

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 1 of 17
---	---	---

1. 原理

本 SOP では、結核研究所抗酸菌部で実施している 24_{Beijing}-VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats ; 反復配列多型)の分析手順を示す(資料 1、2)。本分析では、PCR 反応によって VNTR 領域を増幅後、キャピラリー・シーケンサーを用いてその鎖長を分析(フラグメント解析)し、24ヶ所の VNTR 領域におけるコピー数を同定する。

検査材料として、結核患者から分離培養された *M. tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*) から抽出したゲノム DNA を用いる。ゲノム DNA を鋳型とし、1つの反応溶液で複数の領域を同時に増幅する Multiplex PCR を組み合わせ、24ヶ所の VNTR 領域を 12 反応溶液で増幅する。この PCR 反応に蛍光標識プライマーを用いることで、VNTR 領域の増幅と同時に、フラグメント解析に必要な蛍光色素を PCR 産物に付加する。続くフラグメント解析では、キャピラリー・シーケンサーが5色の蛍光色素を同時に測定することで、1run あたり PCR 産物 4 色と内部分子量マーカー1 色を識別する。したがって、得られた PCR 反応溶液を 4VNTR 領域ずつ混合後、内部分子量マーカーと共にキャピラリー・シーケンサーで分析し、1 検体あたり 6 run で 24 VNTR 領域の分子量を測定する。得られた分子量をもとに、24VNTR 領域毎のコピー数と分子量の換算表に従い、GeneMapper ソフトウェア上で被験菌株の 24_{Beijing}-VNTR プロファイルを同定する。

2. 定義と略語

定義

・ VNTR 法

ゲノム DNA 上に複数存在するミニサテライト様の反復配列領域における反復数(コピー数)の多型を利用した遺伝子型別法であり、結核菌では 2000 年代から国際的に使用されている。VNTR 法を用いて十分な菌株識別能を得るためには、複数の反復配列領域を分析する必要がある。調査地域における結核菌流行株の違いや検査目的に応じ、複数の反復配列領域の組み合わせが提案されている(表 1)。

・ JATA (Japan Anti-Tuberculosis Association) 12、JATA 15

日本国内で分離される結核菌株を少ない解析領域で効率的に菌株識別するため、結核研究所から提案された 12 または 15 ヶ所の VNTR 領域の組み合わせである(資料 3)。自治体間で VNTR 情報を共有・比較するため、JATA12 を共通解析領域として使用することが提案されている。

患者同士の接触が疑われる事例(集団感染疑い等)において菌の同一性を鑑別する場合、JATA12、15 は十分な菌株識別能を有していると考えられている。一方、地域で発生した結核菌株を網羅的に分析し、VNTR 型の一致から帰納的に感染経路を推定する場合には、推定精度を高めるために、他の VNTR 領域を組み合わせる分析が推奨される(24_{Beijing}-VNTR 等、後述)。

・ Supply 15

国際的な標準法として提唱された 15 ヶ所の VNTR 領域の組み合わせである(資料 4)。Supply 15 の二次型別法として、9 ヶ所を追加した Supply 24 も存在する。

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 2 of 17
--	--	--

- ・ *4 HV loci (Four Hyper variable loci; 4カ所の超可変 VNTR 領域)*
国内分離株の約7割は、北京型結核菌(Beijing family genotype)と命名された遺伝系統に属している。北京型結核菌は近縁株の集団であることから、JATA12、JATA15、Supply 15、Supply24では十分に菌株識別されない場合がある。北京型結核菌に対する菌株識別を改善する目的で、4ヶ所の超可変 VNTR 領域(1982、3232、3820、4120)を併用することが国際共同研究から提案されている(資料5)。また、4 HV loci は、国内の地域内感染経路を推定するために有用であることも示されている(資料6)。4 HV loci はコピー数多型に富み、PCR産物が高分子となる場合も多いため(表2)、解像度が低いアガロースゲル電気泳動ではなくキャピラリー・シーケンサーを用いた分子量測定が推奨される。
- ・ *24_{Beijing}-VNTR*
前述の JATA12、JATA15、Supply 15、4 HV loci を含む VNTR 領域の組み合わせである(資料1、資料2、表2)。現状では、国内の結核菌株を最も高い解像度で菌株識別することが可能な VNTR 法であり、地域分子疫学における活用が期待される。キャピラリー・シーケンサーを VNTR 分析に導入する施設が増加するに伴って、24_{Beijing}-VNTR の実施施設数も増えている。

