

2016年1月18日

## 2016年前期 ECOG-PCR 精度確認調査について（第1回）

*E. coli* O-genotyping PCR (ECOG-PCR) を皆様の調査・研究でご利用頂きたい、2015年6月より調整済みプライマーミックスの分与を開始致しております。我々としては継続的な精度の維持と向上に努めていきたいと考えております。そこで今回、本法の精度確認と技術的サポートを目的として、これまでにプライマーミックスを分与させていただいた皆様を対象に、第1回の精度確認調査を実施することとしました。本調査の実施は任意ですが、もしお時間が許しましたらご協力いただきますようお願い申し上げます。

宮崎大学 農学部・准教授 井口 純

内容

### (参加機関)

- ・配布4検体（精製 DNA 5ng/μl、各 100μl）について ECOG-PCR を実施
- ・判定結果をメールまたは FAX にて提出

### (宮崎大学井口研)

- ・判定結果（正解）を公表（2月末の予定）
- ・提出された結果の集計を公開（実施機関名は非公開）
- ・必要に応じて各機関への技術的アドバイス・相談を実施

提出期限：**2016年2月19日**（金）

提出先：E-mail → [iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp](mailto:iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp)（井口）

FAX → 0985-58-7507

実施者氏名		連絡先 E-mail	
所属機関			

### 判定結果

検体 No.	Og type	メモ
16QC1		
16QC2		
16QC3		
16QC4		
記入例	Og157	

# 第1回ECOG-PCR 精度確認調査 (2016年2月実施)

## 検体の特徴

ID	O genotype	Serotype*	stx1/stx2/eae	備考
16QC1	Og45	O45:H2	+ / - / +	亜テルル酸塩耐性
16QC2	Og177	O177:H-	- / + / +	亜テルル酸塩耐性
16QC3	Og5	O5:H-	+ / - / +	亜テルル酸塩耐性
16QC4	Og183	O183:H18	+ / - / -	亜テルル酸塩感受性

\*いずれもデンカ生研抗血清対象外のO血清群

参加機関(順不同)

国立感染症研究所  
大阪府立公衆衛生研究所  
動物衛生研究所  
東京都健康安全センター  
岐阜県保健環境研究所  
大阪市立環境科学研究所  
富山県衛生研究所  
和歌山市衛生研究所  
川崎市健康安全研究所  
和歌山県環境衛生研究センター  
茨城県衛生研究所  
農林水産省動物検疫所  
新潟県保健環境科学研究所  
ファルコライフサイエンス  
(計14機関)

