

結核菌 VNTR ハンドブック

地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編

第一版

(2012年10月編)

結核菌 VNTR ハンドブック 目次

地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編

序. 結核分子疫学と JATA(12)-VNTR 型別	P1
1. 結核菌 VNTR 型別のための鋳型 DNA (テンプレート) 作成	P2-5
2. 結核菌 VNTR 型別における PCR	P6-10
3. JATA(12)-VNTR 型別におけるアガロースゲル電気泳動	P11-13
4. PCR 産物のキャピラリー電気泳動シークエンサーを用いた電気泳動	P14-15
5. キャピラリー電気泳動シークエンサーによる自動アリルコール設定	P16-17
6. PCR 産物のキャピラリー電気泳動シークエンサーによるサイジング	P18-26

序：結核分子疫学と JATA(12)-VNTR 型別

VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) に代表される手法を用いた結核分子疫学は、結核患者から分離される菌株間の遺伝子レベルでの違いを調べ、その異同や近似性から結核の伝搬や蔓延状況などにアプローチすることが目的です。とりわけ公衆衛生領域では、実地疫学において感染源がある程度推定されている事例に対し、対象となる菌株の異同を調べることによって科学的裏付けを得る場合や、地域的に収集された不特定多数の結核菌株を網羅的に分析し、未知の伝搬経路を調査する場合など、様々な局面での活用が期待されています。加えて、結核感染が広域に渡る場合、各検査地研間の解析結果の共有化も重要な要素となってきます。

JATA (12)-VNTR 法は国際的標準法として用いられている **Supply's standard 15 loci-VNTR** とは異なり、東アジア全域での結核菌株「北京型ファミリー」において分解能が高いことから、我が国における型別分析に適しています。また、簡便性、コスト、精度管理など、様々な面で高機能であることから、結核分子疫学解析を未だ実施したことがない地方衛生研究所においても導入しやすいという利点があります。一方、より高い分解能が要求される感染源（菌株）の同一性・類似性にかかる解析では 12 領域のみでの適用・解釈が困難な可能性も指摘されておりますが、解析領域の追加によって精度を高める試みが検討されているところです。

本稿では、① 結核菌からの PCR 鋳型の抽出、② JATA (12)-VNTR における PCR、③ アガロースゲル電気泳動時の注意点、④ シーケンサーを活用した蛍光プライマー法について、それぞれ基本的な知識、具体的なプロトコル例を紹介しています。現時点において JATA (12)-VNTR 型別を実施したことがない地方衛生研究所でも使用できる入門書として、また、既に実施中の機関においては手技的安定化を促し、精度向上や迅速化に寄与することを目的にまとめたものです。各地研を中心とした地域公衆衛生、結核対策ならびに将来的な VNTR データの相互利用に向けてご活用頂ければ幸いです。

1. 結核菌 VNTR 型別のための鋳型 DNA (テンプレート) 作成

【要旨】

結核菌 VNTR 型別は PCR を基礎とした遺伝型別であるため、RFLP やパルスフィールドゲル電気泳動などのように高純度ゲノム DNA を必要とせず、簡易な方法で調整した菌株 DNA を鋳型 (テンプレート) として利用することが可能である。本項では、VNTR 型別に利用可能なテンプレートの調整方法 (注 1) として最も簡易かつ安全と考えられる「菌懸濁液の加熱死菌上清の作成方法」について記載する。

【At a glance】

1. 分析菌株数と同数の 1.5 ml スクリューキャップチューブを用意し、それぞれに H₂O 200 μL を分注する
2. 軽くキャップを締め、チューブスタンドごと安全キャビネット (P3) 内に入れる
3. 使い捨てエーゼ (10 μL ループ) を用いて培養済みの結核菌を掻き取り、慎重にチューブ内に移して懸濁する
4. エーゼをそのまま廃棄し、チューブキャップを閉める
5. 3-4 を繰り返す、すべての分析株について同等の操作を行う
6. チューブスタンドごと 95°C、10 分間加熱する
7. 室温まで冷却後、13,000 rpm にて 10 分間遠心する
8. 別の 1.5 ml チューブを用意して、死菌をなるべく吸わないようにマイクロピペットで上清を移す
9. 冷凍保存

【必要な物品】

- ・チューブスタンド
- ・作業用シート (使い捨て)
- ・P3 用手袋 (使い捨て)
- ・エーゼ (使い捨て、10 μL ループ)
- ・キャビネット用廃棄物容器
- ・各種マイクロピペット
- ・1.5 ml チューブ用遠心機
- ・蓋付き金属バット (チューブスタンドが収まるサイズ)
- ・消毒薬 (5% クレゾール (70%エタノール溶液))

以下の物品については DNA free のものを用意する。

- ・1.5 ml スクリューキャップチューブ
- ・純水 (H₂O)
- ・ピペットチップ
- ・1.5 ml チューブ

【作業工程】

I. 準備

- ・ バイオハザードを防ぐため、必ず白衣、ロング手袋などの保護衣を装着する。
- ・ 使用前に安全キャビネット (P3) の電源を入れ、気流を安定させておく。
- ・ 安全キャビネットの作業スペースに使い捨てシートを敷き、操作中の菌体・懸濁液の漏えいに備える。
- ・ 培養済みの結核菌固形培地 (小川培地など)、廃棄物用容器 (廃棄袋など、あとでオートクレーブ滅菌しやすいもの)、金属バット (チューブスタンドが収まるサイズのもの)、使い捨てエーゼをすべて安全キャビネットに入れておく。

II. プロトコール

1. 分析菌株数と同数の 1.5 ml スクリューキャップチューブを用意し、それぞれに H₂O 200 μL を分注する。軽くキャップを閉め、チューブスタンドに立てておく。

2. チューブスタンドごと安全キャビネット (P3) 内に入れる。

*以下、安全キャビネット内での操作。

3. スクリューキャップを外す。チューブはスタンドに立てたままにしておく。
(注 2)

4. 培養済み結核菌培地の蓋を外し、使い捨てエーゼで培地の表面を擦って菌体を付着させる。(注 3)

5. 菌体の付着したエーゼをキャップの外したチューブに差し込み、軽く上下に動かして H₂O 中に落下させる。(注 4)

6. エーゼをそのまま廃棄し、チューブキャップを閉める。

7. 3.~6.の工程を繰り返し、すべての菌株について菌体をチューブに移す。

8. チューブスタンドごと金属バットに入れ、蓋をしてキャビネットから取り出す。

9. 金属バットごとオートクレーブ器に入れ、95°C、10分加熱する。(注 5)
この操作により、チューブ内外の結核菌は死滅するので、以下通常の実験室にて作業を行ってよい。

10. 室温まで温度が下がった後、遠心機にて 13,000 rpm、10 分間遠心する。
11. 新しい 1.5 ml チューブにマイクロピペットで上清を移す。
12. 使用するまで-20℃で凍結保存する。

【注記事項】

- (注 1) RFLP 解析や高純度 DNA が必要な場合には、ISOPLANT (ニッポンジーン) のようなキットやビーズビーターを用いた破砕法によってゲノム DNA を抽出する必要がある。これらの方法を用いると、損傷の少ない DNA が高純度で精製できるため、RFLP 解析に限らず、様々な用途に利用できるサンプルが作成可能である。
(加熱殺菌によるテンプレート DNA は、その用途が PCR 増幅にほぼ限定されることに注意)
- (注 2) 開けた後、キャップは手の届きやすい場所に置いておくとよい。
- (注 3) エーゼの先端部に付着する程度の菌量で検出可能である。菌体が乾燥している場合は、操作中にエーゼから落下しやすいので注意すること。柔らかいエーゼは操作時にしなる恐れがあり、菌体が飛散することがあるので注意を要する。
- (注 4) 差し込みすぎるとチューブにはまり込んでしまい、危険である。菌体が湿ってエーゼから外れにくい場合は、軽く回転させるなどして H₂O 中に落下させる。
通常の形状のチューブの場合、200 μL の容量では 10 μL ループは完全に水没せず、ループに液膜が形成されることは無い。万が一液膜が形成した場合には、廃棄バッグまでの移動中に弾けて菌体を含んだエアロゾルが発生することがあるため、注意すること。
- (注 5) 一般的なオートクレーブ条件 (121℃、20 分) では、PCR の検出感度が低下することがあるため、注意すること。検出感度は使用する PCR 装置や菌体量などによって変動するため、実際に試してみて検出結果が安定する条件で加熱殺菌を行うようにすると良い。

