

(別添1)

24 - 48 時間で実施可能な、標準化された PFGE による *Listeria monocytogenes* の分子型別法

[1] 寒天培養からの PFGE プラグの調製

* 微生物危害への注意：リステリア症の感染菌量は確定しておらず、部分的には宿主の感受性によって異なる。ハイリスクグループは妊婦、新生児、免疫抑制疾患の患者と年長者である。そこで、本菌を扱う実験者、特にリスクのあるものは、感染の可能性に注意し、この微生物を用いる際には注意を喚起されなければならない。

試験開始前に、この試験法を全文読むこと。菌液やプラグに接触したすべてのプラスチック製品、ガラス製品、ピペット、ヘラなどは汚染物質として扱い、廃棄またはその研究所のガイドラインに従って除染すること。再利用可能なプラグモールドは、洗う前に除染すること。使い捨てモールドは、テープやプラグをウェルから押し出すタブも含めて汚染されており、洗って再利用するならば 10%の漂白剤で少なくとも 30 分除染しなくてはならない。

0 日目：試験培養から分離した集落を BHI 寒天平板に画線し、十分な培養を得る。培養ごとに保存バイアルを作製することを推奨する。TSA か HIA または同様の培地を入れたスクリーキャップの小チューブのスタブを作成し、平板に菌を植えたものと同じ白金耳で撮取する。この操作により、必要に応じて同じ集落の再試験を行うことができる。37 で 13 - 18 時間培養する。

1 日目：

- 1 . 振盪培養器つき温浴槽またはふらん器(54-55)、静置式温浴槽 (55 - 60) と分光光度計のスイッチを入れる。
- 2 . TE バッファーを用意する。
(TE バッファーは、プラグ用あがろーすの作成、菌液の懸濁、溶解プラグの洗浄に用いられる。)
- 3 . Lysozume(Sigma L7651 か同等品)ストック液 (20mg/ml in TE) を用意する。
- 4 . プラグ作成のため、1% SeaKem Gold agarose + 1%SDS を T10E1 に入れたものを用意する。

* 安全上の注意：電子レンジ後の熱いフラスコを取り扱うときには、耐熱手袋を使用する。

注：SeaKem Gold agarose は、プラグの溶解や洗浄ステップでの崩壊を最小限にしうる強度を付与するため、PFGE プラグの作成に好都合である。アガロース溶解は完全でなくてはならず、その温度と時間は使用する電子レンジによって異なり、各試験所で決めなければならない。

- 5 . 小試験管に培養番号をラベルする。
- 6 . 5 の試験管に、2ml 以内の TE バッファーを移す。滅菌ポリエステル線維か滅菌 TE で湿らせた綿スワブを用いて、寒天平板から菌を取り、菌が十分に溶け、気泡発生が最小限になるように静かに回転させて TE に溶かす。

注：必要な菌液量は、菌濃度を測るキュベットや試験管の容量、使用する分光光度計や濁度計に依存する。

- 7 . 菌液濃度を下記に示す値に調整する。
 - a. 分光光度計：610nm 波長で、吸光度 1.00 (0.8-1.0 の範囲)
 - b. Dade Microscan Turbidity Meter：0.4-0.45(Falcon2054), 0.58-0.63(Falcon 2057)
 - c. ビオメリュー Vitek 可視光計：17～18%以内(Falcon2054)

注：上記の値は、CDC でよい結果が得られたものであり、機器や試験管が異なれば、それぞれの研究所でよい結果を得られる別の適した濃度を設定する必要がある。

プラグ作成

培養番号で PFGE プラグモールドの各ウェルをラベルする。プラグモールドを再利用する場合には、以前のラベルの上にテープを貼る。

注1：未使用のプラグ用アガロースは室温に保存し、1 - 2 回再利用する。弱 中出力で 10 - 15 分間電子レンジにかけ、混和する。5 - 10 秒間隔で繰り返し、アガロースを完全に溶解する。このステップは迅速に行う。

