像はBioNumericsソフトウェア(ver.6.1)を用いて解析した。系統樹作成には、非加重結合法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA法)を用い、toleranceは0.6に設定した。

3. 諸外国におけるリステリア症集団事例に関する情報収集

平成24年4月から平成25年3月までの期間で、食品安全委員会の発表している食品安全関係情報及び日報と、国立医薬品食品衛生研究所安全情報部が発表している食品安全情報より、諸外国におけるリステリア症集団事例についての情報を収集した。

C. 研究結果

1. PFGEによる分子型別

国内産食品、輸入食品及び患者等に由来する

L. monocytogenes 菌株の PFGE 解析の結果を図 1 に示した。その結果、64 菌株は 3 つのクラスターに分類された (図 1)。クラスター I には血清型 1/2b 及び 4b を中心に構成され、特に血清型 4b 株は全て同一のサブクラスター内に分類された。クラスター II は血清型 1/2a を中心とするサブクラスターと血清型 1/2c を中心とするサブクラスターに分類された。フランス産チーズ由来株 (血清型 1/2a) は、他の 63 菌株とは大きく離れた独自の PFGE パターンを示した (similarity 27.0%)。3 株の患者由来株の内、1 株は生ハム由来株と高い相同性を示したが、他の 2 株については現時点で相同性の高い株は見られなかった。また、今回の解析では、フランス産チーズ以外では菌株の由来食品やその原産国でクラスターが分かれる結果にはならなかった。

2. 諸外国におけるリステリア症集団事例に関する情報収集

平成 24 年 4 月から平成 25 年 3 月までの期間に諸外国で発生したリステリア症集団事例は 3 例見られ、その原因食品は主にチーズであった (表 2)。

D. 考察

本研究において、国内患者由来株 3 株、国内産食品由来株 42 株及び輸入食品由来株 17 株、調理環境由来株 1 株及び標準菌株 1 株の計 64 菌株について PFGE による解析を実施した結果、主に血清型に基づくクラスタリングに分類されることが示された。また、同一食品から分離された複数の菌株においても、PFGE パターンが異なる例が 5 例見られ、一検体が複数のクローンに汚染されている頻度が高いことが示された。また、3 株の患者由来株の内 1 株は食品由来株と非常に高い相同性を示したが、それらの分離時期は大きく異なっているため、次年度以降に別の制限酵素を用いた PFGE パターンの解析やその他の分子疫学的手法を用い

【資料】

た解析を実施するとともに、さらに多くの株について PFGE 解析データを蓄積し、その相関について慎重に検討していくべきであると思われる。

これらの結果から、米国 CDC の手法を基にした PFGE 解析法により、国内の様々な由来のリステリア菌株を有効に分類していくことで、散发例を含むリステリア症事例の原因食品を類推しうる可能性が示唆された。一方で、原因食品の特定や食品及び原産国ごとの解析を実施するためには、より多くの食品由来株や患者由来株について、多面的な分子疫学的解析を行い、国内の多くの試験所からの情報を統合、データベース化することが必要であると思われる。

E. 結論

本研究の結果、リステリアの *AscI* 切断による PFGE 解析を用いた分子疫学的解析は、クラスターと血清型に高い相関がみられた。一方で、同一検体由来株について泳動パターン結果が一致しないことがあり、株の同一性を高い感度で検出できることが明らかとなったため、今後 CDC の手法に基づいた今回の標準的 PFGE 解析法を使用し、国内データの蓄積を行うこととした。

F. 研究発表

学会発表

Okada Y., Monden S., Suzuki H., Nakama A., Ida M., Yamamoto S., Igimi S.: ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES OF LISTERIA MONOCYTOGENES ISOLATED FROM IMPORTED AND DOMESTIC FOODS IN JAPAN FAVA2013 (2013.1)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 使用菌株