[補足] P3 実験室内における結核菌の消毒について

DNA 抽出作業中、エアロゾルの発生などによって菌体が飛散する可能性がある。具体的に飛散しやすい工程は以下のとおり。

- ・10 μ L ループで菌体を掻き取り、チューブに移すまで (菌体の落下)
- ・チューブ内の H₂O に菌体を落下させる工程 (エアロゾルの発生)
- ・10 μ L ループを廃棄物入れに移すまでに水膜が弾ける可能性 (エアロゾルの発生)

菌体の飛散に備え、消毒薬は安全キャビネット内に準備しておく必要がある。また、こまめに手袋を替え、手指への付着に起因する菌体の拡散が起こらないように配慮すること。作業終了後は、部屋・キャビネットともに紫外線照射を行い、殺菌する。

培養済み結核菌に利用可能な消毒薬は以下のようなものがある。

- ・70% エタノール
- ・0.2% テゴール-51
- ・サイデックス
- ・5% フェノール
- ・5% クレゾール

[補足] 液体培地からの結核菌 DNA 抽出について

MGIT など、液体培地での結核菌培養液がそのまま搬入されることがある。このような場合、筆者は小川培地と同様 200 μ L の純水を 1.5 ml チューブに用意し、使い捨てトランスファーピペットを用いて培地の底に沈殿した菌体を吸入してチューブに移している。後の操作は小川培地からの鑄型 DNA 抽出処理と同様である。菌体吸入の際、液体培地が混入しても PCR の鑄型としては問題なく利用できることを確認している。

[補足] 結核菌株の長期保存について

DNA 抽出と同時に生菌の保存用培地への継代を行うと、P3 安全実験室での作業を減らすことができる。結核菌は、培養後に-20 $^{\circ}$ Cもしくは-80 $^{\circ}$ Cにて凍結することにより長期保存が可能である。例として、凍結保存法には以下のような方法がある。

- ・ 小川培地でのコロニー形成後、そのまま凍結
- ・ 液体培地 (7H9 など) で培養後、菌液をそのまま凍結
- ・ 液体培地・固形培地で培養後、菌液を終濃度 10%スキムミルクとなるように混和して凍結

(大阪市立環境科学研究所 和田 崇之)

2. 結核菌 VNTR 型別における PCR

【要旨】

結核菌 VNTR 型別では、PCR 増幅領域が 1 検体あたり 12 箇所以上に及ぶことから、効率よく実験操作を行うことが時間の短縮のみならず、分析結果の精度向上につながる。本稿では、我が国における結核菌 VNTR 型別で最小の共通領域セットとして機能しうる JATA(12)-VNTR を例として、高効率な操作手技を紹介するとともに、PCR において留意すべき点について記述する。

【At a glance】

*すべての操作は氷上で行う

1. PCR マスターミックス (buffer, dNTP, 酵素, H₂O の混合液) を準備する
2. 12 本の 1.5 ml チューブにマスターミックスを分注する
3. 各 VNTR 領域に対応したプライマーミックス (25 μM) を各チューブに加え、ボルテックスで混和する (反応液の作成)
4. 1 検体あたり 12 本の 0.2 ml チューブを準備し、各 VNTR 領域に対応した反応液をそれぞれのチューブに 7.5 μL ずつ分注する
5. 12 領域に対応したチューブに 0.5 μL ずつサンプル (鋳型 DNA) を加えて蓋をする
6. 軽く遠心
9. PCR

【必要な物品】

- ・氷のう (発泡スチロールの容器で良い) ・ 1.5 ml チューブスタンド
- ・ピペットチップ用廃容器
- ・各種マイクロピペット ・ 96 ウェルプレート (0.2 ml チューブスタンド)
- ・ 1.5 ml チューブ用遠心機 (簡易型で良い)
- ・ 0.2 ml チューブ用遠心機 (簡易型でも良いが、96 ウェルプレート用が効率的)
- ・ PCR 装置 (メーカー、機種は問わない)

以下の物品については DNA free のものを用意する。

- ・ 1.5 ml チューブ ・ 0.2 ml 8 連 (12 連) チューブ ・ 純水 (H₂O)
- ・ 各種ピペットチップ (フィルター付が望ましい)

本プロトコールでは、試薬は以下のものを使用する。

- ・ TaKaRa ExTaq Hot start ver.
- ・ TaKaRa 2x GCI buffer
- ・ 各種プライマー溶液 (25 μM /each)

※12 か所の VNTR 領域に対応した PCR 用プライマー (計 24 種類) を各濃度 50 μM で合成し、領域ごとに 5' プライマーと 3' プライマーを 1:1 で混和して凍結保存しておくが良い。

【作業工程】

I. 準備

- ・ 試薬の分注、操作はすべて氷上で行うので、チューブスタンドが入るサイズの氷のうに氷を入れておく。
- ・ 試薬 (マスターミックス) 用の 1.5 ml チューブスタンドと、PCR 反応液用の 0.2 ml チューブスタンド (96 ウェルプレート) を氷上に置く。
- ・ 使用する試薬を冷凍庫から取り出し、溶解させておく。(注 1)

II. プロトコール

(A. 試薬の準備)

1. 1.5 ml チューブを用いて、以下の組成でマスターミックスを作成する。検体数に応じて適宜準備する。(注 2)

各試薬名	1 反応あたりの液量
TaKaRa 2x GCI buffer	4 μL
2.5 mM dNTP mix	0.64 μL
TaKaRa ExTaq HS version	0.04 μL
純水 (H_2O)	2.52 μL
計	7.2 μL

12 か所の VNTR 領域に対応した PCR を各検体について行うので、1 検体あたり 12 反応分のマスターミックスが必要になる。ピペット操作によって余剰液が残る分量の試薬調整が望ましいため、それぞれの試薬ごとに (検体数+1) の分量を作成すると良い。

2. 1.5 ml チューブ (12 本) をチューブスタンドに立て、各チューブにマスターミックスを分注する。

3. 各チューブに 12 か所の VNTR 領域に対応したプライマー溶液 (各 25 μM) を 1 反応溶液量あたり 0.3 μL 加えて蓋を閉じ、軽くボルテックスで混和する。

(B. PCR)

4. あらかじめ検体名を記入した 0.2 ml チューブ (1 検体あたり 12 本) を 96 ウェルプレートに立て、各 VNTR 領域に対応した反応液を 7.5 μL ずつ分注する。(注 3)

5. 各 12 チューブにサンプル (鋳型 DNA) を 0.5 μL ずつ加え、キャップを閉じる。

6. 5.の工程を繰り返し、すべてのサンプル (鋳型 DNA) について各 VNTR 領域に対応した PCR チューブ (12 本) を完成させる。

8. 全チューブを軽く遠心する。(注 4)

9. 以下の反応条件 (プログラム) により PCR を行う。(注 5)

95°C	5 分	
95°C	30 秒	┌
60°C	30 秒	30 ~ 40 サイクル
72°C	1 分 30 秒	└
72°C	7 分	

【注記事項】

(注 1) GCI buffer は溶解時に結晶が残ることがあるが、充分温めると溶けるので、完全に溶けるまで指先で温めること。

(注 2) PCR における反応液の終濃度は以下の通り。液量は 1 反応あたり 8 μL 。

各試薬名	1反応あたりの液量	終濃度
TaKaRa 2x GCI buffer	4 μL	1x
2.5 mM dNTP mix	0.64 μL	0.5 mM
TaKaRa ExTaq HS version	0.04 μL	0.025 U/mL
primers (50 mM each)	0.15 μL + 0.15 μL	\div 1 mM
template DNA	0.5 μL	-
純水 (H ₂ O)	2.52 μL	-

マスターミックスおよびプライマーを混合した各反応液は、必要なサンプル量

をあらかじめ計算して作成する。

(注3) 0.2 ml チューブはシングルではなくストリップタイプ (8 連もしくは 12 連) やプレート (96 well) を用いると効率が良い。ただし、12 連チューブは扱いが難しく、反応液を跳ね飛ばしてしまうことがあるので注意を要する。8 連チューブを用いる場合は、ハサミで 4 チューブごとに切断したものを用意し、(8+4) チューブとなるようにして使うと良い。

(注4) 鋳型 DNA は PCR のホットスタートの時に熱対流によって充分混和されるので、ボルテックスなどの操作は不要である。(遠心するだけで OK)

(注5) PCR 条件は使用するプライマー配列によって変化することに留意。本条件は後述のプライマーを使用する際に適用できるものである。PCR 機器によっても増幅効率が異なることがあるので注意を要する。筆者は通常 Thermal Cycler ABI9600 (Life Technology Inc.) を使用している。