略語一覧

- ・ VNTR: Variable numbers of tandem repeats 反復配列多型
- ・ PCR: Polymerase chain reaction ポリメラーゼ連鎖反応
- ・ TE: Tris-EDTA バッファー (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA [pH 8.0])
- ・ FA: Fragment Analysis フラグメント解析
- ・ JATA: Japan Anti-Tuberculosis Association 公益財団法人結核予防会
- ・ FAM: DNA フラグメント標識用蛍光色素 (青色)
- ・ PET: DNA フラグメント標識用蛍光色素 (赤色)
- ・ VIC: DNA フラグメント標識用蛍光色素 (緑色)
- ・ NED: DNA フラグメント標識用蛍光色素 (黄色)
- ・ LIZ: DNA フラグメント標識用蛍光色素 (オレンジ色)
- ・ *M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*
- ・ 7H9: Middlebrook 7H9 Broth
- ・ MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 3 of 17
--	--	---

3. 工程

3.1 設備・機材と消耗品

3.1.1 設備・機材

- ・ BSL3 実験施設
- ・ クラスⅡ安全キャビネット
- ・ オートクレーブ
- ・ ウォーターバス: 100°Cに設定できるもの
- ・ インキュベーター
- ・ 冷蔵庫、冷凍庫
- ・ 遠心分離機: 1.5~2.0mL チューブ用および 96 穴プレート用
- ・ チューブスタンド
- ・ ボルテックス・ミキサー: VORTEX-GENIE2
- ・ シングルチャンネルマイクロピペット一式
- ・ 8 連チャンネルマイクロピペット: 1.0~2.4 μ L を計量できるもの
- ・ 96 穴サーマルサイクラー
- ・ キャピラリー・シーケンサー: Genetic Analyzer 3500 または SeqStudio (Thermo Fisher Scientific)

3.1.2 消耗品

- ・ 10 μ L 使い捨て白金耳
- ・ 3 mL 使い捨てスポイト
- ・ 1.5mL スクリューキャップチューブ
- ・ 1.5mL チューブ
- ・ 1.5mL クライオチューブ
- ・ 8 連 PCR チューブ
- ・ 96 穴 PCR プレート: サーマルサイクラー及びキャピラリー・シーケンサーに適合するもの
- ・ 96 穴プレート用シール: PCR 用
- ・ 96 穴プレート用アルミシール
- ・ 96 穴プレート用セプタ: Genetic Analyzer 3500 シリーズ用 (Thermo Fisher Scientific)
- ・ ピペット用チップ
- ・ 試薬保冷用クラッシュアイスまたはアイスブロック

3.2 試薬と溶剤

- ・ 固形培地: 1% 小川培地
- ・ 液体培地: MGIT など
- ・ 7H9 Broth またはマイコブロス (極東製薬)
- ・ 1xTE
- ・ 精製水: 滅菌済み、分子生物学用

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 4 of 17
--	--	--

- ・ PCR 反応試薬: ExTaq Hot Start Version with GC buffer I #RR06BG (タカラバイオ)
- ・ プライマー
GeneScan™ Analysis 用カスタム蛍光プライマー (Thermo Fisher Scientific) : 精製グレート脱塩、表 3-1 参照
または MYCOBACTERIUM VNTR Primer Set (24 ローカスの結核菌 VNTR 解析用蛍光プライマーペアセット) (Thermo Fisher Scientific) : 表 3-2 参照
- ・ HiDi™ Formamide (Thermo Fisher Scientific)
- ・ 内部分子量マーカー: Gene Scan™- 1200LIZ Size Standard (Thermo Fisher Scientific)
- ・ Conditioning Reagent 3500 Series (Thermo Fisher Scientific)
- ・ POP-7™ Performance Optimized Polymer 3500 Series (Thermo Fisher Scientific)
- ・ Anode Buffer Container 3500 Series (Thermo Fisher Scientific)
- ・ Cathode Buffer Container 3500 Series (Thermo Fisher Scientific)