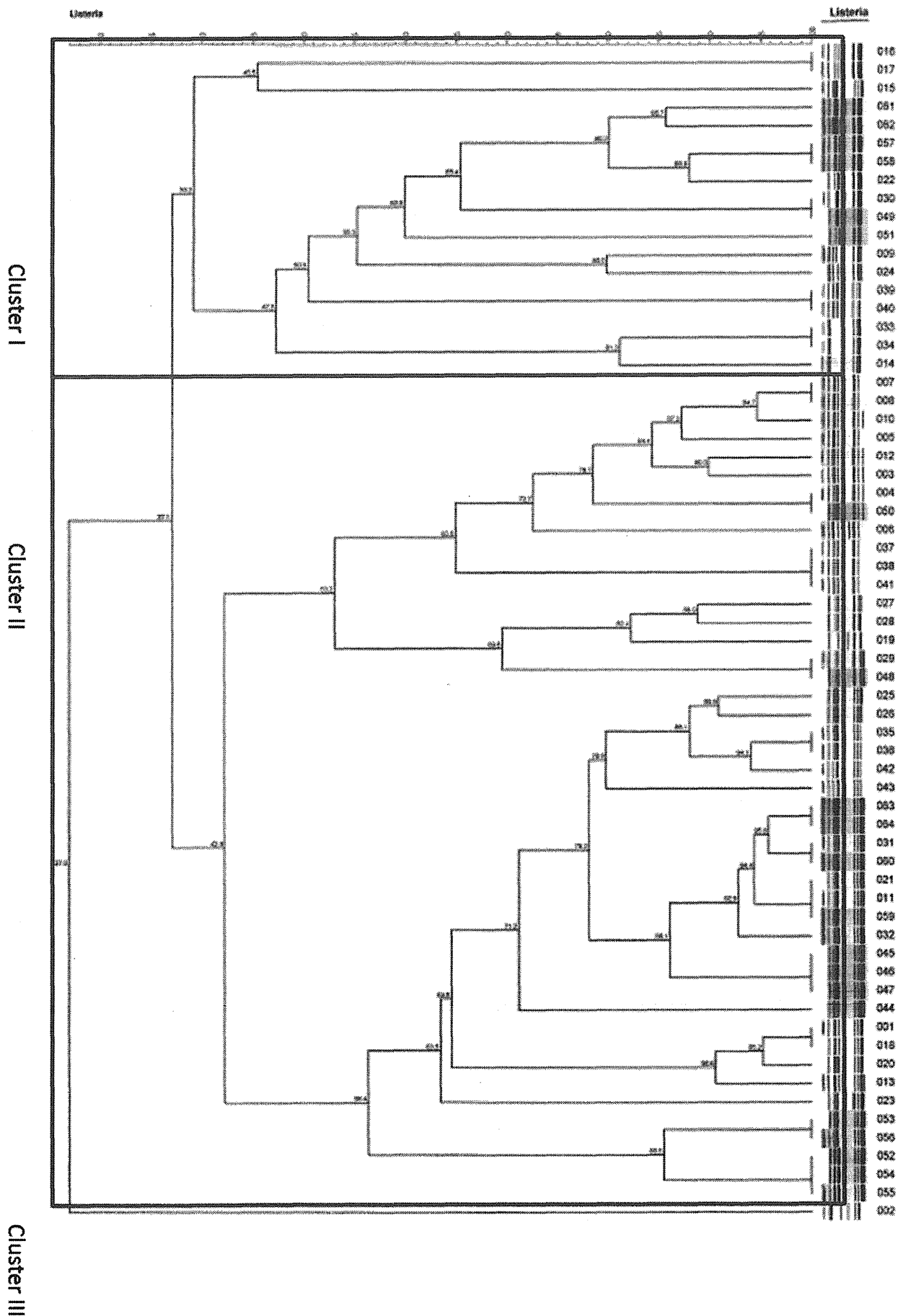
| PFGE 番号 | 由来食品 | 国産/輸入 | 血清型 | 分離年 |
|---------|------|-------|------|------|
| 1 | 患者 | - | 未実施 | 2012 |
| 2 | チーズ | 輸入 | 1/2a | 2010 |
| 3 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2008 |
| 4 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2007 |
| 5 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2007 |
| 6 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2006 |
| 7 | 鶏肉 | 輸入 | 3a | 2006 |
| 8 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2006 |
| 9 | 鶏肉 | 輸入 | 4b | 2006 |
| 10 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2c | 2006 |
| 11 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2006 |
| 12 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2006 |
| 13 | 串カツ | 国産 | 1/2a | 2008 |
| 14 | ホタテ | 国産 | 4b | 2008 |
| 15 | 生ハム | 輸入 | 1/2a | 2007 |
| 16 | サラミ | 輸入 | 1/2b | 2007 |
| 17 | サラミ | 輸入 | 3b | 2007 |
| 18 | 生ハム | 輸入 | 1/2a | 2007 |
| 19 | 患者 | - | 1/2a | 2007 |
| 20 | サラミ | 輸入 | 1/2a | 2007 |
| 21 | サラミ | 輸入 | 1/2c | 2007 |
| 22 | 調理環境 | - | 1/2b | 2006 |
| 23 | 患者 | - | 1/2a | 2006 |
| 24 | 標準菌株 | - | 4b | 不明 |
| 25 | 牛肉 1 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 26 | 牛肉 1 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 27 | 牛肉 2 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 28 | 牛肉 2 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 29 | 牛肉 3 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 30 | 牛肉 3 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 31 | 牛肉 4 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 32 | 牛肉 4 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 33 | 牛肉 5 | 国産 | 4b | 2012 |
| 34 | 牛肉 5 | 国産 | 4b | 2012 |
| 35 | 牛肉 6 | 国産 | 1/2c | 2012 |

| PFGE 番号 | 由来食品 | 国産/輸入 | 血清型 | 分離年 |
|---------|-------|-------|------|------|
| 36 | 牛肉 6 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 37 | 牛肉 7 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 38 | 牛肉 7 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 39 | 牛肉 8 | 国産 | 4b | 2012 |
| 40 | 牛肉 8 | 国産 | 4b | 2012 |
| 41 | 牛肉 9 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 42 | 牛肉 9 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 43 | 牛肉 10 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 44 | 牛肉 10 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 45 | 牛肉 11 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 46 | 牛肉 11 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 47 | 豚肉 1 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 48 | 豚肉 1 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 49 | 豚肉 2 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 50 | 豚肉 2 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 51 | 豚肉 3 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 52 | 豚肉 3 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 53 | 豚肉 4 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 54 | 豚肉 4 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 55 | 豚肉 5 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 56 | 豚肉 5 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 57 | 豚肉 6 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 58 | 豚肉 6 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 59 | 豚肉 7 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 60 | 豚肉 7 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 61 | 豚肉 8 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 62 | 豚肉 8 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 63 | 豚肉 9 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 64 | 豚肉 9 | 国産 | 1/2c | 2012 |