また、サイクル数はテンプレート濃度、電気泳動装置によって検証する必要がある。アガロースゲル電気泳動の場合、初期条件としては 35~40 サイクルで試すとよい。シーケンサーによるフラグメント解析を実施する場合は、増幅産物が濃すぎると検出精度に影響を及ぼすので、20 倍程度希釈して利用する。

(大阪市立環境科学研究所 和田 崇之)

[補足] 使用するプライマー配列について

JATA (12)-VNTRに用いるプライマーセットは24種類 (12組) であるが、必ずしも既報の配列を遵守する必要はなく、増幅領域と反復数換算がコントロール用鋳型DNAなどを用いて検証されていれば、その使用が制限されることはない。下記の配列は、前田ら (結核, 2008; 83 : 673-678) によって報告されたプライマー配列であり、「VNTR スターターキット」として希望する地衛研に 2009.3 月に配布されたものと同様である。シーケンサーによるフラグメント解析を実施する場合は、各プライマーに蛍光プローブを標識して利用する。

Locus	Primer 1	Primer 2
JATA01	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT	GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC
JATA02	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
JATA03	AGACGTCAGATCCCAGTT	ACCCGACAACAAGCCCA
JATA04	TGTGTACCTGACGATTTCAAGG	TGGCCGGCAAATAATGGATGC
JATA05	CCGATGTAGCCCGTGAAGA	AGGGTCTGATTGGCTACTCA
JATA06	ACCTCCGTTCCGATAATCCG	CAGCTTTCAGCCTCCACAAT
JATA07	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	CATAGCGACCAGGCGAATAG
JATA08	GCCAGCCGTAACCCGACCAG	GGGCCGAAATTCGAGTGG
JATA09	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	GTGCCGACGTGGTCTTGAT
JATA10	ATCCCCGCGGTACCCATC	GCCAGCGGTGTCGACTATCC
JATA11	GTGCCGGCCAGGTCTTCC	CACCGCGTGTGACCCGAAC
JATA12	ACCGCAAGGCTGATGATCC	GTGCATCTCGTCTGACTTCC

同プライマーを用いた場合の反復数換算表 (理論値) は以下の通りである。実測値は分析手法に応じて変動するので、反復数が既知の陽性対照を用いて適宜確認すること。

VNTR	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12
	0424 (t04)	0960 (M10)	1955 (t21)	2074 (t24)	2163b (Q11b)	2372 (V2372)	2996 (M26)	3155 (Q15)	3192 (M31)	3336 (V3336)	4052 (Q26)	4156 (Q4156)
反復数ごとの差 (bp)	51	53	57	56	69	57	51	54	53	59	111	59
反復数と増幅産物サイズ (bp) の対応												
0	535		208		200	176		71		98	168	510
1	586	536	265	70	269	233	336	125		157	279	569
2	637	589	322	126	338	290	387	179	597	216	390	628
3	688	642	379	182	407	347	438	233	650	275	501	687
4	739	695	436	238	476	404	489	287	703	334	612	746
5	790	748	493	294	545	461	540	341	756	393	723	805
6	841	801	550	350	614	518	591	395	809	452	834	864
7	892	854	607	406	683	575	642	449	862	511	945	923
8	943	907	664	462	752	632	693	503	915	570	1056	982
9	994	960	721	518	821	689	744	557	968	629	1167	1041
10	1045	1013	778	574	890	746	795	611	1021	688	1278	1100
11	1096	1066	835	630	959	803	846	665	1074	747	1389	1159
12	1147	1119	892	686	1028	860	897	719	1127	806	1500	1218
13	1198	1172	949	742	1097	917	948	773	1180	865	1611	1277
14	1249	1225	1006	798	1166	974	999	827	1233	924	1722	1336
15	1300	1278	1063	854	1235	1031	1050	881	1286	983	1833	1395

下線はH37RvのVNTR型別。

3. JATA(12)-VNTR 型別におけるアガロースゲル電気泳動

【要旨】

結核菌 VNTR 型別の利点の一つは、反復配列が数 10 bp と大きいためアガロース電気泳動でも反復数を識別できることである。シーケンサーなどの備品を導入せずに実施できるため、比較的スムーズに型別解析が可能である。本稿では、アガロースゲル電気泳動によって VNTR 領域の PCR 産物を分析する際に有用な情報をまとめ、記載した。

・使用するアガロースゲルおよび濃度について

JATA(12)-VNTR における PCR 産物サイズはおおむね数 100 bp 程度のもので多いため、1,000 bp 以下での分解能が高くなるゲル濃度 (2~2.5%) での電気泳動を行うと良い。アガロースは高濃度用 (NuSieve 3:1 など) を使用すること。

JATA11 (QUB-26) は増幅産物が 1,000 bp を超えることが多く、2%以上のアガロースではサイズ判定が難しいことがあるため注意を要する。

電気泳動距離は長い方が分解能が上がり、正確な結果が期待できるが、ミニゲルでも充分精度の高い分析が可能である。

・電気泳動時の注意点

PCR 産物をきれいに電気泳動するためには、以下の点に留意すると良い。

1. ゲルをあまり厚くしない

ゲルが厚いと DNA バンドがぼやけるだけでなく、泳動像の撮影に悪影響を与える。

2. サンプル量を抑える

DNA の量が多いとバンドが太くなり、反復数の算定に支障をきたす。また、電気泳動度にも影響があるので、アプライするサンプル量は多くても 2 μ L 程度にとどめる。VNTR では各領域の増幅効率などに違いがあるため、PCR 産物の濃度にバラつきが生じることに留意する。

(筆者は PCR 産物を TE で 10 倍希釈し、5~10 μ L を泳動することが多い)

3. バッファーについて

一般的に TAE よりも TBE の方が電気泳動の結果が綺麗になると言われているが、ミニゲル程度の電気泳動距離であればほとんど変わらない。

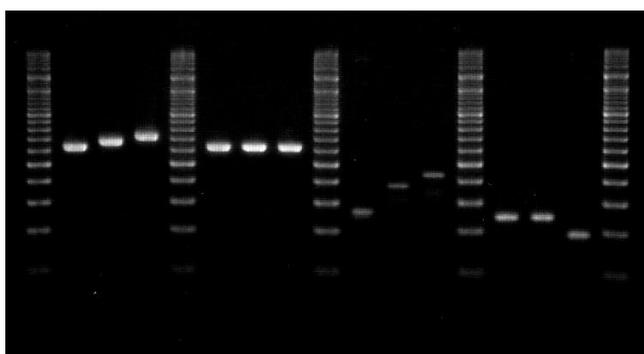
4. 電圧について

低電圧での電気泳動では、泳動中の温度上昇が抑えられるため比較的綺麗な電気泳動像が得られるが、ミニゲル程度であればそれほど大きな影響はないと考えてよい。

5. サンプルの並べ方について

VNTR では、同じ領域の PCR 産物を隣接して電気泳動すると反復数の換算が正確になるので、鋳型 DNA (結核菌サンプル) ごとに電気泳動するのではなく、VNTR 領域ごとにまとめて電気泳動すること。

下図は、本マニュアル「結核菌 VNTR 型別における PCR」で紹介したプライマー、PCR 条件 (40 cycles) によって得られた増幅産物について、TE で 10 倍希釈後 5 μ l 電気泳動した実際の電気泳動像である (0.5% TBE, 2% アガロース, 50V, 120 min)。各領域の増幅産物効率や高サイズ (1,000 bp 付近) での判別の難しさが確認できる。



