

# *E. coli* O-genotyping PCR (Og-typing)

# *E. coli* H-genotyping PCR (Hg-typing)

## プロトコール

(Ver.4, 2022.1.28 版)

\*「DreamTaq Green PCR Master Mix」の反応液組成を追加しました (2022.1.28)

### 1. 概要

大腸菌の O 血清群 (O1 から O187) および H 型 (H1 から H56) について、抗原合成遺伝子 (O 群の場合は主に *wzx* または *wzy*, H 型の場合は主に *fliC*) を PCR プライマーの標的とすることで、それぞれの O 群・H 型を PCR 法で特異的に判定することができます。さらにマルチプレックス化することにより、効率的な網羅的判定が可能となります。宮崎大学農学部井口研究室では、マルチプレックス PCR に用いる調整済みプライマーミックスの有償分与を行っています。

### 2. 反応液組成 (Og-typing、Hg-typing 共通)

○DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific) の場合

| 反応試薬など                   | 1 反応チューブ   | 備考                    |
|--------------------------|------------|-----------------------|
| PCR grade water          | 9.48       |                       |
| DreamTaq Master mix (2x) | 15         |                       |
| 調整済みプライマーミックス*           | 3.52       | 最終濃度はそれぞれ 5 $\mu$ M** |
| Template DNA             | 2          |                       |
| Total                    | 30 $\mu$ l |                       |

○KAPATaq EXtra PCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS) の場合

| 反応試薬など                                 | 1 反応チューブ   | 備考                    |
|----------------------------------------|------------|-----------------------|
| PCR grade water                        | 14.42      |                       |
| 5x KAPA Extra Buffer (without Mg2+)    | 6          |                       |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)              | 3          | 最終濃度は 2.5 mM          |
| dNTP mix (10 mM each dNTP)             | 0.9        |                       |
| KAPA Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) | 0.16       |                       |
| 調整済みプライマーミックス*                         | 3.52       | 最終濃度はそれぞれ 5 $\mu$ M** |
| Template DNA                           | 2          |                       |
| Total                                  | 30 $\mu$ l |                       |

\* *gyrB* プライマーも 3.53  $\mu$ l/反応チューブに調整済み

\*\* Og-typing については、一部濃度が異なります。

### 3. テンプレート DNA

- 各社精製キットで準備した場合 (Og-typing、Hg-typing とともに検出能を確認済み)  
2ng~10ng/ $\mu$ l に調整した DNA を使用

\*当研究室では Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)を使用

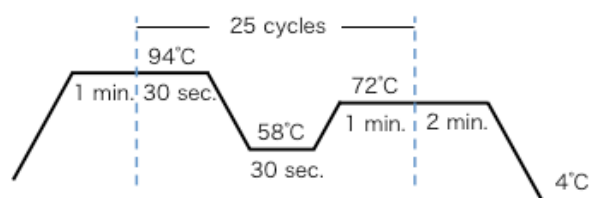
- アルカリ熱抽出で準備した場合 (Og-typing のみ検出能を確認済み)  
LB ブロス培養液 (o/n) 200  $\mu$ l を 10,000g -10min 遠心、上清除去  
50mM NaOH 170  $\mu$ l を加えて懸濁  
100°C-10min 加熱

1M Tris-HCl (pH7.0) 30μl を加え、3-4 回タッピング  
 10,000g-10min 遠心  
 上清を TE バッファーで 5~10 倍希釈したものをテンプレート DNA として使用

- ・ 熱抽出で準備した場合（培養液）（Og-typing のみ検出能を確認済み）  
 LB ブロス培養液 (o/n) 100μl を 10,000g -10min 遠心、上清除去  
 TE バッファー1000μ を加えて懸濁  
 100°C-10min 加熱  
 10,000g-10min 遠心  
 上清をテンプレート DNA として使用
- ・ 熱抽出で準備した場合（コロニー）（Og-typing のみ検出能を確認済み）  
 寒天平板上に生育した 1 コロニー（2-3 mm）を 200-500μl の TE バッファー懸濁  
 100°C-10min 加熱  
 10,000g-10min 遠心  
 上清をテンプレート DNA として使用

#### 4. 熱反応条件

全反応に対して統一した反応条件



#### 5. その他

- ・ ゲル電気泳動で十分に展開することをお勧めします。  
 （例えば、5×TBE buffer / 2% アガロース、40-50 分間泳動）
- ・ Og-typing の場合は 1,500 bp 以上、Hg-typing の場合は 1,000 bp 以上に出現するバンドは、判定には影響しないので、無視して構いません。（時折出ることがあります）
- ・ 判定結果は表現型と区別するために、OgXX または HgXX と表記してください。
- ・ フルセットのプライマーキットを用いても、バンドが得られない場合があります。そのような場合は、OgUT または HgUT (untypeable) と表記してください。
- ・ 一つの検体から 2 種類の結果が得られることがあります。そのような場合は「Og8+Og105」や「Hg3+Hg16」のように表記してください。また Hg-type の場合は、Hg-type と H 型（表現型）の対応パターンがわかっていますので、Hg-typing コントロール DNA の別表を参考にしてください。