表 2. 2012 年 4 月から 2013 年 3 月までに発生したリステリア症集団事例

| 国名 | 発生時期 | 原因食品 | 患者数 | 死者数 | 流産 |
|---------|-----------|----------|-----|-----|----|
| フィンランド | 2012.7 | 調査中 | 12 | 0 | 0 |
| USA | 2012.3~10 | イタリア産チーズ | 22 | 2 | 1 |
| オーストラリア | 2013.1~ | チーズ | 18 | 2 | 1 |

図 1. 国内産食品、輸入食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株の PFGE 解析



別添 1.

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析による *Listeria monocytogenes* の分子型別のための標準的プロトコール

はじめに

リステリア症の発症菌数は宿主の状態に依存しており、明確ではない。本菌に対して最も影響を受けやすいのは妊婦、新生児、免疫不全患者及び高齢者である。従って、*Listeria monocytogenes* の取り扱う実験に従事する者で、先に挙げた免疫機能が低下している状態の者は、特に気を付けて作業を行うこと。

PFGE プラグの調整方法

0 日目

前培養より分離したコロニーを、Brain Heart Infusion Agar (BHIA) 上に画線培養(高密度)する。培養株毎に保存用バイアルを作成することが推奨される。TSA, HIA 若しくは類似(同等)した培地の入ったスクリーキャップチューブへ画線培養に用いた白金耳を用いて穿刺する。本行程は、同菌株での再試験が必要になった際有用である。なお、菌の培養は 37°C にて 14~18 時間とする。

1 日目

1. 振とう用のウォーターバス(インキュベーター)を 54~55°C、静置用は 55~60°C に予め設定しておく。分光光度計もウォームアップさせておく(若しくは Dade Microscan Turbidity meter, bioMerieux Vitek colorimeter などの分光光度計)。

2. 以下に従い TE buffer (10 mM Tris : 1 mM EDTA, pH 8.0) を作成する。

10 mM of 1 M Tris, pH 8.0

2 mM of 0.5 M EDTA, pH 8.0

滅菌超純水を加えて 1000 ml に希釈する。

注意 : TE buffer はアガロースプラグ作成、細胞懸濁や溶解済み PFGE プラグの洗浄に用いる。

3. 以下に従い Lysozyme (Sigma L7651 等)の保存溶液 (20 mg/ml in TE) を作成する。

a. Lysozyme 100 mg を計量する。容器は氷上に置いておくこと。

b. TE buffer 5 ml を加え、チューブを回してまぜる。

c. 250 µl をエッペンドルフチューブに分注し、冷凍保存をする。

4. 以下に従い PFGE plug (1 % SeaKem Gold + 1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) in TE buffer) を作成する。

a. 20% SDS (GibcoBRL #15553-035) 保存溶液を 55~60°C のウォーターバスで温める。

b. 0.5 g (若しくは 0.25 g) の SeaKem Gold (SKG) アガロースを 250 ml のスクリーキャップフラスコに入れる。

c. 50 ml (若しくは 25.0 ml) の TE buffer を加え、アガロースが分散するよう静かに混ぜる。

d. キャップを緩めるか外しフラスコの口にラップを軽くのせ、電子レンジに 30 秒かけた後 10 秒間隔で加熱と攪拌をする。アガロースが完全に溶けるまで本行程を繰り返

す。

- e. 予め温めておいた 20 % SDS 保存溶液を 2.5 ml (若しくは 1.25 ml) 加え、回し混ぜる。
- f. フラスコを 55 ~ 60°C のウォーターバスに戻し、水温とアガロースの温度が同等になるまで 15 分 (若しくは使用するまで) 程度置いておく。

注意：電子レンジにかけた後のフラスコを扱う際は、遮熱性のあるグローブ等を着用すること。

ノート：SeaKem Gold アガロースは、溶解や洗浄などの行程における破損を最小限に抑えるため、PFGE プラグを作成する際によく用いられる。アガロースが完全に溶けるまでの時間や温度は使用する電子レンジによって異なるため、ラボごとにマニュアルを作ることが推奨される。

5. 小チューブ (12-mm×75-mm Falcon tubes など) にサンプル番号を記入する。
6. ラベル済のチューブに TE buffer 2 ml 程度分注しておく。ポリエステルファイバーまたは予め TE buffer でしめらせておいた綿棒で培養後のコロニーを掻きとり、チューブ内の TE buffer に懸濁させる。この時、エアロゾル発生を最小限にすることと細胞を均一に分散させるため綿棒をチューブ内で静かに回転させること。