JATA01~04

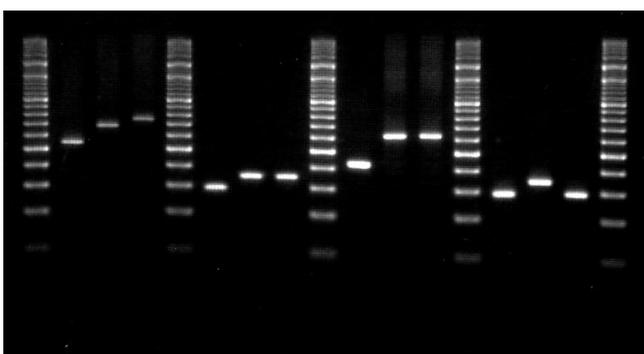
左から、

JATA01: 反復数 2, 3, 4

JATA02: 反復数 3, 3, 3

JATA03: 反復数 1, 3, 4

JATA04: 反復数 4, 4, 3



JATA05~08

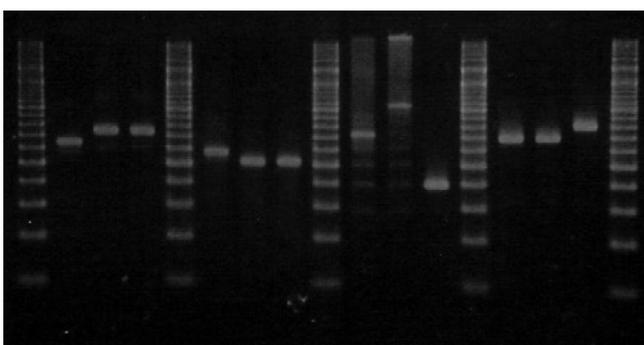
左から、

JATA05: 反復数 5, 7, 8

JATA06: 反復数 2, 3, 3

JATA07: 反復数 3, 7, 7

JATA08: 反復数 4, 5, 4



JATA09~12

左から、

JATA09: 反復数 3, 5, 5

JATA10: 反復数 8, 7, 7

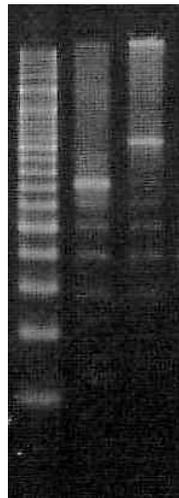
JATA11: 反復数 5, 8, 2

JATA12: 反復数 3, 3, 5

[補足] VNTR で出現するラダー状のバンド (Stutter Peak) について

反復構造をもつ領域の PCR では、時折「本来の反復数よりも小さい反復数のバンドがラダー状に出現する」ことがある。このようなバンドは反復数が大きい時、反復ユニットが大きい VNTR 領域で特に起こりやすく、JATA(12)-VNTR では JATA11 で顕著な現象である。

ラダー状の電気泳動像が出現する場合、多くは最大サイズのバンドが本来の増幅産物であり、アガロース電気泳動では通常最も明るく見えるので、ラダーバンドを反復数算出のヒントとして利用すると正確に反復数が決定できる。



左図は、アガロース電気泳動像の JATA11 を一部拡大したもの。矢印の部分に stutter bands が検出されており、反復数の逆算に役立つことがわかる

(大阪市立環境科学研究所 和田 崇之)

4. PCR産物のキャピラリー電気泳動シーケンサーを用いた電気泳動

【要旨】

キャピラリー電気泳動シーケンサー (CES) は再現性が非常によいことから、数 bp の差を検出することが可能である。結核菌の VNTR 型別は、1 リポートが 50bp 以上と大きいため、CES で非常に高い再現性での PCR 産物の泳動が可能である。本項では、「PCR 産物の CES における泳動法」について記載するが、CES の使い方については CES のマニュアル等を参照されたい。

なお、本編では Life Technology 社 (旧 Applied Biosystems 社) の Genetic analyzer 310 を用いた場合について記載してある。

【作業工程】

1. PCR 産物を milliQ 水で 10～15 倍希釈する。

TIPS:使用する taq によって増幅効率が異なり、また対象となる VNTR 領域や使用する primer によっても増幅効率が異なるため、最適な希釈倍率は違ってくる。一定の割合で希釈しておき、ピークが出現しない場合は PCR failure の可能性も含めて再度 PCR し、希釈せずに泳動してみることを薦める。

2. Hi Di formamide 12 μ l、GeneScan 1200 LIZ 0.5 μ l、希釈した産物 1 μ l を、PCR 用 micro tube に入れ、サーマルサイクラーで 95 度 2 分間加熱し、その後、氷上のアルミブロックで急冷する。

TIPS : Hi Di formamide を heat shock しないと twin peak が出現する可能性がある。1200 LIZ は単価が高いので、もっと使用量を減らすことが可能。どこまで減らしても大丈夫か、を確認して、ルチンで使用する。

3. 泳動用 microtube に全量を移し、セプタを取り付ける。

TIPS : セプタは必ずしっかりと奥まで差し込むこと。取り付けが不十分だと電極が曲がることもある。

4. 泳動用 micro tube をサンプルトレイにセットする。

TIPS : 48 検体用のサンプルトレイは 1 個おきにセットするようになる。

5. CES のマニュアルに従って解析を行う。

【必要な物品、試薬】

サンプルチューブ (Life Technology401957 又は同等品)

サンプルチューブ用セプタ (Life Techonolgy401956 又は同等品)

0.5ml Tube Sample Tray (Life Technology5572)

Genetic Analyzer Buffer with EDTA (Life Technology402824)

310 POP-4 (Life Technology402838)

Hi-Di Formamide (Life Technology4311320)

GeneScan 1200 LIZ (Life Technology4375252C)

PCR 用 micro tube (nuclease free で使用するサーマルサイクラーに適したもの)

(千葉県衛生研究所 横山 栄二)

5. キャピラリー電気泳動シーケンサーによる自動アレルコール設定

【要旨】

CES 用ソフトウェアを設定することで、VNTR ピークのサイズから換算表を見てアレル（リピート数）を算出することなく、自動でアレルコール出来るようになる。それにより、換算ミスといった単純なミスを防止することが可能である。

bin 設定は同一機種であれば他機関で設定した bin セットをインポートして使用可能（Genetic analyzer 310 を除く）であるが、使用する primer set が同一でなければならない。

【bin の設定を自分で行う場合】

1. 対象とする全ての VNTR 領域で既知のアレルの菌株 DNA を、手順に従って PCR 及び泳動を行う。なおこの際の PCR 及び泳動は全て singleplex で行うこと。

TIPS : アレル既知の菌株 DNA が入手出来ない場合は、出来るだけ多くの菌株 DNA を準備して同様に行うことでも可。

2. データファイルを VNTR 領域ごとに整理して一つのフォルダに入れておく。
3. GeneMapper を起動する。
4. Panel Manager を起動する。
5. bin set を作製する。
6. kit を作製する。kit は multiplex 泳動を行うための VNTR グループごとに作製する。
7. それぞれの kit に対して marker を作製する。
8. kit にカーソルして、Add reference をクリックし、bin 設定したい VNTR 領域の泳動データが入っているフォルダを選択し、ok をクリックする。
9. Navigation window の下半分にフォルダ内のファイルが表示されるので、その全てを選択する。
10. Navigation window の右半分に electrophoregram が表示されるので、bin 設定したい VNTR 領域の色素のみ表示されるようにする。
11. 明瞭なピークが存在する場所に bin を手動で設定する。
12. 同様に全ての VNTR 領域の bin を設定する。
13. GeneMapper Manager を起動する。
14. Analysis Method タブを選択する。
15. New をクリックし、VNTR 解析用の method を作製する。
16. Allele タブを選択し、Bin set 項目に、作製した bin set を選択する。

【bin の設定を import する場合】

1. bin 設定ファイルをデスクトップに解凍する。
2. GeneMapper を起動する。
3. Panel Manager を起動する。
4. File メニューから Import Panel を選択し、解凍したファイルのうち kit 設定ファイルを選択して ok をクリックする。
5. File メニューから Import Binset を選択し、解凍したファイルのうち bin 設定ファイルを選択して ok をクリックする。
6. GeneMapper Manager を起動する。
7. Analysis Method タブを選択する。
8. New をクリックし、VNTR 解析用の method を作製する。
9. Allele タブを選択し、Bin set 項目に、作製した bin set を選択する。

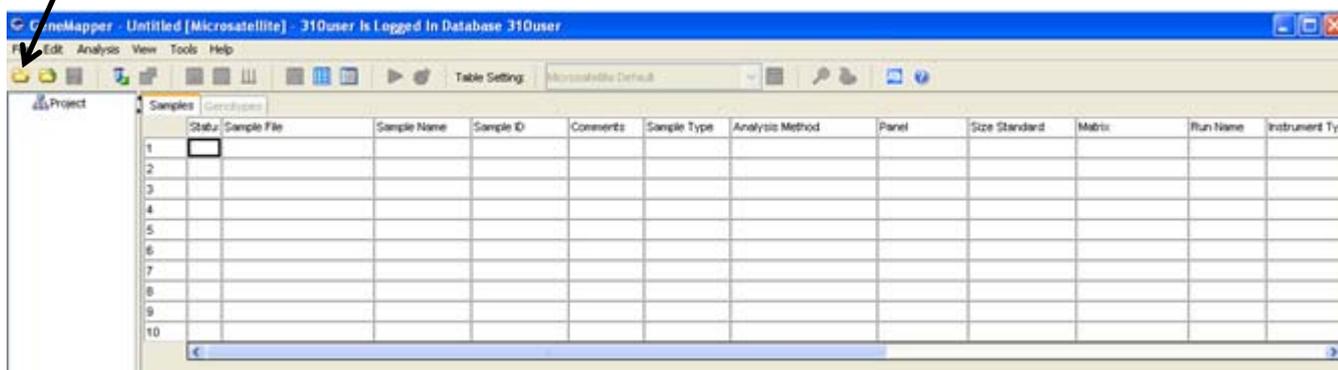
(千葉県衛生研究所 横山 栄二)