3.3 実験操作

3.3.1 DNA の調製

3.3.1.1~3.3.1.4 のいずれかの方法で DNA を調製する。

3.3.1.1 DNA の抽出法(固形培地)

1. *M. tuberculosis* を固形培地で培養する。(up to 2 ヶ月)
2. 1.5 mL スクリューキャップチューブに精製水 (1x TE で代用可) 500 μ L を加える。
3. 培地を混入させないように注意しながら、使い捨て白金耳 (10 μ L) 1/10 エーゼ以上の菌体を上記チューブに移す。
4. 菌懸濁液を含んだ上記チューブを 100°C の湯浴 (#) で 15 分加熱し、滅菌と DNA の熱抽出を行う。この時、チューブトップに付着した菌体も滅菌できるようにチューブ全体を沈めて熱処理する。12,000rpm で 5 分間遠心し、上清を VNTR 分析に用いる。
ドライ恒温槽等を使用する場合は、チューブトップの加熱滅菌処理が不十分になる場合があるため、チューブ内の菌体が滅菌されることを事前に確認しておく。

3.3.1.2 DNA の抽出法(液体培地)

1. *M. tuberculosis* を液体培地で培養する。(up to 2 ヶ月)
2. 1.5mL スクリューキャップチューブに精製水 (1xTE で代用可) 500 μ L を加える。
3. 使い捨てスポイトを用い、液体培地チューブの底部から 50~100 μ L 程度の菌体沈渣を吸い上げ、上記チューブへ移す。
4. 菌懸濁液を含んだ上記チューブを 100°C の湯浴 (#) で 15 分加熱し、滅菌と DNA の熱抽出を行う。この時、チューブトップに付着した菌体も滅菌できるようにチューブ全体を沈めて熱処理する。12,000rpm で 5 分間遠心し、上清を VNTR 分析に用いる。
ドライ恒温槽等を使用する場合は、チューブトップの加熱滅菌処理が不十分になる場合があるため、チューブ内の菌体が滅菌されることを事前に確認しておく。

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 5 of 17
---	---	---

3.3.1.3 保存菌株からの DNA の抽出法 (固形培地)

凍結保存した菌株 (3.3.2.1、後述) から DNA を抽出する場合は、固形培地で増菌し、3.3.1.1の方法に従う。急ぐ場合は、菌塊を含む凍結菌液 50~100 μ L から DNA を抽出することもできる (3.3.1.2 参照)。

3.3.1.4 精製 DNA の利用

ゲノム解析等のために精製した DNA を用いる場合は、精製水を用いて 0.1~1 ng/ μ L 程度に希釈して使用する。

3.3.2 サンプルの保管

3.3.2.1 菌株の保管

7H9 broth 800 μ L を加えて冷蔵保管しておいた 1.5mL クライオチューブに、固形培地あるいは液体培地で対数増殖期まで培養した菌体を加え、-80°C で保管する。

3.3.2.2 DNA サンプルの保管

1 ヶ月以内に使用する場合、4°C で保管する。それ以上使用しない場合、-20~-80°C で保管する。

3.3.3 PCR 反応

24_{Beijing}-VNTR 法における PCR 反応手順を示す。Multiplex PCR を実施することで、96 穴プレート 1 枚あたり最大 8 件体を同時処理できる。

3.3.3.1 Multiplex PCR 用プライマーミックスの調製

MYCOBACTERIUM VNTR Primer Set 使用の場合は 3 の工程から行う。

1. メーカーより納品された 24VNTR 領域の F (Forward) プライマーと R (Reverse) プライマー (合計 48 種類) をそれぞれ 1xTE で希釈し、50~100 μ M とする。
2. 新しい 1.5mL チューブを 24 本用意し、終濃度各 5 μ M となるように 24VNTR 領域の F/R プライマーを精製水で希釈・混合してプライマー・ワーキングストックを調製する。プライマー・ワーキングストックは-30°C で保管する。
3. 新しい 1.5mL チューブを 12 本用意し、表 4 に従って 1~3 領域のプライマー・ワーキングストックを混合して Subset プライマー混合液を調製する。各領域のプライマー終濃度が同一となるよう、1~2 領域の Subset プライマー混合液には精製水を加えて希釈する。
4. 図 1 に従い、Subset プライマー混合液を 96 穴 PCR プレートへ全量移し Subset プライマー・プレートを用意する。作成したプレートは-30°C で保管する。