ノート：細胞懸濁液の必要最小量は細胞濃度を測定する際に用いるキュベットやチューブサイズに依存するであろう。また、吸光度計や濁度計、測色計の製造元仕様に依存する。

7. 菌懸濁液の濃度を、TE buffer による希釈もしくは菌をさらに加える事により下記条件に調整する。
 - a. 分光光度計：波長 610 nm, 濁度 (OD)=1.00 (0.8 ~ 1.0 の範囲)
 - b. Dade Microscan Turbidity Meter : 0.40 ~ 0.45 (Falcon 2054 tube の場合)
0.58 ~ 0.63 (Falcon 2057 tube の場合)
 - c. bioMerieux Vitek colorimeter : ~ 透過率 17 ~ 18 % (Falcon 2054 の場合)

ノート：7a, 7b, 7c で示した濃度は、CDC において良好な結果を示した値である。ここで用いた機材やチューブと異なるツールを用いる場合は試験室ごとに最適な条件を検討すること。

プラグ調整

PFGE plug mold のウェルにサンプル番号を記載する。再利用可能な mold を用いる場合、mold 下方の一端にサンプル番号を記載する前にテープを貼って使用する。

ノート 1：使用しなかった plug アガロースは室温で保存でき、1-2 回は再利用が可能である。電子レンジの Low medium power で 10-15 秒加熱した後混和する作業を 5-10 秒の間隔で行い、アガロースを完全に溶かす。なお、本アガロースは溶解しやすい事に注意する。

ノート 2：Proteinase K 溶液 (20 mg/ml) は市販されている。もしくは、Proteinase K 保存溶液を作成すること (滅菌済みの超純水中に Proteinase K パウダーを溶かしたもの)。良い結果をもたらすために、小チューブに 300-500µl ずつ分注し、-20°C にて使用直前まで保管しておくことが望ましい。使用する際はサンプルの数に必要な本数のみを解凍し、氷上に置いておくこと。もし、使用している Proteinase K がパウダーを溶かして作成されたものである場合は、分注チューブは使いきりとし、使用後は破棄

すること。購入先より提供された手順に従い市販の Proteinase K 溶液を保存する。

1. 濃度調整済みの菌懸濁液 0.4 ml を番号表記した 1.5 ml マイクロチューブに移す。
2. 融解した Lysozyme 保存溶液 (20 mg/ml) より 20 μ l を加え、チューブを 55-60°C に 10-20 分温浴させ、静かに混ぜる。残った Lysozyme は捨てる。
3. Proteinase K (20 mg/ml) より 20 μ l を加え静かにピペッティングする。
4. 0.4 ml の菌懸濁液に溶解した 1 % SeaKem Gold アガロースを 400 μ l 加えゆっくりと 2-3 回ピペッティングし、菌懸濁液とアガロースを混ぜる。(温水にフラスコを置き、溶解したアガロースの温度を 55-60°C に保っておくこと)
5. 直ちに混合液を再利用可能な plug mold に分注する。泡ができないように注意すること。混合液から各サンプルにつき 2 つのプラグが作成でき、再試験が必要になった際に有用である。Plug が固まるまで室温にて 10 ~ 15 分若しくは 4°C で 5 分静置する。

ノート：使い捨ての plug mold を使用して 1% Seakem Gold アガロースのプラグを作成する場合は、調整済み菌液 200 μ l, Lysozyme (20 mg/ml) 10 μ l, Proteinase K (20 mg/ml) 10 μ l, アガロース 200 μ l の条件で作成する。なお、本条件では 4 つまでの plug が作成可能である。

ノート：不完全な細胞溶解を最小限にするため、細胞懸濁液の作成と後の plug キャスティングは可能な限り早く行うことが望ましい。もし、大量のサンプルを準備するなら一回に 10 サンプルまでを上限とし処理とする事を推奨する。続けてサンプルを処理したい場合は、一回目の 10 サンプルの処理過程が cell lysis incubation に入ってから順次行うこと。ただし、溶解と洗浄の過程は全サンプル同時に行うことが可能である。追加の溶解時間は一番最初に処理したサンプルにとって悪影響を及ぼさない。

アガロースプラグ内での溶菌

ノート：再利用可能な plug mold で作成した場合は 2 つ、使い捨ての plug mold で作成した場合は 3 ~ 4 つの plug を同じ 50 ml チューブ中で溶解する。

1. ポリプロピレン製の 50 ml チューブにサンプル番号を記載する。
2. 以下に従い Cell Lysis Buffer (50 mM Tris : 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1 % Sarcosyl)
1 M Tris (pH 8.0) : 25 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0) : 50 ml
10 % Sarcosyl : 50 ml
500 ml になるまで滅菌済み超純水を加える
3. 必要な細胞溶解液 / Proteinase K buffer 容量の計算
 - a. 1 チューブにつき 5 ml の細胞溶解液 (50 mM Tris : 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1 % Sarcosyl) が必要
 - b. 上記の細胞溶解液 1 チューブにつき 25 μ l の Proteinase K 保存溶液 (20 mg/ml) (例 : 25 μ l \times 10 チューブで 250 μ l)
 - c. 正しい容量の細胞溶解液と Proteinase K を適当な大きさのテストチューブもしくはフラスコ内で混合し、master mix とする。