6. PCR産物のキャピラリー電気泳動シーケンサーによるサイジング

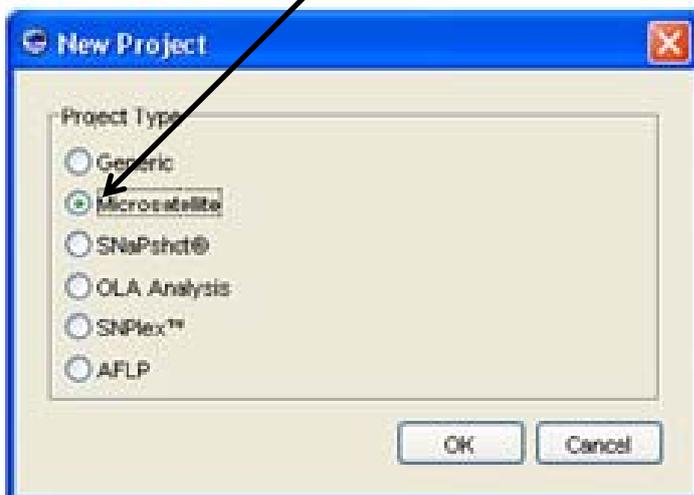
1. サンプルファイルの登録

GeneMapper (Version 4以上)では、泳動して得られたデータファイルを解析するためにプロジェクトを新規作成し、サンプルファイルをプロジェクトに登録します。通常、GeneMapperを起動した直後は新規プロジェクトが表示されますので、以下の手順でサンプルファイルに登録します。

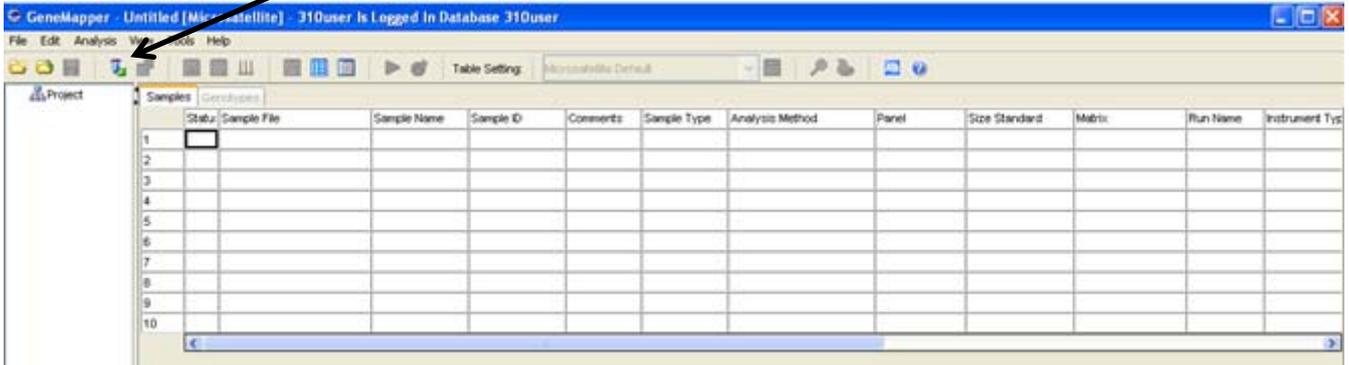
①  をクリックします。



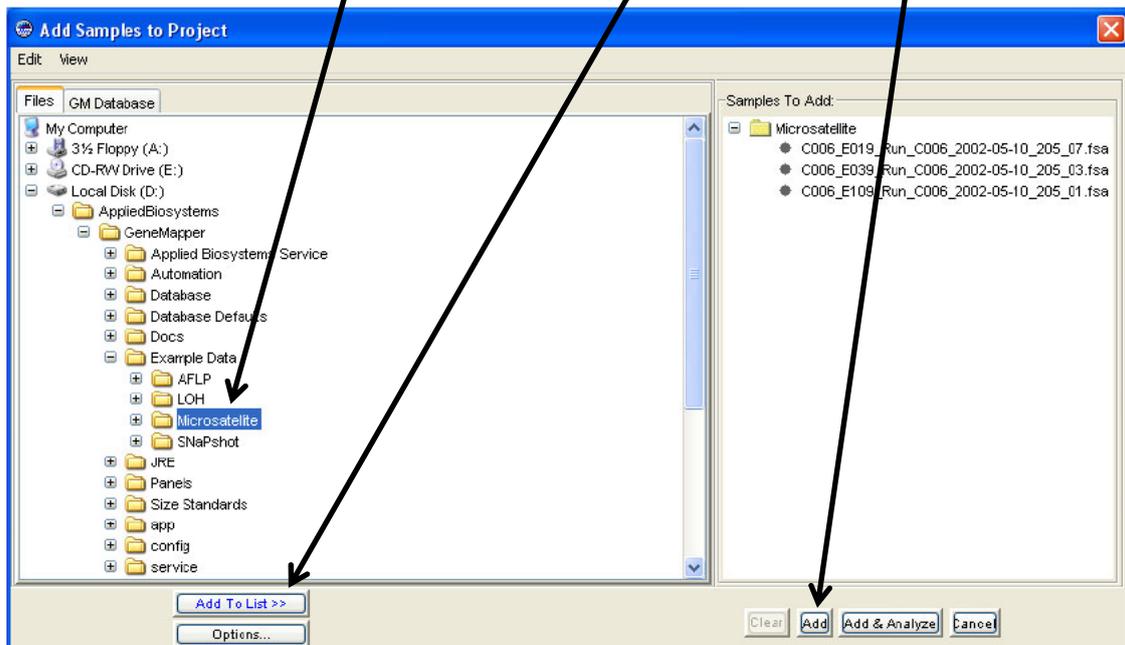
② 「New Project」ダイアログボックスで、「Microsatellite」を選択し、「OK」をクリックします。



③「GeneMapper」ウインドウで、 をクリックします。



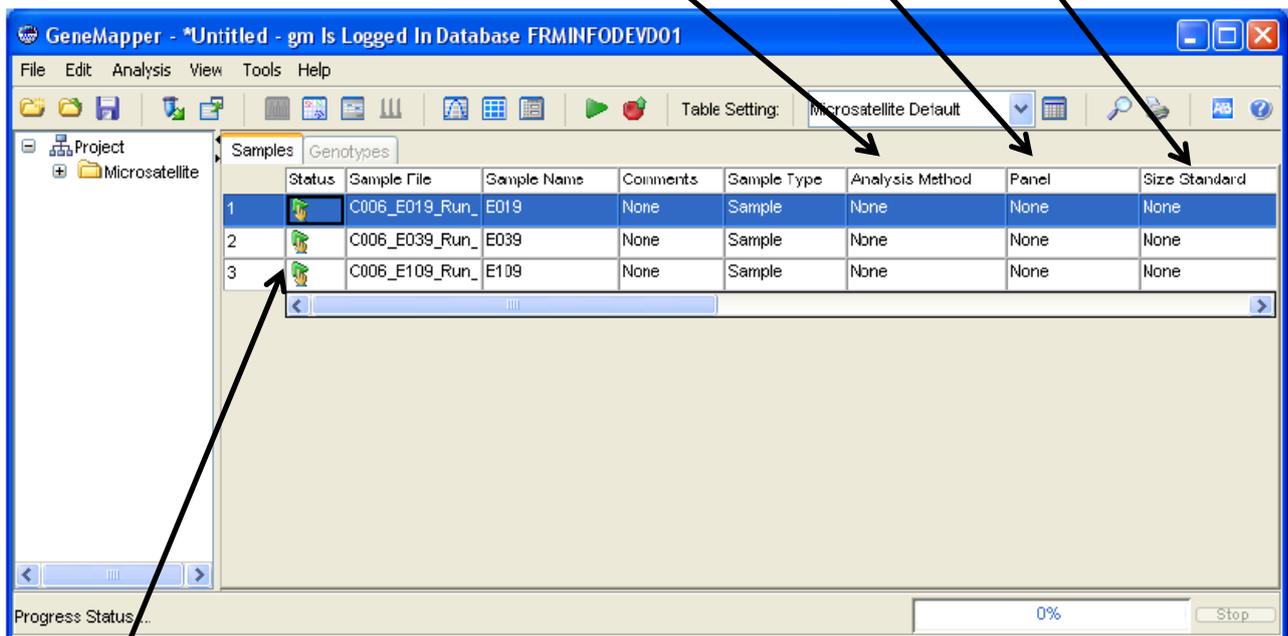
④データの保存されているフォルダをクリックし、「Add To List」、「Add」の順にクリックします