注2：ProteinaseK 溶液(20mg/ml)は市販されている。変法として、粉末と滅菌超純水から作成することもできる。小試験管に 300 - 500 μ l ずつ分注し使用まで 20 に保存するのが最も良い結果が得られる。使用直前に、必要数のチューブを溶かし、溶液は水中に保存する。粉末から調整した場合、作業日の終わりに溶解した液をすべて廃棄する。市販の溶液は、販売者の指示に従って保存する。

- 1 . 400 μ l の調整菌液を、ラベルした 1.5ml の遠心チューブに移す。

2. 20 μ l の溶解した Lysozyme ストック液を各チューブに入れ、静かに混ぜる。10 - 20 分間 55 - 60 に温浴する。使わなかった溶解 Lysozyme 液は廃棄する。
3. 20 μ l の溶解した Proteinase K 溶液を各チューブに入れ、ピペットで静かに混ぜる。(10 の菌液に 200 μ l 必要となる。)
4. 400 μ l の溶解した 1% SeaKem Gold agarose 液を 0.4 ml の菌液に入れ、ピペットで 2 - 3 回静かに混ぜる。温水 (55 - 60) の入ったビーカー中にフラスコを保持し、アガロースが溶解したままの温度を保つ。
5. ただちに、プラグモールドのウェルに混合液を分注する。気泡が発生してはならない。各サンプルに 2 つのプラグが作成でき、再試験が必要な時に有益である。室温で 10 - 15 分間プラグを固まらせる。冷蔵庫 (4) で 5 分静置してもよい。

注：もしディスポモールドを使用するならば、200 μ l の菌液、10 μ l の lysozyme、10 μ l の ProteinaseK、200 μ l のアガロースを用い、4 つのプラグを作成することができる。

注：菌液調整とプラグの作成は、菌の不要な溶解を最小限にするために、素早く行わなくてはならない。もし数多くのサンプルを調整する場合は、一度に 10 以内のバッチを処理することを推奨する。最初のバッチが溶菌段階に入ったら、次のグループを開始する。最初のバッチの溶解時間が長くなっても結果には影響を与えないので、すべてのバッチを溶解しおえてから、洗浄は一緒に行ってよい。

アガロースプラグ内での溶菌

注：同じ菌株由来の 2 プラグ (再利用可能なプラグモールド) または 3 - 4 プラグ (ディスポモールド) は、同じ 50ml チューブ内で溶菌してよい。

1. 50ml チューブに菌番号をラベルする。
2. 溶菌バッファーを調整する。
3. 溶菌/ProteinaseK 溶液の必要量を計算する。
 - a. チューブあたり 5ml の溶菌バッファーが必要となる。
 - b. チューブあたり 25 μ l の ProteinaseK 溶液が必要となる。
 - c. 溶菌バッファーと ProteinaseK 溶液の正確な量を測り、マスターミックスを調整してよく混和する。

注: 溶菌液中の ProteinaseK の終濃度は 0.1mg/ml であり、菌懸濁液に加える濃度 (0.5mg/ml) とは異なる。

4. ラベルした 50ml チューブそれぞれに 5ml の溶菌/ProteinaseK 溶液を入れる。
5. プラグの上にはみ出たアガロースをメス、剃刀の刃などで切り取る。再利用可能なプ

ラグモールドを開き、プラグを 6 mm幅のへらでラベルしたチューブに移す。ディスボモールドの場合は、底からテープを取り外し、ラベルされたチューブ内にプラグを落とし込む。プラグが確実にバッファーの中に入り、チューブの壁面につかないようにすること。

注：切り取ったプラグ、モールド、へらなどは汚染されているので、廃棄するか適切な方法で除染すること。

6. 再利用可能なモールドからテープを除去する。モールドの両面、へら、メスを 70%イソプロパノールかエタノールまたはその他の適した除染剤に浸す。洗浄前に 15 分は浸漬する。ディスボモールドは廃棄するか、10%漂白剤で 30 - 60 分浸してから洗浄、再利用する。