3.3.3.2 分注用 DNA サンプルの準備

3.3.1 で調製した DNA サンプルを、8 連 PCR チューブに 30 μ L ずつ分注する。

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 6 of 17
--	--	---

3.3.3.3 PCR マスターミックスの調製・分注

- 表 5 に従い、1.5mL チューブに PCR マスターミックスを調製する。ピペットロスを考慮し、実際に実施する反応数よりも多めの反応数分の溶液を調製する。氷上で作業する。
- 新しく用意した 96 穴 PCR プレートの各ウェルに、調製した PCR マスターミックスを 6.0 μ L ずつ分注する (#)。
電動マイクロピペットマンを使用すると効率的に分注できる。

3.3.3.4 プライマーミックスの分注

図 2 に従い、3.3.3.1 において Subset プライマー・プレートに分注した Subset プライマー混合液を、3.3.3.3 で用意したプレートへ 2.4 μ L ずつ分注する。8 連ピペットを用い、6 種類の混合液ずつ、指定列の A-H 行に分注する。8 検体を処理する場合、1 種類のプライマー混合液は合計 8 ウェルに分注される。

3.3.3.5 DNA サンプルの分注

- 図 3 に従い、3.3.3.2 において 8 連チューブに分注した DNA サンプルを、3.3.3.4 で用意したプレートへ 1.6 μ L ずつ分注する。8 連ピペットを用い、1 列から 12 列方向へ分注する。1 種類の DNA サンプルは、指定行の 1-12 列に対し、合計 12 ウェルに分注される。
- 96 穴プレート用シールを貼り、ボルテックス後、スピンドウンする。

3.3.3.6 PCR 反応

サーマルサイクラーを用い、以下の条件で PCR 反応を行う

Hold	1 min	94 °C	} 30cycle
Denature	1 min	94 °C	
Annealing	1 min	60 °C	
Extension	1 min	72 °C	
Final Ext.	3 min	72 °C	
Hold	∞	10 °C	

3.3.3.7 PCR 産物の混合と希釈

- 新しい 96 穴 PCR プレートに精製水を 18 μ L ずつ分注する (#)。
電動マイクロピペットマンを使用すると効率的に分注できる。
- 図 4 に従い、Subset**-1 と**-2 の PCR 反応産物をそれぞれ 1 μ L (#) ずつ加え、20 μ L の Set A~F 希釈混合液 (##) を調製する。
リキッドハンドリングに注意する。
##フラグメント解析で検出されるピークの蛍光強度に合わせて希釈倍率を調製する。
- 96 穴プレート用シールを貼り、ボルテックス後、スピンドウンする。

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 7 of 17
--	--	---

3.3.4 フラグメント解析

混合・希釈した PCR 産物の塩基長を測定する。SetA~F にはそれぞれ 4VNTR 領域が混合されているので、1 検体あたり 6 セットで 24VNTR 領域を解析する。

3.3.4.1 フラグメント解析用プレートの用意

1. 表 6 に従い、内部分子量マーカーと HiDi Formamide を氷上で混合し、HiDi マスターミックスを調製する。
2. 図 5 に従い、HiDi マスターミックスを新しい 96 穴 PCR プレートの各ウェルに 9 μ L ずつ分注する。解析する Set A~F 希釈混合液数分のウェルに分注する（8 検体の場合、48 ウェル）。
3. 3.3.3.7 において調製したサンプル (Set A~F 希釈混合液) を 1 μ L (#) ずつ添加し、計 10 μ L とする。
#リキッドハンドリングに注意する。
4. 96 穴プレート用シールを貼り、ボルテックス後、スピンドウンする。
5. サーマルサイクラーを用い、95 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱処理をする。
6. PCR 用プレート底部を氷水につけて 5 分間急冷し、スピンドウンする。