2. サンプルファイルの解析

登録されたサンプルファイルをGeneMapperで解析し、サイジングを行います。解析するためには、事前にAnalysis method、Panel、Size Standardの設定が完了している必要があります。

① 解析するサンプル用の「Analysis method」、「Panel」、「Size Standard」を選択します。



②  をクリックすると、サンプルファイルの解析が始まります。

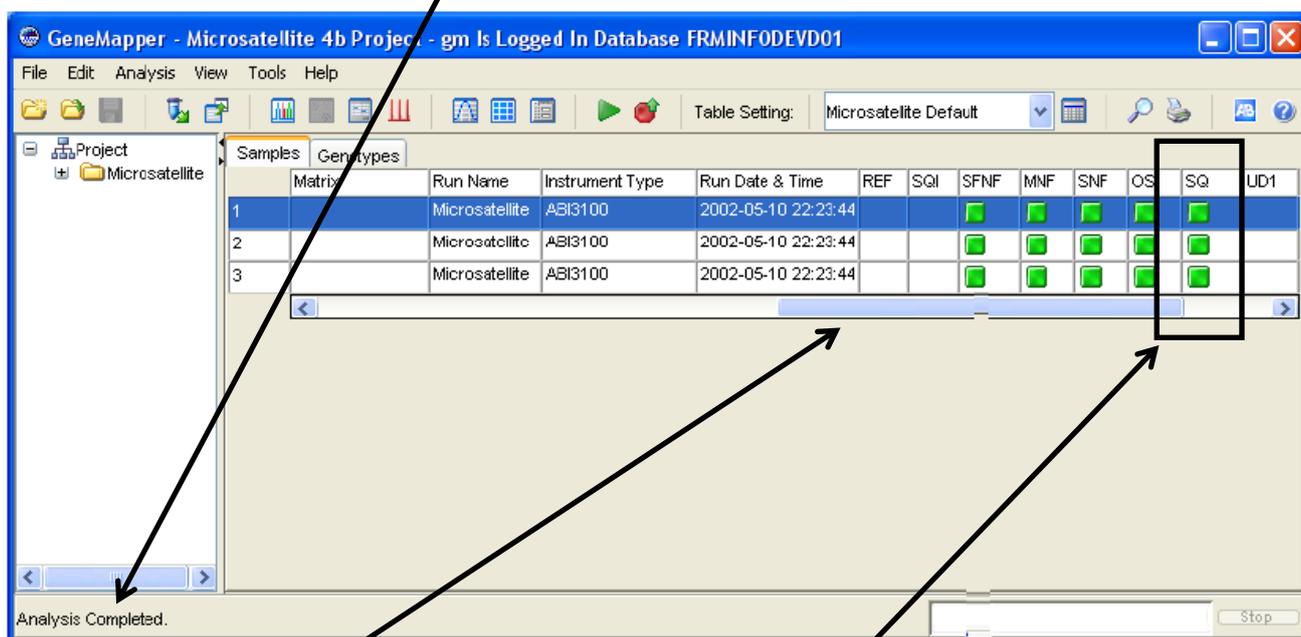
 サンプルファイルの解析の進行状況がステータスバーに表示されます。

 Analysis method、Panelの設定については、各自で行うことも可能ですが、他で設定したものをimportすることも可能です。

3. 解析データの閲覧

GeneMapperで解析されたデータを閲覧します。GeneMapperでは解析と同時にサンプルファイルのクオリティチェックが行われます。クオリティが低い場合には、手動によるチェックが必要な場合があります。