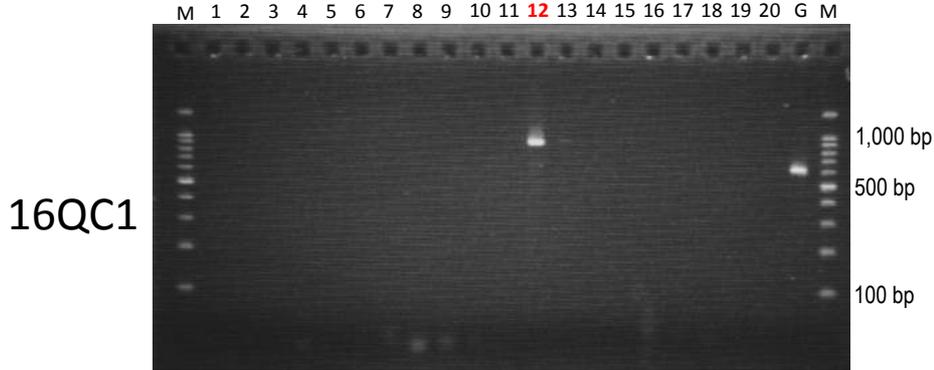
ご参加いただきありがとうございました

以下、宮崎大・井口研究室で実施したすべてのECOG-PCRは  
KAPATaq extra PCR kitを使用しました

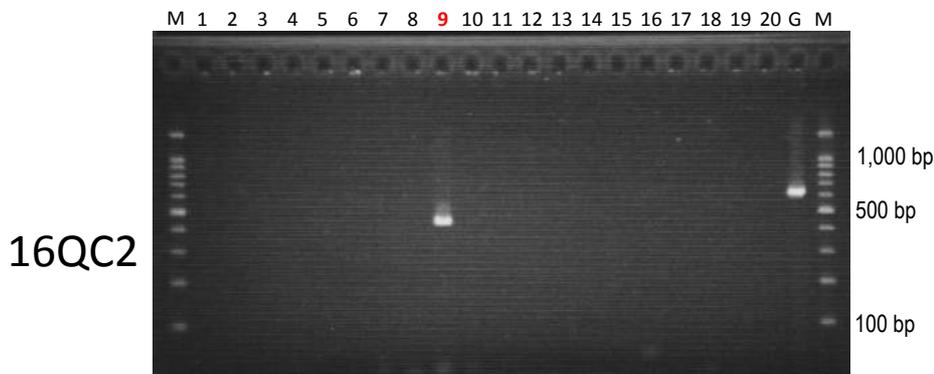
# 第1回ECOG-PCR 精度確認調査

## 宮崎大・井口研での実施例(1)

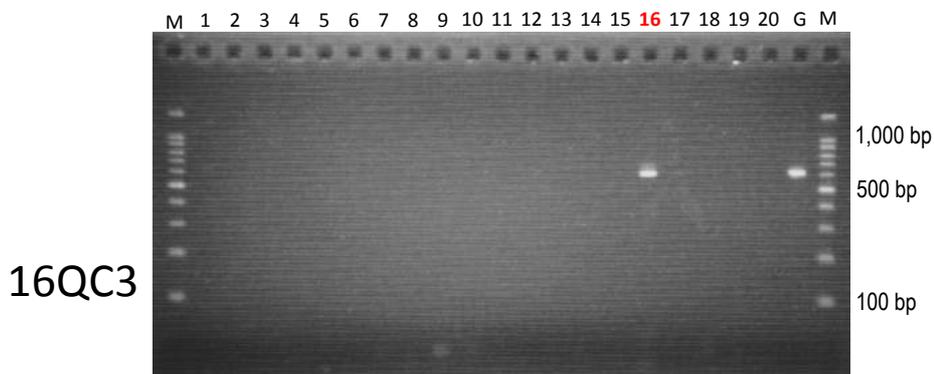
(配布検体と同じ、DNA精製キットで抽出したDNA 5ng/μlを使用)



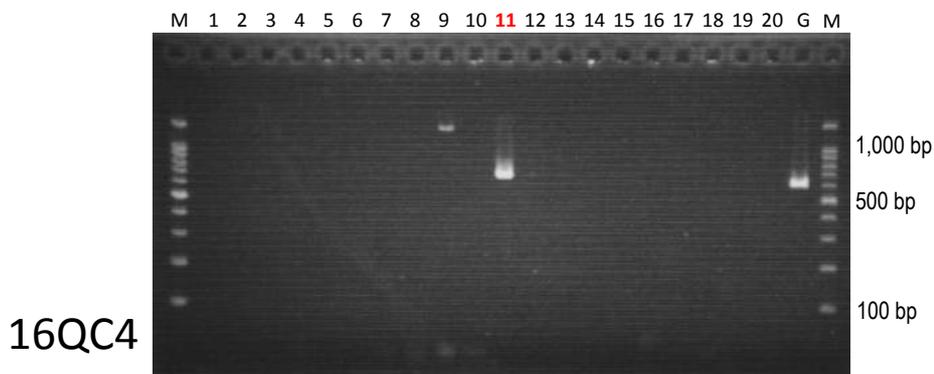
MP-12	
O genotype	(bp)
Og40	1082
<b>Og45</b>	<b>916</b>
OgGp10	774
Og7	610
Og182	510
Og109	409
Og79	333
Og181	261
Og171	212



MP-9	
O genotype	(bp)
Og98	1139
Og96	938
Og59	783
Og69	653
Og82	538
<b>Og177</b>	<b>427</b>
Og71	344
Og95	272
Og93	229



MP-16	
O genotype	(bp)
Og133	1017
OgGp7	813
Og149	709
<b>Og5</b>	<b>566</b>
Og22	458
Og19	389
Og16	302
Og105	246
Og87	167