・ テンプレート DNA 濃度が高い場合、不特定のバンドが複数確認される場合があります。その  
のような場合は、使用されているテンプレート DNA 濃度をもう一度ご確認ください。

・ 井口研究室での再確認も可能な範囲で対応いたします。井口までご連絡ください。

問い合わせ先

〒889-2192

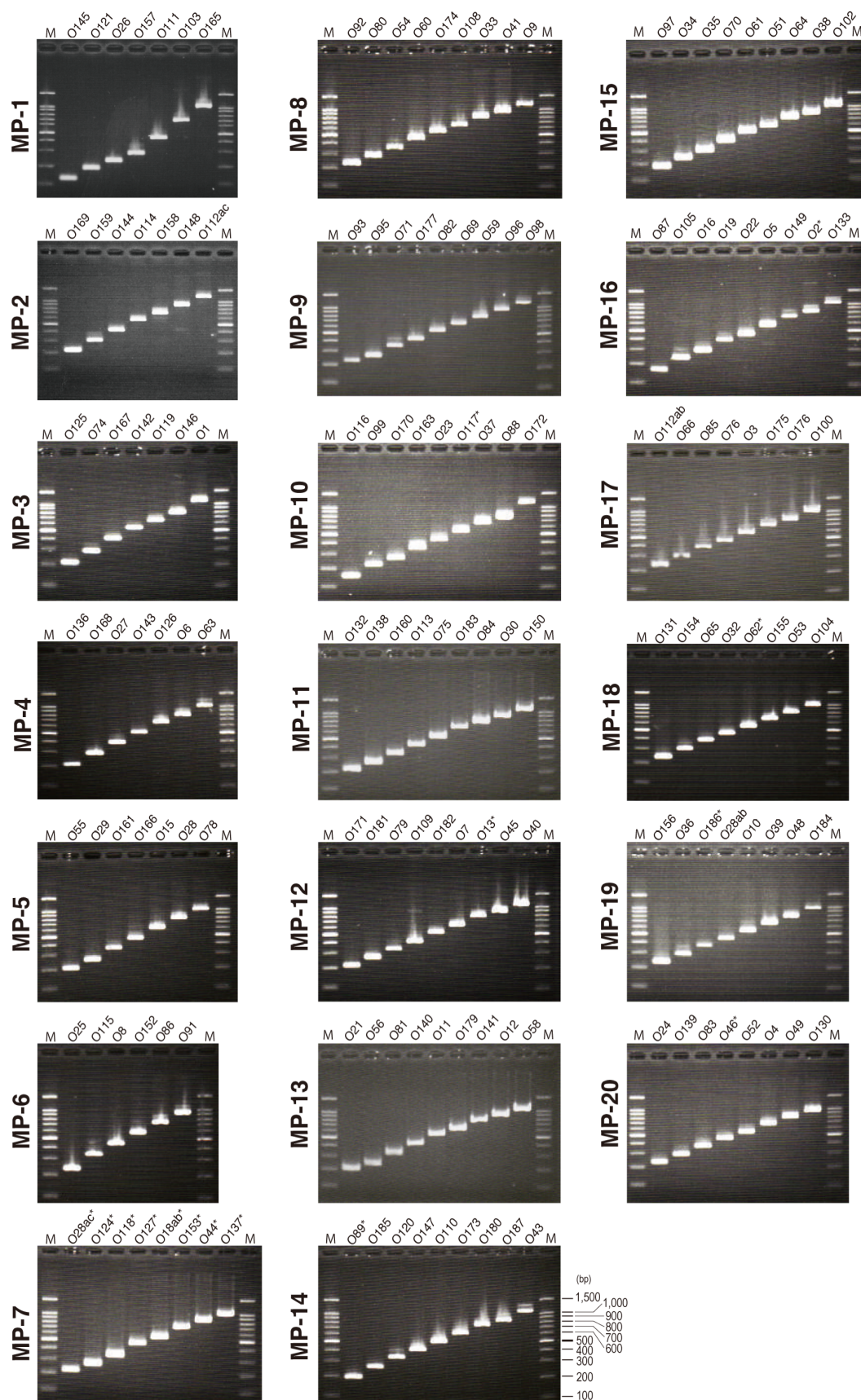
宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

宮崎大学農学部畜産草地科学科 井口純

Tel: 0985-58-7507

[iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp](mailto:iguchi@med.miyazaki-u.ac.jp)

# Og-typing MP-1 から MP-20 の泳動パターン



# Hg-typing MP-A から MP-J の泳動パターン