ノート：細胞溶解液内の Proteinase K の最終濃度は 0.1 mg/ml とし、菌懸濁液へと加えられる濃度とは異なる (0.5 mg/ml)。

4. それぞれのラベルされた 50 ml tube に 5 ml の Proteinase K/細胞溶解液を加える。
5. plug の上端よりはみ出た部分を小型のスパチュラ・カミソリ等を持ちて除去する。再利用可能なプラグモールドを開け、6 mm 幅のスパチュラを用いて該当するサンプルチューブに移す。使い捨ての plug mold を使用している場合は、mold 底の白いテープをはがし plug を該当するチューブに押し出す。Plug が buffer 内にあり、チューブ側面についていないことを確認する。

ノート：余分なアガロース、plug mold やスパチュラなどは汚染されているため廃棄するか、適切に消毒すること。

6. 再利用可能な mold からテープを取り除く。使用した plug mold の両面、スパチュラ、メスは洗浄前に 70%イソプロパノール (IPA)、エタノール若しくは他の適した消毒液に 15 分程浸す。使い捨ての plug mold は破棄するか、10%の漂白剤に 30-60 分浸してから洗浄し再利用する。
7. チューブを 54-55°Cの振とう温槽もしくは振とう機能(150-175 rpm)のあるインキュベーターにて 2 時間インキュベートする。もし、温槽での溶解を行う場合温槽水位はチューブ内の溶解 buffer より上にあること。
8. 十分な量の滅菌超純水を 54-55°Cで予め温めておき、10-15 ml の超純水で plug を 2 回洗浄する(10 チューブで 200-250 ml の超純水を使用)。

溶菌後のアガロースプラグの洗浄

ノート：多くのラボでは、54-55°Cでの plug 洗浄において、plug の破損はないかと思われる。しかし、plug のふちに切れ目やギザギザが見つけれられた場合は、以下に示す洗浄工程での温度(インキュベーター若しくは温槽)を 50°Cに下げる必要がある。

1. チューブを温槽若しくはインキュベーターから取出し溶解 buffer を注意深く適した廃棄容器に破棄する。Plug はチューブ内に残るようにふりキャップまたはスパチュラ等で押さえる。

ノート：すべての液体を除去するため、このステップと続く洗浄工程でチューブ若しくはふりキャップのふちを吸水性のペーパータオルにつけること。

2. 予め 54-55°Cに温めておいた滅菌済み超純水を 10-15 ml 各チューブに加え、同温度で振とうしながら 10-15 分インキュベートする。
3. チューブ内の水を捨て、予温した水を用いた洗浄工程(Step2)を再度行う。
 - a. 滅菌済み TE Buffer (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH8.0)10-15 ml をチューブに加え 4 回洗浄するため、最後の水での洗浄開始後に 54-55°Cの温槽で十分量を予温しておくこと。(チューブ 10 本だと約 300-350 ml の TE buffer を使用)。
4. チューブ内の水を捨て、予温しておいた TE Buffer を 10-15 ml 加えた後 54-55°Cの温槽またはインキュベーターで 10-15 分洗浄する。

5. チューブ内の TE を捨て、予温しておいた TE を加えて洗浄工程をあと 3 回繰り返す。
6. チューブ内の TE を捨て、5-10 ml の滅菌済み TE を加える。“Restriction Digestion”の step1 に進むか、そうでない場合は使用するまで Plug を TE buffer に浸し 4°C で保存する。保存する際は、plug をマイクロチューブに移しても良い。

ノート：制限酵素反応を同日に行う場合は、次の“Restriction Digestion”の step1-3 を TE buffer 洗浄（最終回）までに準備していること。

アガロースプラグの制限酵素処理

ノート：plug スライスを小さくしたもので、1 つの完全な plug（使い捨て plug mold で作成したもの）でも制限酵素による消化ができる。制限酵素処理を行う際は、plug を小さくしたものを使用することが勧められる。使用する酵素の量が少なく済むうえ、残りの plug は *Ascl* のような他の制限酵素処理を行うこととなった場合に使用できるためである。第二の制限酵素 (*Ascl*) を用いた解析は、第一制限酵素処理されたサンプルから 2 つ以上の株の区別ができない場合に重要である。第二制限酵素の使用は、これらの酵素を用いた PFGE パターンの区別がつけられなかった場合でも、近縁性を決定するために有用である。

1. 1.5 ml のチューブにサンプル番号を記載する；ラベル 3(10-well ゲルの場合)もしくはラベル 4(13-well ゲルの場合)のチューブは、*Salmonella ser. Braenderup H9812* スタンダード株とすること。
 - a. Optional Pre-Restriction Incubation Step: 10×の制限 Buffer(New EnglandBioLabs または同等のもの)を 1:10 の割合で滅菌済み超純水を用いて希釈し、master mix とする。

| 試薬 | μl/1 プラグ | μl/10 プラグ | μl/15 プラグ |
|-----------|----------|-----------|-----------|
| 滅菌超純水 | 180 μl | 1800 μl | 2700 μl |
| 制限酵素バッファー | 20 μl | 200 μl | 300 μl |
| 合計 | 200 μl | 2000 μl | 3000 μl |