7. チューブをラックに入れ、54 - 55 の振盪恒温槽またはふらん器で 2 時間振盪する(150 - 175rpm)。溶解を恒温水槽で行う場合、水面が溶菌バッファーの水面よりも上になるようにする。

8. あらかじめ 54 - 55 に温めた超純水を用い、プラグを 10 - 15ml の超純水で 2 回洗浄する。

溶菌後のアガロースプラグの洗浄

注：多くの実験室では、54 から 55 での以下の洗浄ステップに耐えうる強度のプラグを作っている。しかし、もし角が欠けていたり壊れていた場合には、洗浄ステップの温度を 50 以下にする必要がある。

1. チューブを恒温槽から取り出し、溶菌バッファーを注意深く適した廃棄容器に捨てる。スクリーンキャップかへらを使い、プラグがチューブ内に残るようにする。

注：この操作及び続く操作で、チューブやスクリーンキャップの端をペーパータオルで押さえ、液体をすべて取り除くことが重要である。

2. 54 - 55 に予熱した 10 - 15ml の滅菌超純水を加え、54 - 55 で 10 - 15 分振盪する。

3. 水を取り除き、洗浄ステップを再度繰り返す。

- a. TE バッファーを 54 - 55 に予熱しておくこと。水での洗浄終了後すぐに 10 - 15ml の TE バッファーで 4 回洗浄する。

4. 水を廃棄し、10 - 15ml の予熱した滅菌 TE バッファーを加える。54 - 55 で 10 - 15

分振盪する。

5. TE を廃棄し、さらに 3 回洗浄を繰り返す。

6. 最後の洗浄液を捨て、5 - 10ml の滅菌 TE を加える。「制限酵素による切断」の章のステップ 1 を行うか、TE バッファー中でプラグを使用するまで 4 に保存する。保存するプラグは小チューブに移してもよい。

注：もし制限酵素による切断を同日に行うなら、次章のステップ 1 から 3 は最後まで実施する。最後の TE での洗浄の後は、使用時まで保存できる。

アガロースプラグ中での DNA の制限酵素による切断

注：プラグの小片または全体（ディスポモールドでつくられたもの）は制限酵素で切断可能である。制限酵素の必要量が少なく済み、また、残りをほかの酵素（AscI など）での切断に使用できるため、プラグ小片の制限酵素切断を推奨する。第 2 の酵素による切断解析は、第 1 の酵素による PFGE パターンで 2 つまたはそれ以上の株の区別ができない場合に有効である。第 2 の酵素の使用は、区別できない PFGE パターンを示す株の確認に有効である。

1. 1.5ml のエッペンチューブに菌番号をラベルする。3 本（10 ウェルのゲルの場合）または 4 本（14 ウェルのゲルの場合）のチューブを、Salmonella Braenderup H9812（スタンダード）用にラベルする。

a. 制限酵素切断前の任意のステップ：10 倍の制限酵素バッファーを 1：10 の滅菌蒸留水で、以下のように希釈しマスターミックスを作る。

- b. 200 μ l の 1 倍制限酵素バッファーをラベルしたチューブに入れる。
- c. 注意深くプラグを TE バッファーからヘラでディスポシャーレに入れる。
- d. 各サンプルと必要数のスタンダードについて、2 - 2.5 mm 幅の小片を切り出し、制限酵素バッファーの入ったチューブに加える。プラグ小片がバッファーの中に浸っていることを確認する。プラグの残りは元のチューブに戻し、4 に保管する。

注：プラグのサイズと形は、コームの歯のサイズによって異なる。パルスネットでは、コンピューター解析がより正確になり、より小さい歯（5.5 mm）のコームを用いた場合よりシャープな結果が得られやすいため、大きい歯の（10 mm 幅）コームを推奨する。プラグから