3.3.4.2 キャピラリー・シーケンサーのラン

キャピラリー・シーケンサー (Genetic Analyzer 3500 シリーズまたは SeqStudio) の取扱説明書に従い、フラグメント解析を実施する。

3.3.4.3 GeneMapper ソフトウェアを用いたコピー数解析

キャピラリー・シーケンサーの制御 PC にインストールされている GeneMapper を使用し、以下いずれかの方法で 24VNTR 領域のコピー数を同定する。

1. コピー数既知サンプル (3.4 参照) から得られたスタッターピークを参考にして検体のコピー数を同定する。
 2. 24VNTR 各領域のコピー数における分子量分布範囲を定めた Bin(#) を参考にして、検体のコピー数を同定する(##)。
- # Genetic Analyzer 3500 シリーズおよび SeqStudio 用の Bin set と GeneMapper トレーニング用データセットを結核研究所抗酸菌部より入手できる。配布された Bin set の導入法や GeneMapper の使用法については、Thermo Fisher Science に問い合わせできる。
- ## ポリマー、バッファー、キャピラリー等の劣化状況に応じ、PCR 産物の分子量が変動することが知られている。このため、コピー数既知サンプル (4.6 参照) をポジティブコントロールとして同時に泳動し、分析が適切に実施されていることを確認する必要がある。

3.4 Quality control

VNTR 分析の精度保証のため、コピー数既知株の DNA を同時に分析する。コピー数既知株として、H37Rv (ATCC27294) 等を使用する (表 2)。VNTR 分析に用いる H37Rv の ゲノム DNA は、

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 8 of 17
--	--	---

結核研究所抗酸菌部より入手できる。必要に応じ、結核研究所抗酸菌部において年1回実施される、VNTR 外部精度評価事業に参加する。

4. 関連資料

- 資料1. Iwamoto, Tomotada et al. “Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru.” PloS one vol. 7,11 (2012): e49651. doi:10.1371/journal.pone.0049651
- 資料2. 日本結核・非結核性抗酸菌症学会. 抗酸菌検査ガイド 2020
- 資料3. 前田伸司、他. “国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム.” vol. 83,10 (2008): 673-8.
- 資料4. Supply, Philip et al. “Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*.” Journal of clinical microbiology vol. 44,12 (2006): 4498-510. doi:10.1128/JCM.01392-06
- 資料5. Allix-Béguec, Caroline et al. “Proposal of a consensus set of hypervariable mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat loci for subtyping of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates.” Journal of clinical microbiology vol. 52,1 (2014): 164-72. doi:10.1128/JCM.02519-13
- 資料6. Murase, Yoshiro et al. “Prediction of Local Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates of a Predominantly Beijing Lineage by Use of a Variable-Number Tandem-Repeat Typing Method Incorporating a Consensus Set of Hypervariable Loci.” Journal of clinical microbiology vol. 56,1 e01016-17. 26 Dec. 2017, doi:10.1128/JCM.01016-17

5. 謝辞

本 SOP は AMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「オミックス情報に基づく結核感染制御技術の開発研究」研究代表者 御手洗 聡 課題管理番号 JP20fk0108063 における研究の一環として作成した。

本 SOP は以下の執筆者により作成された。

- 村瀬良朗 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科
- 岩本朋忠 神戸市環境保健研究所感染症部
- 有川健太郎 神戸市環境保健研究所感染症部
- 大薄麻未 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科
- 森重雄太 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科
- 下村佳子 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 9 of 17
--	--	---

細谷真紀子 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科

御手洗聡 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部

6. 改訂履歴

改訂日付	Version:no	改訂内容
2023/5/10	1.1	Thermo Fisher Scientific より販売されている MYCOBACTERIUM VNTR Primer Set に対応した。3.2、3.3.1、表 3-2 の該当項目を加筆、修正した。