- b. 希釈済みの制限 buffer (1×) 200 μl をラベルした 1.5 ml チューブに分注する。
- c. TE から plug を注意深くスパチュラ等で取出し使い捨てのペトリ皿もしくは大きいスライドグラスに乗せる。
- d. 各サンプル及び適した数の *S. ser. Braenderup H9812* マーカー株の plug を片刃のカミソリ、メス等を用いて幅 2.0-2.5 mm に切り、希釈済みの制限 buffer が入ったチューブに移す。Plug が buffer に浸かっていることを確認する。残りのプラグは 5 ml の TE が入ったもとのチューブに入れ、4°C にて保存する。

ノート：Plug の形やサイズは使用するコーム歯によって異なる。PlusNet では扱いやすさや解析時の鮮明さより、5 mm よりも 10 mm 幅の太いコーム歯を推奨する。

Plug から切り出すことのできるスライスの数は実験者の技術と経験、plug の品質、スライスが縦または横で切り出されたかによる（使い捨て plug mold で作成した場合）。

- e. マーカー株 *S. ser. Braenderup H9812* の plug より 2 mm 幅のスライスを 3 ~ 4 つ切り出し希釈した buffer が入った tube に移す。Plug が buffer の中に有るかを確認する。残りの plug を 5 ml TE buffer の入ったもとの tube に戻す。4°C で保存。
- f. サンプル及び control の plug スライスを 25°C (*Apal*) または 37°C (*Ascl*, *Xbal*) の温槽にて 5 ~ 10 分または室温で 10 ~ 15 分インキュベートする。
- g. インキュベーション後 200 ~ 250 μ l のチップがついたピペットで plug スライス of buffer を全て取り除く。ピペット操作中にチップで plug やスライスを傷つけない・吸い出さないように注意する。

2. 10×制限酵素 buffer を 9 倍量の滅菌超純水で希釈し、*Apal* (25 U/sample) または *Ascl* (25 U/sample) を下記の table に従って加える。これを制限酵素 master mix とする。

| 試薬 | μ l/1 プラグ | μ l/10 プラグ | μ l/15 プラグ |
|----------------------------|---------------|----------------|----------------|
| 滅菌超純水 | 175.5 μ l | 1755 μ l | 2632.5 μ l |
| 制限酵素バッファー | 20 μ l | 200 μ l | 300 μ l |
| BSA | 2 μ l | 20 μ l | 30 μ l |
| <i>Apal</i> (10U/ μ l) | 2.5 μ l | 25 μ l | 37.5 μ l |
| 合計 | 200 μ l | 2000 μ l | 3000 μ l |

| 試薬 | μ l/1 プラグ | μ l/10 プラグ | μ l/15 プラグ |
|----------------------------|---------------|----------------|----------------|
| 滅菌超純水 | 175.5 μ l | 1755 μ l | 2632.5 μ l |
| 制限酵素バッファー | 20 μ l | 200 μ l | 300 μ l |
| BSA | 2 μ l | 20 μ l | 30 μ l |
| <i>Ascl</i> (10U/ μ l) | 2.5 μ l | 25 μ l | 37.5 μ l |
| 合計 | 200 μ l | 2000 μ l | 3000 μ l |

ノート：制限酵素の入った溶液は、常時氷上もしくは-20°C 保持ボックスにて使用する。

3. 制限酵素混合液を 200 μ l 分注する。フタを閉め Plug スライスが酵素溶液につかるように静かにタッピングする。
4. サンプルとスタンダード plug スライスを 2 ~ 3 時間温浴中で制限酵素に適した温度でインキュベートする。
 - a. *Apal* の場合 25°C。
 - b. *Ascl* と *Xbal* の場合 37°C。
5. もし plug スライスを well に配置する場合(option B, Page 9)制限酵素処理された PFGE plug を配置する最低でも 30 分前にはゲルが固まるようにする為、制限酵素反応が終わる約 1 時間前には次のセクションのステップ 1-4 (CASTING AGAROSE GEL)に進む。

アガロースゲルのセット

A. コームに制限酵素処理した plug スライスを配置する。

1. 温槽が 55-60°C になっていることを確認する。
2. 下記の何れか表に従って、0.5×の Tris-Borate-EDTA Buffer (TBE) を作製する。

5×TBE

| 試薬 | 容量(ml) | | | | | |
|-------------|--------|------|------|------|------|------|
| 5×TBE | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| 超純水 | 1800 | 1890 | 1980 | 2070 | 2160 | 2250 |
| 0.5×TBE の総量 | 2000 | 2100 | 2200 | 2300 | 2400 | 2500 |

10×TBE

| 試薬 | 容量(ml) | | | | | |
|-------------|--------|------|------|------|------|------|
| 10×TBE | 100 | 105 | 110 | 115 | 120 | 125 |
| 超純水 | 1900 | 1995 | 2090 | 2185 | 2280 | 2375 |
| 0.5×TBE の総量 | 2000 | 2100 | 2200 | 2300 | 2400 | 2500 |