MP-11	
O genotype	(bp)
Og150	1089
Og30	894
Og84	775
<b>Og183</b>	<b>666</b>
Og75	511
Og113	419
Og160	333
Og138	267
Og132	215

コメント: MP-9 (1,500 bp付近) で非特異的バンド→該当サイズに対象となるOgタイプなし

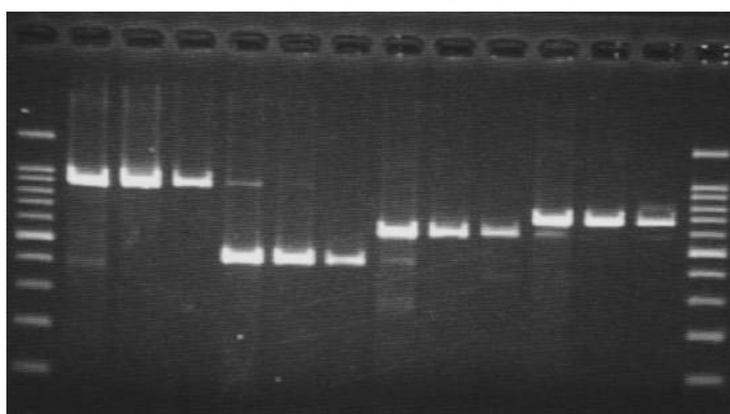
G: *E. coli gyrB* (625 bp), M: 100-bp ladder marker

# 第1回ECOG-PCR 精度確認調査

## 宮崎大・井口研での実施例(2)

PC(コントロールDNAミックス)との横並び泳動による産物サイズ(Ogタイプ)の確認

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Lane	使用したテンプレートDNA	使用したプライマー
1	SSI由来 O45 参考株	Og45 single primer set
2	<b>16QC1</b> (O45 野生株)	MP-12 primer mix
3	PC-H(O45を含むDNAミックス)	MP-12 primer mix
4	SSI由来 O177 参考株	Og177 single primer set
5	<b>16QC2</b> (O177 野生株)	MP-9 primer mix
6	PC-E(O177を含むDNAミックス)	MP-9 primer mix
7	SSI由来 O5 参考株	Og5 single primer set
8	<b>16QC3</b> (O5 野生株)	MP-16 primer mix
9	PC-J(O5を含むDNAミックス)	MP-16 primer mix
10	SSI由来 O183 参考株	Og183 single primer set
11	<b>16QC4</b> (O183 野生株)	MP-11 primer mix
12	PC-J(O183を含むDNAミックス)	MP-11 primer mix

## Q & A

Q. 井口研ではKAPATaqを使用されていますが、他のTaqは使えませんか？

A. 井口研では「安い」という理由でKAPATaqを使用しています。

感染研ではTaKaRa EmeraldAmp PCR Master Mixを使っておられます。

動衛研ではTaKaRa ExTaq Hot Startを使っておられます。

いずれの機関も2年以上ECOG-PCRをご利用頂いておりますが、特に問題は無いようです。

TaKaRa ExTaqを説明書の濃度で使用されている機関もあるようです。

\*「このようなTaq・反応液組成でもうまくいきますよ～」という情報があれば是非井口まで情報提供をお願い致します。

感染研 TaKaRa EmeraldAmp PCR Master Mix	
H2O	7.6
EmeraldAmp	10
Primer mix	2
Template DNA	0.4
total	20 $\mu$ l
反応条件は井口研と同じ	

動衛研 TaKaRa ExTaq Hot Start	
H2O	16.43
10 x buffer	2.5
25mM dNTPs	2
ExTaq HS	0.17
Primer mix	2.9
Template DNA	1
total	25 $\mu$ l
95°C-5m 95°C-30s / 58°C-30s / 72°C-1m (x 30)	

Q. DNAマーカースとの比較では目的サイズよりやや大きい位置にバンドが確認されます。解決方法はありますか？

A. 泳動後に染色が不必要なDye入りローディングバッファーまたはDNAマーカースは展開が早くなったり遅くなったりしますので、本解析ではおすすりできません。

通常の泳動でもDNAマーカースと比較して目的とするサイズよりやや大きい位置にバンドが確認される傾向にありますので、我々の研究室ではバンドの中心ではなく底辺辺りでサイズを予測するようにしています。