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 10 of 17
--	--	--

表 1. よく用いられる VNTR 領域の組み合わせ一覧

JATA番号	名称	領域	JATA 12	JATA 15	JATA 18	Supply 15	Supply 24	4 HV loci	24-Beijing
1	Mtub04	0424	○	○	○	○	○		○
2	MIRU 10	0960	○	○	○	○	○		○
3	Mtub21	1955	○	○	○	○	○		○
4	Mtub24	2074	○	○	○				○
5	QUB 11b	2163b	○	○	○	○	○		○
6		2372	○	○	○				○
7	MIRU 26	2996	○	○	○	○	○		○
8	QUB 15	3155	○	○	○				○
9	MIRU 31	3192	○	○	○	○	○		○
10		3336	○	○	○				○
11	QUB 26	4052	○	○	○	○	○		○
12		4156	○	○	○	○	○		○
13	QUB 18	1982		○	○			○	○
14	QUB 11a	2163a		○	○				○
15	ETR A	2165		○	○	○	○		○
16		3232			○			○	○
17		3820			○			○	○
18		4120			○			○	○
19	Mtub39	3690				○	○		○
20	MIRU 40	0802				○	○		○
21	MIRU 4	0580				○	○		○
22	Mtub30	2401				○	○		○
23	MIRU 16	1644				○	○		○
24	ETR C	0577				○	○		○
25	MIRU 02	0154					○		
26	MIRU 23	2531					○		
27	MIRU 39	4348					○		
28	MIRU 20	2059					○		
29	MIRU 24	2687					○		
30	MIRU 27	3007					○		
31	Mtub 29	2347					○		
32	ETR B	2461					○		
33	Mtub34	3171					○		

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 11 of 17
--	--	--

表 2. 既知の菌株における 24^{Beijing}-VNTR 各領域のコピー数およびコピー数と領域長の対応表

JATA番号	領域名	H37Rvのコピー数	理論値 (bp)
1	0424	2	537+51n
2	0960	3	484+53n
3	1955	1	210+57n
4	2074	4	14+56n
5	2163b	5	202+69n
6	2372	2	246+57n
7	2996	3	285+51n
8	3155	4	71+54n
9	3192	3	492+53n
10	3336	8	194+59n
11	4052	5	324+111n
12	4156	3	190+59n
13	1982	5	231+78n 超可変VNTR領域
14	2163a	2	171+69n
15	2165	3	195+75n
16	3232	4	182+56n 超可変VNTR領域
17	3820	3	273+57n 超可変VNTR領域
18	4120	2	333+57n 超可変VNTR領域
19	3690	5	272+58n
20	0802	1	354+54n
21	0580	3'	175+77n
22	2401	2	247+58n
23	1644	2	565+53n
24	0577	4	44+58n