3. 以下に従い、0.5×TBE にて 1% SeaKEM Gold アガロースを作成する。
 - a. 500ml フラスコに計量済みの SKG を入れる。
 - b. 適した量の 0.5×TBE を加え、静かに回転攪拌する。
 - c. フラスコの口にラップを軽くのせ、電子レンジで 15 秒間隔で 60 秒加熱した後静かに攪拌する。アガロースが完全に溶けるまで本行程を繰り返す。
 - d. フラスコにフタをして 55-60°C の温槽に戻し、アガロースと湯の温度が平衡に達するまで 15 分程または使用するまで静置する。
 - ・ 100ml の 0.5×TBE と 1.0g のアガロースを混ぜた場合、14cm 幅のゲルができる。(10 もしくは 15 のウェル)
 - ・ 150ml の 0.5×TBE と 1.5g のアガロースを混ぜた場合、21cm 幅のゲルができる。(15 以上のウェル)

Safety Warning : 電子レンジをかけた後のフラスコを扱う際は、遮熱性グローブを使用する。

4. 少量(2-5 ml)の溶解済み且つ 55-60°C に冷やされた 1% SKG アガロースは plug が配置されたウェルのシールに用いられる。

250ml のフラスコにアガロース 0.5g と 50ml の 0.5×TBE を入れ、前述の手順で溶解する。使用しなかった SKG アガロースは室温保存ができ、溶かして複数回再利用ができる。再利用する時は、電子レンジ 15-20 秒加熱し混ぜる。10 秒間のインターバルをおきアガロースが完全に溶けるまで本行程を繰り返す。55-60°C の温槽で使用するまで静置する。もしくは gel を作るのに使った溶解アガロースから 5ml を取り、55-60°C の温槽で使用するまで静置する。

NOTE : ゲルフォームをそのままテーブルに置き、完全に水平になるまで調整する。ゲルフレームの表面(小さい金属ネジがついている面)と歯が下向きになるようにコームホルダを置く。コーム歯がゲルプラットフォームに触れるようにする。

5. 37°Cのウォーターバスから制限酵素処理された plug を取り出す。制限酵素と buffer の混合液を取り除き、200 μ l の 0.5×TBE を加えて室温で 5 分間 incubate する。
6. tube から plug を取出し、コームを台上に置いて以下に従いコーム下方の歯部分にスライスを乗せる。
 - a. 10-well ゲルの場合、*S. ser. Braenderup* H9812 スタンダード株は 1,5,10 レーンに置き、15-well ゲルの場合は 1,5,10,15 レーンに置く。
 - b. 他のサンプルは残ったコーム歯に各々置く。
7. 余分な buffer をティッシュ等でふき取る。そのまま plug スライスを 3~5 分風乾させるか、1% SKG (55–60°C) でシールする。
8. コームをゲル台にセットし、プラグ片がコーム歯の下に並んでいることを確認する。気泡が入っていないことを確認する(風乾したのであれば)。
9. ゲルフォームにゆっくりとアガロースを注ぐ(55–60°C)。
10. 電気泳動チャンバーにゲル板を設置する。2–2.2 L の調整した 0.5×TBE を加え、ふたを閉める。なお、buffer の必要量は前回実施した泳動の後に残った buffer が管に残ったままか否かで変わる。
11. 電源を入れ、循環ポンプ及び冷却装置 (14°C に設定) を作動させる。1L/分の流量にするには、70 程度にセットする。
12. 30–45 分後、固まったゲルからコームを抜きとる。
13. well を 55–60°C の 1% SKG で満たす(必要であれば)。ゲルフォームからネジを緩め、フォームを解体する。ティッシュでキャスティングプラットフォームの両端及び裏側の余分なアガロースを除く。ゲルをキャスティングプラットフォームに置いたまま泳動槽のゲルフレーム内に静かに置く。泳動槽のカバーを閉める。

制限酵素処理後のプラグ断片のウェルへの:

1. 7, 8 ページ(Loading Restricted Plug Slices on the Comb)中 Option A ステップ 1-4 を参照のこと。

ノート : ゲルフォームを高さ調整可能なテーブルに置き、完全に水平になるまで調整する。ゲルフレームの表面(小さい金属ネジがついている面)と歯が下向きになるようにコームホルダを置く。コーム歯がゲルプラットフォームの表面から 2 mm 上にあることを確認する。

2. 15–20 分間 55–60°C の温層で冷ましておいた SKG アガロースを注意深くゲルフォームに流し込む。この時泡ができないようにすること。
3. 電気泳動チャンバーにゲル板を設置する。2–2.2 L の新鮮な 0.5×TBE を加え、ふたを閉める。なお、buffer の必要量は前回実施した泳動の後に残った buffer が管に残ったままか否かで変わる。
4. 電源を入れ、循環ポンプ(流速 1 L/分にするため 70 にセットする)及び冷却装置 (14°C に設定) を作動させる。泳動を開始するまで約 30 分チャンバー内にて buffer を循環させる。