- ①ステータスバーに「Analysis Completed」と表示されていることを確認します。



- ②スクロールバーを使って右へスクロールし、「SQ」を確認します。

「SQ」はSize Standardとの適合度を示しています。

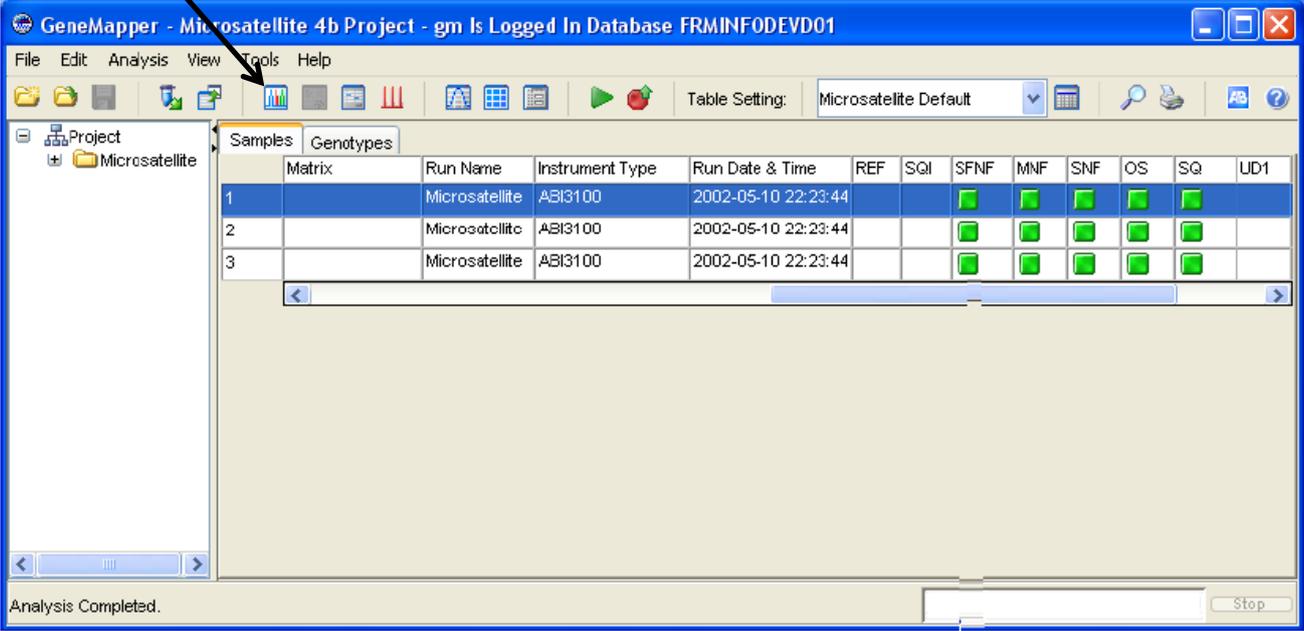
■と表示されている場合：適合度は「Pass」で、問題ありません。

■と表示されている場合：適合度は「Check」で、解析されたデータを閲覧す
▲とは可能ですが、Size Standardの認識を確認することを推奨します。

●と表示されている場合：適合度は「Low Quality」で、Size Standardの認識の
確認を行わない限り解析されたデータを閲覧することが出来ません。

☞Size Standardの認識確認については「4. Size Standardの認識確認」を参照してください

③  をクリックします。



GeneMapper - Microsatellite 4b Project - gm Is Logged In Database FRMINFODEVD01

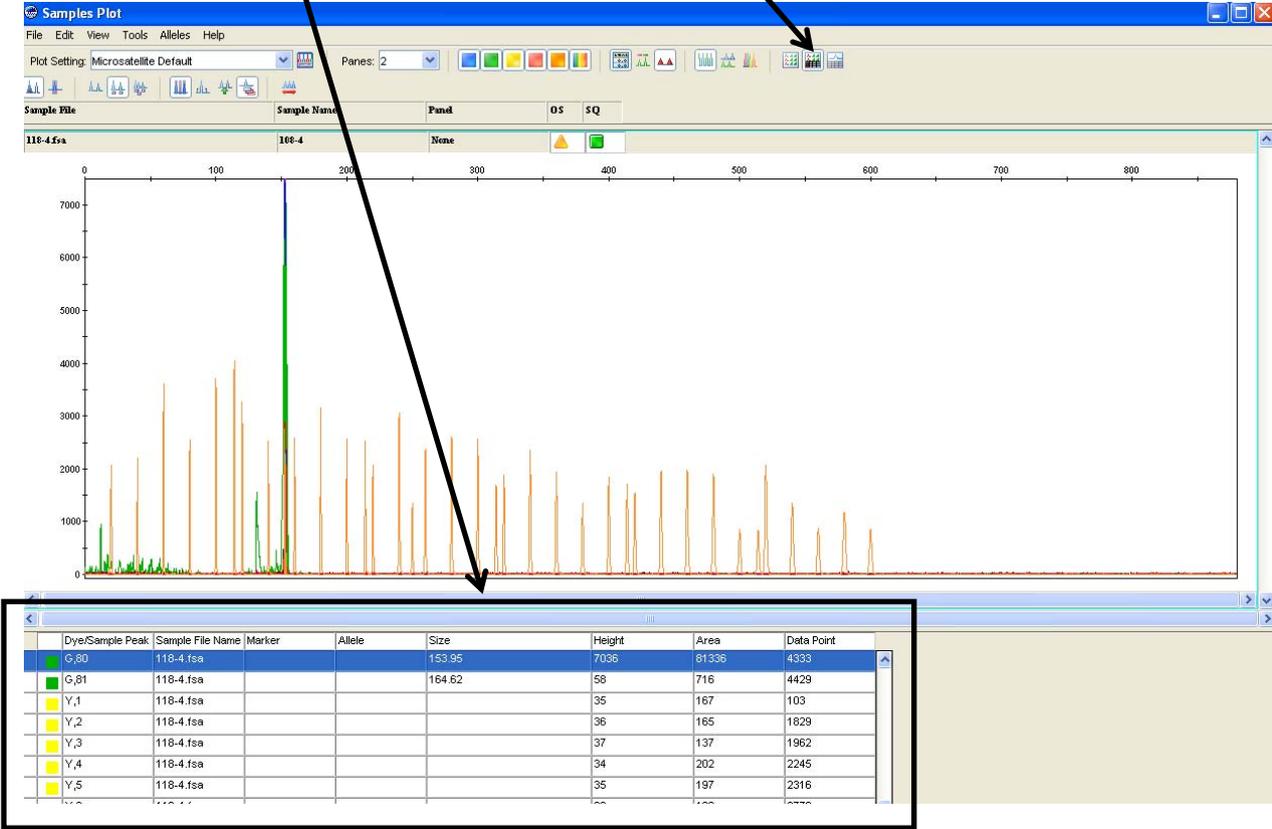
File Edit Analysis View Tools Help

Table Setting: Microsatellite Default

Matrix	Run Name	Instrument Type	Run Date & Time	REF	SQI	SFNF	MNF	SNF	OS	SQ	UD1
1	Microsatellite	ABI3100	2002-05-10 22:23:44			■	■	■	■	■	
2	Microsatellite	ABI3100	2002-05-10 22:23:44			■	■	■	■	■	
3	Microsatellite	ABI3100	2002-05-10 22:23:44			■	■	■	■	■	

Analysis Completed. Stop

④ サンプルプロットが表示されますので、 をクリックして表示モードを変更し、Sizing Tableを表示します。



Samples Plot

File Edit View Tools Alleles Help

Plot Setting: Microsatellite Default

Sample File: 118-4.fsa

Sample Name: 118-4

Panel: None

OS: ■

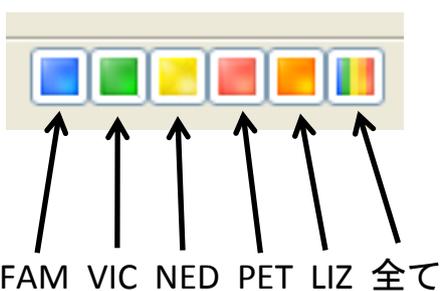
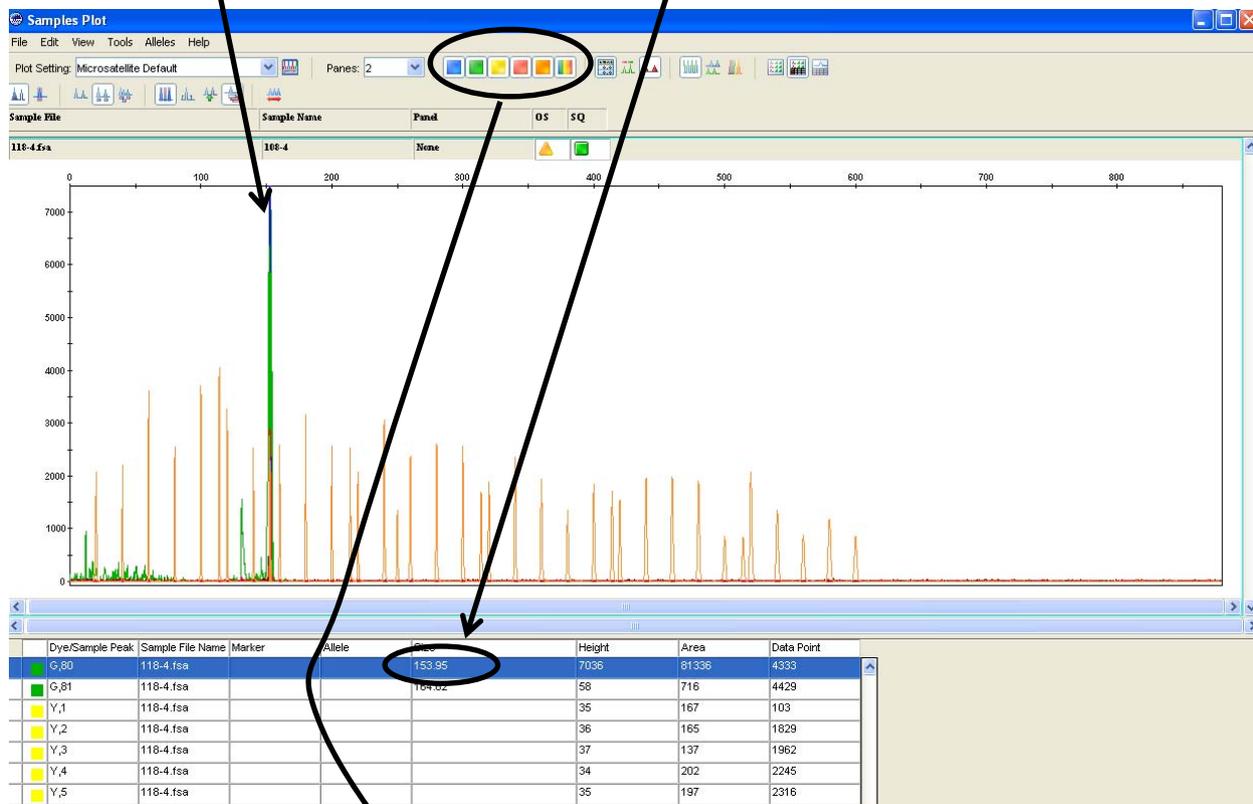
SQ: ■

0 100 200 300 400 500 600 700 800

7000 6000 5000 4000 3000 2000 1000 0

Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
G,80	118-4.fsa			153.95	7096	81336	4333
G,81	118-4.fsa			164.62	58	716	4429
Y,1	118-4.fsa				35	167	103
Y,2	118-4.fsa				36	165	1829
Y,3	118-4.fsa				37	137	1962
Y,4	118-4.fsa				34	202	2245
Y,5	118-4.fsa				35	197	2316