切り出せる小片の数は、実施者の技術と経験、プラグの出来、小片を水平にカットするか垂直にカットするか（ディスポモールドの場合）による。

- e. S. Braenderup H9812 のプラグから 2mm 幅の小片 3 - 4 個を切り出し、希釈されたバッファーを含むチューブに移す。プラグ小片がバッファーに完全に浸っているよう注意する。プラグの残りは、5ml の TE バッファーが入った元のチューブに戻し、4℃ に保管する。
- f. 検体とコントロールのプラグ小片を 25℃（ApaI の場合）または 37℃（AscI と XbaI の場合）の恒温水槽に入れて 5 - 10 分、又は室温で 10 - 15 分培養する。
- g. その後、バッファーをプラグ小片からピペットを用いて取り除く。ピペットでプラグを傷つけたり、チップに吸い込んだりしないよう気を付ける。

2. 制限酵素マスターミックスを、10 倍制限酵素バッファーを滅菌蒸留水で希釈したのを用い、ApaI(50U/sample)または AscI(40U/sample)を下記の表に従って加えて、作成する。バッファー希釈に用いたのと同じチューブ内で混和する。

注：制限酵素のチューブは、常時氷中か低温コンテナ（-20℃）に保持すること。

3. 各チューブに 200 μl の制限酵素ミックスを加える。チューブのふたを閉じ、静かにたたいて混和する。プラグ小片が必ず液中にあるように注意する。

4. サンプルとスタンダードの小片を酵素の種類に適した温度で 2 - 3 時間培養する。

- a. ApaI の場合は 25℃。
- b. AscI または XbaI の場合は 37℃。

5. プラグ小片をウェルに入れる場合は、制限酵素切断反応が終わる 1 時間前に、次章（アガロースゲルのキャスト）のステップ 1 - 4 を続け、PFGE プラグを乗せるより少なくとも 30 分前にゲルが固まっているようにする。

アガロースゲルのキャスト

A. 制限酵素切断されたプラグ小片をコームに乗せる方法

1. 恒温水槽が 55 - 60℃ になっていることを確認する。
2. ゲルと泳道バッファーに必要な量の 0.5 倍の TBE バッファー を作成する。
3. 1%SeaKem Gold アガロースを、0.5 倍の TBE バッファー を用いて下記のように作成する。
 - a. 500ml のフラスコに必要な量のアガロースを秤量する。
 - b. 必要量の 0.5 倍の TBE バッファー を加え、静かに混和する。

- c. キャップを緩めるか、取り除いてラップをふわりと掛け、電子レンジで 60 秒加熱し、静かに混ぜる。アガロースが完全に溶けるまで、15 秒間隔で繰り返す。
- d. キャップを締め直し、55 - 60 の恒温水槽に入れ、15 分あるいは使うまで置いておく。

14 cm幅のゲル台（10 または 15 ウェル）には、1g のアガロースを 100ml のバッファーで溶かす。

21 cm幅のゲル台（15 以上のウェル）には、1.5g のアガロースを 150ml のバッファーで溶かす。

安全上の注意：電子レンジ後の熱いフラスコの取り扱いには、耐熱手袋を使用する。

4. 少量（2 - 5ml）の溶かして冷ました（55 - 60 ）1%アガロースを、プラグを乗せた後にウェルをふさぐのに用いる。上述のように、250ml のフラスコで 0.5g のアガロースを 50ml のバッファーで溶かしたものを用意する。残ったアガロースは室温に保存し、溶かして数回再利用できる。電子レンジに 15 - 20 秒かけ、混ぜるのを 10 秒間隔で完全に溶けるまで繰り返す。使用まで 55 - 60 の恒温水槽に置く。もしくは、ゲルの作成に用いたアガロースから 5ml 取り分けておき、使用まで 55 - 60 の恒温水槽においておく。

注：ゲル台を水平な作業台に置き、完全に水平になるように調節する。コームホルダーを正面（小さい金属スクリューのある側）に置き、歯をゲル枠の外に向け、コームの歯がゲル台に接触するようにする。