5. 制限酵素処理済みの plug slice を 37°C の温槽から引き上げる。酵素を含む buffer を除去したのち 200 μ l の 0.5 \times TBE を加え、室温で 5 分インキュベートする。
6. ゲルフォームに流しておいたゲルが固まったのを確認し(流してから少なくとも 30 分後)、コームを抜き取る。
7. 先細のスパチュラを用いて、plug slice をゲルの well に挿入する。スパチュラの幅広い端でプラグをそっと well の底と前面に押し付ける。スパチュラを用いて泡ができないように注意しながら位置を調整する。
 - a. 10-well ゲルの場合、*S. ser. Braenderup H9812* スタンダード株は 1,5,10 レーンに置き、15-well ゲルの場合は 1,5,10,15 レーンに置く。
 - b. 他のサンプルは残ったコーム歯に各々置く。

ノート : plug スライスの設置方法は様々で、各々でレーンがまっすぐかつバンドがシャープになるような plug スライスの置き方を開発すること。

8. 55–60°C の温槽で冷ましておいた 1% SKG アガロースで well を満たす。固まるまで 3~5 分待つ。ゲルフォームのねじを外し、casting platform 側面や下方についた余分なアガロースをティッシュなどで除去する。ゲルをキャスティングプラットフォームに置いたまま泳動槽のゲルフレーム内に静かに置く。チャンバーのフタを閉じる。

電気泳動条件

- 1a. *Listeria monocytogenes* を *Apal*, *Ascl* にて制限酵素処理し、CHEF Mapper を用いて泳動する場合は以下の条件で実施すること。

Auto Algorithm

49 Kb – low MW

450 Kb – high MW

特に記載がない限り enter ボタンを押し、初期設定値を選択する。

Initial switch time = 4.0 s

Final switch time = 40.0 s

Change run time to 18 – 19 h (下記のノートを参照)

- 1b. CHEF-DR III を使用する場合は以下の通り。

Initial switch time = 4.0 s

Final switch time = 40.0 s

Voltage : 6 V

Included Angle : 120°

Run time : 18 – 19 h (下記ノートを参照)

- 1c. CHEF-DR II を使用する場合は以下の通り。

Initial switch time = 4.0 s

Final switch time = 40.0 s

Start ratio : 1.0 (if applicable)

Voltage : 200 V

Run time : 19 – 20 h (下記ノートを参照)

ノート：電気泳動の時間は、CDC で用いられている機器及び試薬に基づいている。泳動時間は各ラボ間で違いがあるので、*S. ser. Braenderup H9812* スタンダード株の一番下方のバンドがゲルの下から 1~1.5 cm になるように泳動時間を最適化する必要がある。

ノート：mA 初期値をメモしておく。初期の mA 値は 110~170 mA のはずである。この範囲から外れることは 0.5×TBE buffer が不適切に作成された事を意味するので、再度作りなおす必要がある。

2 日目

PFGE アガロースゲルの染色と画像取り込み

1. 電気泳動が終了したら泳動槽の電源を切り、ゲルはエチジウムブロマイドで染色する。40 µl のエチジウムブロマイド保存溶液(10 mg/ml)を 400 ml の水(試薬調整レベル)で希釈する。本分量は 14-cm×24-cm サイズのコンテナ用であり、もっと大きなコンテナではさらに多くの染色液が必要となる。ゲルを染色溶液中で 20-30 分染色する。その際、コンテナにはフタをすること。

ノート：エチジウムブロマイドは毒性があり、変異原物質である。エチジウムブロマイド(EtBr)保存溶液(10 mg/ml)は、さまざまな工業会社より入手できる(Amresco X328; Bio-Rad, 161-0433; Sigma, E-1510)。希釈した染色溶液は遮光容器で保存し、6-8 回は再利用が可能である。また、廃棄する際は各施設の有害廃棄物処理ガイドラインに準じて処理すること。CDC は排水に EtBr を捨てることを推奨していない。EtBr を含む水溶液は木炭を通してろ過できる。または、活性炭素脱染、amresco(E732-25 脱染バッグ)か他の会社より販売されている tea pack で分解できる。EtBr が除かれたら、その水溶液は流し等に廃棄可能である。EtBr について質問等がある場合は、MSDS を参照のこと。

2. 染色後、ゲルを 500 ml の試薬調整グレードの水で脱染する。60~90 分の脱色の間、20 分おきに水の交換をすること。画像の撮影は、Gel Doc 1000, 2000, EQ, XR 若しくは同等の他ドキュメンテーションシステムにて行うこと。ゲルの背景が濃く検出された場合は、さらに 20-30 分脱色を行う。

ノート：もしデジタルイメージと写真の両方が必要な場合は、デジタルイメージより先に写真を撮ること。

3. 画像機器の説明書に従いゲルの画像を .img もしくは .lscfile 形式で保存する。BioNumerics software program を用いて解析用にこの file を .tif 形式に変換する。ゲルの全体像は画像機器のスクリーンいっぱいに移すこと。画像はピントがあっていて、バンドの鮮度が飽和しすぎているか確認する。追加の使用説明は PlusNet9a/9c マニュアルの PNL07 にある。
4. チャンバー内の buffer を捨てる。2 L の試薬調整グレードの水でチャンバーをリンスする。しばらくの間ユニットを使用しないのであれば、チャンバーとホースから水を抜く前に pump run を