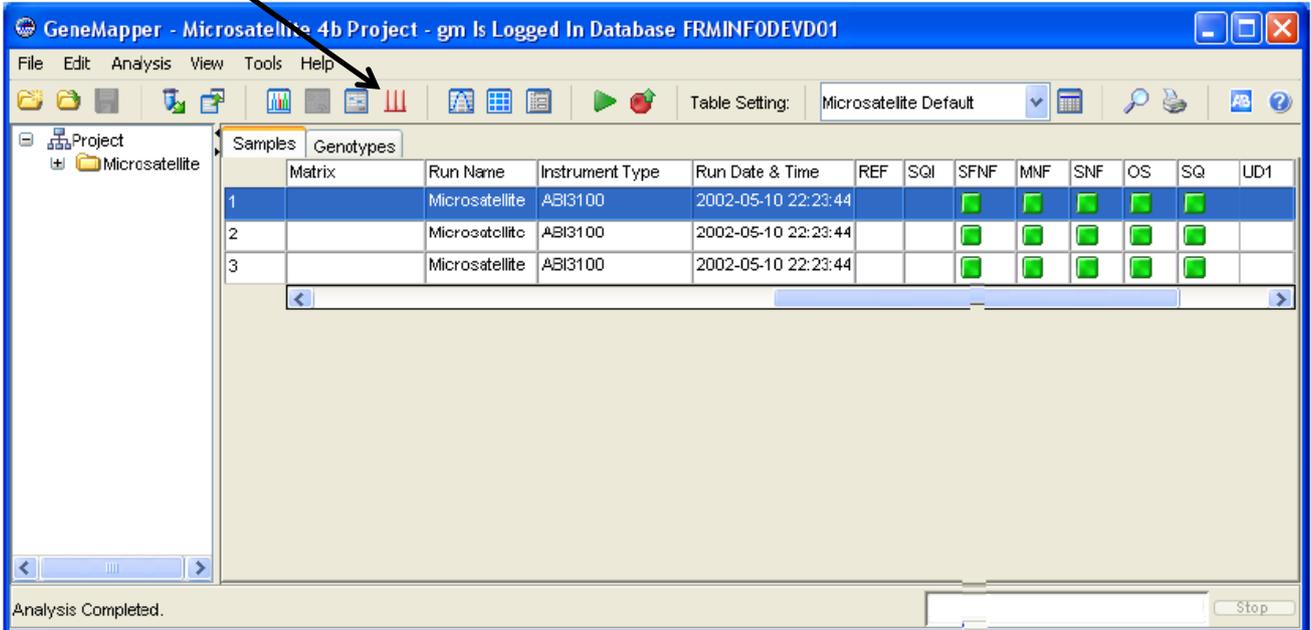
⑤ 目的のピークをクリックすると、ピークサイズ(bp)が表示されます。



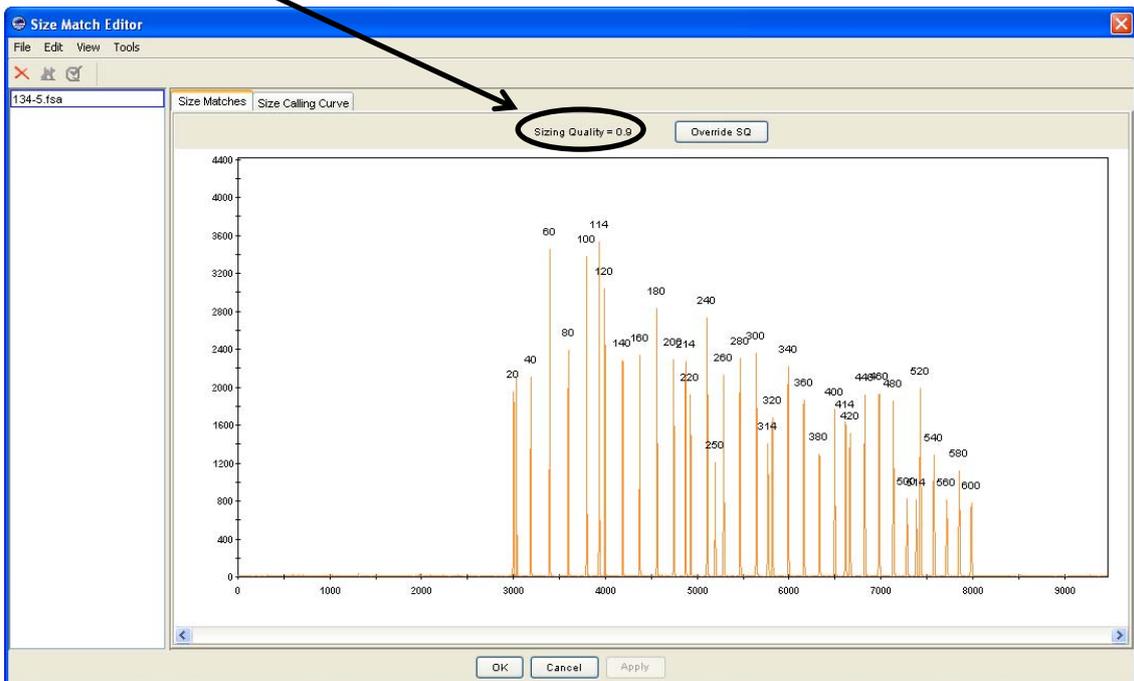
☞ multiplexで泳動した場合は、目的のピークを判別し難い場合があるので、表示される蛍光色素を選択したほう判別しやすくなります。

4. Size Standardの認識確認

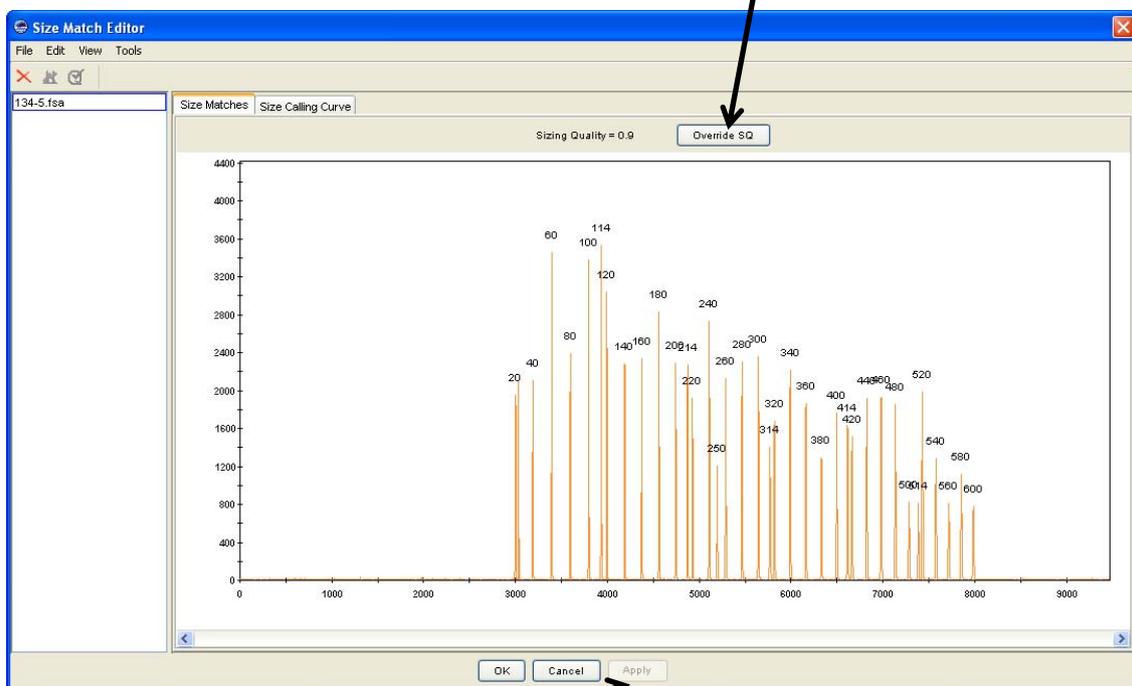
①  をクリックして「Size Match Editor」を開きます。



② 「sq」の値を確認します。



③Size Standardが正しく認識されている場合は、「Override SQ」をクリックしてSQを上書きします。



④「Apply」をクリックしてSize Match Editorを終了します。

●*Size Standardが正しく認識されていない場合は、次ページからの手順に従って手動での修正が必要です。

結核菌 VNTR ハンドブック

保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編（第一版）

2012年10月編

執筆者一覧

大阪市立環境科学研究所 和田 崇之

- 1) 結核菌 VNTR 型別のための鋳型 DNA（テンプレート）作成
- 2) 結核菌 VNTR 型別における PCR
- 3) JATA(12)-VNTR 型別におけるアガロースゲル電気泳動

千葉県衛生研究所 横山 栄二

- 4) PCR 産物のキャピラリー電気泳動シークエンサーを用いた電気泳動
- 5) キャピラリー電気泳動シークエンサーによる自動アリルコール設定
- 6) PCR 産物のキャピラリー電気泳動シークエンサーによるサイジング

地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会
マニュアル作成ワーキンググループ

宮城県保健環境センター
畠山 敬

千葉県衛生研究所
横山 栄二

大阪市立環境科学研究所
和田 崇之、長谷 篤

東京都健康安全研究センター
向川 純、貞升 健志
住友 眞佐美（地方衛生研究所全国協議会 保健情報疫学部会長）