5. 制限酵素切断されたプラグ小片を恒温水槽からだし、酵素ミックスを除去する。200 μ l の 0.5 倍 TBE バッファーを加え、室温で 5 分培養する。
6. プラグ小片をチューブからだし、コームをキャビネット内に置き、コームの歯にプラグ小片を下記のように乗せる。
 - a. スタンドをレーン 1, 5, 10（10 ウェルの場合）またはレーン 1, 5, 10, 15（15 ウェルの場合）に乗せる。
 - b. サンプルを残りの歯に乗せる。
7. 余分なバッファーをティッシュで除去する。プラグ小片をコーム上で 3 - 5 分風乾させるか、55 - 60 の 1%アガロースでシールする。
8. コームをゲル台に設置し、プラグ小片が正確にコームの歯の底辺に並んでいることを確認する。プラグ小片の底辺が黒いゲル台底面に接しており、気泡がないようにす

- る。
- 9 . 注意深くゲル台にアガロース (55 - 60) を注ぐ。
 - 10 . 黒いゲルフレームを泳動槽に置く。調整したての 2 から 2.2L の 0.5 倍 TBE を注ぐ。カバーを閉じる。(バッファの必要量は、前回の泳動時のバッファがチューブ内に残っているかどうかで異なる。)
 - 11 . 電源装置、ポンプ、冷却装置 (14) をオンにする。(1L /分の流量を 70 までにする。)
 - 12 . 30 - 45 分後に固まったゲルからコームを抜き取る。
 - 13 . ゲルのウェルに、55 - 60 の 1%アガロースを満たす(任意)。ねじを外し、ゲル枠を台から外す。側面や底面に残った余分なアガロースをティッシュで取り除く。ゲルを台に乗せたまま、黒いゲルフレームに設置する。泳動槽のカバーを閉じる。

B. ウェルの中に制限酵素切断されたプラグを入れる方法

- 1 . A のステップ 1 - 4 を実施する。

注：ゲル台は水平な作業台に置き、ゲルを入れる前に完全に水平に調整する。コームホルダーを正面(小さい金属スクリューのある側)に置き、歯をゲルのボトムに向け、コームの歯の端がゲル台表面の 2 mm上になるようにする。

- 2 . 溶かした 1%アガロースを 55 - 60 の恒温水槽中で 15 - 20 分冷ます。アガロースを注意深く、コームをセットしたゲル台に注ぐ。気泡ができないよう気を付ける。

- 3 . 黒いゲルフレームを泳動槽に置く。調整したての 2 から 2.2L の 0.5 倍 TBE を注ぐ。カバーを閉じる。(バッファの必要量は、前回の泳動時のバッファがチューブ内に残っているかどうかで異なる。)

- 4 . 冷却装置 (14)、電源装置、ポンプ 1L /分の流量を 70 までにする)のスイッチを、泳動開始の約 30 分前にオンにする。

- 5 . 制限酵素切断されたプラグ小片を恒温水槽からだし、酵素ミックスを除去する。200 μ l の 0.5 倍 TBE バッファを加え、室温で 5 分培養する。

- 6 . コームを、少なくとも 30 分間固めたゲルから除去する。

- 7 . 制限酵素切断されたプラグを、ヘラの細かい先を用いてチューブからだし、ウェルに入れる。ヘラの広い先でプラグをそっと底に押し込み、ウェルの前面に寄せる。ヘラを操作し、気泡がないようにする。

- a. スタンダードをレーン 1, 5, 10 (10 ウェルの場合) またはレーン 1, 5, 10, 15 (15 ウェルの場合) に乗せる。
- b. サンプルを残りの歯に乗せる。

注：ゲル小片に乗せるのは、ゆっくりと操作してよい。各人は、ゲル小片をウェルに乗せるための技術を向上させれば、レーンがまっすぐになり、バンドがシャープな結果が得られる。

14. 8. ウェルに 55 - 60 の溶かした 1% アガロースを満たす。3 - 5 分固める。ねじを外し、ゲル枠を台から外す。側面や底面に残った余分なアガロースをティッシュで取り除く。ゲルを台に乗せたまま、黒いゲルフレームに設置する。泳動槽のカバーを閉じる。

電気泳動条件

- 1a. ApaI または AscI で切断された *L. monocytogenes* の CHEF Mapper での泳動には、下記の条件で実施する。

Auto Algorithm

49kb-low MW

450kb-high MW

Select default values except where noted by pressing "enter".

Initial Switch time=4.0s

Final switch time=40.0s

泳動時間は 18 - 19 時間に変更する

- 1b. CHEF-DRIII での泳動には、下記の条件で実施する。

Initial Switch time=4.0s

Final switch time=40.0s

Voltage: 6V

Included angle: 120°

Run time: 18-19h

- 1c. CHEF-DRII での泳動には、下記の条件で実施する。

Initial Switch time=4.0s

Final switch time=40.0s

Short ratio: 1.0

Voltage: 6V

Run time: 19-20h

注：上に推奨した泳動時間は CDC の機器及び試薬での結果に基づいている。泳動時間は試験所により異なり、それぞれのゲルで適正化されなければならない。スタンダードの最小バンドがゲルボトムから 1 - 1.5 cmの位置にくるようにすべきである。

注：機器の初めのmA を記録しておく。初期mA は、110 から 170mA の間でなくてはならない。この範囲を超えた場合には、0.5 倍 TBE バッファの作成が間違っており、バッファを作り直さなくてはならない。

2 日目

PFGE アガロースゲルの染色と画像化

1. 電気泳動が終了したら、機器の電源を切り、ゲルを除去して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ストック液 (10 mg/ml) を 400ml の純水で希釈する (この容量は、14×24 cmの染色槽向けである。より大きい容器には、より大量の染色液が必要となる。) ゲルを蓋をした容器内で 20 - 30 分染色する。

注：エチジウムブロマイドは有害で発がん性がある。10 mg/ml のストック液はいくつかの会社から市販されている。希釈された液は褐色ビン中で保存し、有害廃液に関するそれぞれの試験所のガイドラインに従って廃棄する前に 6 - 8 回使用できる。CDC はエチジウムブロマイドを排水に流すことは推奨しない。エチジウムブロマイドを含む水溶液は炭でろ過するか、活性炭を用いて分解するか、市販のエチジウムブロマイド除去製品を用いて処理する。除去されたのちは、水溶液を排水に流してもよい。エチジウムブロマイドについてさらに質問があれば、販売業者やメーカーの Material Safety Data Sheets を参照のこと。

2. 500ml の純水で 60 - 90 分ゲルを脱色する。20 分おきに水を取り換える。ゲルイメージを取り込む。バックグラウンドが高すぎる場合には、脱色をさらに 30 - 60 分行う。

注：もしデジタルイメージと通常の写真の両方がほしければ、デジタルイメージの前に写真を撮る。

3. イメージャーの指示に従い、イメージをセーブする。BioNumerics で解析するには、このファイルを tif に変換する。ゲルイメージは、全体像を保存し、ウェルや下部のバンドをカットしてはならない。イメージのピントが合っているように注意し、バンドの露光過剰によるサチュレーションがないようにする。詳細は PulseNet QA/QC マニュアルの PNL07 を参照のこと。

4. 泳動槽からバッファーを除去し、廃棄する。泳動槽を 2 L の純水ですすぐ。もし数日間使わないなら、5 - 10 分間ポンプで水を循環させ、それから廃棄する。

5. もしスタンダードの最小バンドがゲルボトムの端から 1 - 1.5 cmのところになれば、それぞれの試験所で泳動時間を設定しなければならない。

もし PFGE の結果が 24 - 48 時間以内に得られなければならないのでなければ、以下の検討をする。

1. プラグの溶菌をより長い時間にする (3 - 16 時間)。

2. 溶菌バッファーを取り除くための TE での洗浄ステップを長時間 (30 - 45 分) 低温で (37 °C 又は室温) 行う。1 日目に開始し、プラグを TE 煮付けて冷蔵庫で保存して 2 日目に終了する。

3. 制限酵素切断をより長時間 (3 - 16 時間) 行う。

4. スタンダードの最小バンドがゲルボトムの 1 - 1.5 cmのところに見えなければ、泳動時間を各試験所の条件に合わせて決めなければならない。