表 3-1. GeneScan™ Analysis カスタム蛍光標識プライマー一覧

Subset名	領域名	蛍光色素	Forward プライマー名	Forwardプライマー 配列 (5'→3')	Reverse プライマー名	Reverse 配列 (5'→3')
A-1	3232	FAM	FAM_3232_F	CCCCAGCCTTACGACTGA*	3232_R	GTCGGGCTTGGTGAAGG
	4156	PET	PET_4156_F	CGTCCGAGCGACATCAC*	4156_R	AGGATCGAGCGGTCCAG
A-2	0424	VIC	Mtub04_F	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT	VIC_Mtub04_R	GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC*
	1955	NED	NED_1955_F	AGACGTCAGATCCCAGTT*	1955_R	ACCCGACAACAAGCCCA
B-1	3820	VIC	VIC_3820_F	ACCTTCATCCTTGGCGAC*	3820_R	TGCGCGGTGAATGAGACG
	2074	PET	PET_2074_F	TGTGTCACTGACGATTTCAAGG*	2074_R	TGGCCGGCAAATAATGGATGC
B-2	2372	NED	NED_2372_F	AGGTGAGGATCGGGTTGG*	2372_R	ACCACGCTTCAAGAACCAG
	3155	FAM	FAM_3155_F	GCCAGCCGTAAACCCGACCAG*	3155_R	GGCCCGGAAATTCGCAGTGG
C-1	3336	FAM	FAM_3336_F	CCACCCGGATCCAGGAAT*	3336_R	CGGGATTCAACCACGATCTC
	0960	NED	MIRU10_F	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	NED_MIRU10_R	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT*
C-2	2996	PET	MIRU26_F	TAGGTACTACCGTCAAACTCTGTGAC	PET_MIRU26_R	CATAGCGACCAGGCGAATAG*
	3192	VIC	MIRU31_F	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	VIC_MIRU31_R	GTGCCGACGTGGTCTTGAT*
D-1	2163a	FAM	FAM_11a_F	CGTGATGTTGATCGGGATGT*	11a_R	ACCCTGGAGTCTGGCATC
	4120	NED	NED_4120_F	GTTCAACCCGGAGCCAACC*	4120_R	GAGGTGGTTTCGTGGTCC
D-2	2163b	VIC	VIC_11b_F	CCGATGTAGCCCGTGAAGA*	11b_R	AGGGTCTGATTGGCTACTCA
	4052	PET	PET_4052_F	GAGGTATCAACGGGCTTGT*	4052_R	GAGCCAAATCAGGTCCGG
E-1	1982	VIC	VIC_Q18_F	ATCGTCAGCTCGGGAATAGT*	Q18_R	AATACCGGGGATATCGGTTCC
	0580	FAM	FAM_MIRU04_F	GCGCGAGAGCCCGAAGTGC*	MIRU04_R	GCGCAGCAGAAAACGTCAGC
E-2	0802	NED	NED_MIRU40_F	GGTTGCTGGATGACAACGTGT*	MIRU40_R	GGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
	1644	PET	MIRU16_F	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA	PET_MIRU16_R	CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC*
F-1	0577	NED	NED_ETR_C_F	GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG*	ETR_C_R	GCGTCTTGACCTCCACGAGTG
	2165	FAM	FAM_ETR_A_F	AAATCGGTCCCACCTTCTTAT*	ETR_A_R	CGAAGCCTGGGTGCCCGCGATTT
F-2	2401	VIC	VIC_Mtub30_F	CTTGAAGCCCGGTCTCATCTGT*	Mtub30_R	ACTTGAACCCCCACGCCCATTAGTA
	3690	PET	PET_Mtub39_F	CGGTGGAGGCGGATGAACGTTCTTC*	Mtub39_R	TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG

*印のプライマーに蛍光色素が結合

n: コピー数

Institution
Laboratory name
結核研究所抗酸菌部結核
菌情報科
Location
東京都清瀬市松山3-1-24
Head/Responsible person
村瀬 良朗

SOP (Standard Operating Procedure)
キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法
の標準作業手順書

Code:
Version: no.1.1
Date: of release
2023/May./10
Page: 12 of 17

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 13 of 17
--	--	--

表 3-2. MYCOBACTERIUM VNTR Primer Set (24 ローカスの結核菌 VNTR 解析用蛍光プライマーペアセット)

Forward/Reverse プライマーペアミックス(終濃度 各 5 μM)		
	プライマーミックス名	蛍光色素
1	1955_Mtub21	NED
2	424_Mtub04	VIC
3	4156_QUB-4156	PET
4	3232_QUB-3232	FAM
5	2074_JATA2074	PET
6	2372_JATA2372	NED
7	3155_QUB-15_JATA 3155	FAM
8	3820_VNTR 3820	VIC
9	960_MIRU 10	NED
10	2996_MIRU 26	PET
11	3192_MIRU 31	VIC
12	3336_QUB-3336	FAM
13	2163a_QUB-11A	FAM
14	4120_VNTR 4120	NED
15	4052_QUB-26	PET
16	2163b_QUB-11B	VIC
17	580_MIRU 4_ETR D	FAM
18	1644_MIRU 16	PET
19	802_MIRU 40	NED
20	1982_QUB-18	VIC
21	2165_ETR A	FAM
22	577_ETR C	NED
23	2401_Mtub30	VIC
24	3690_Mtub39	PET

発注番号 A51397JP

製品番号 A54818JP

表 4. Subset プライマー混合液の調製

混合するプライマーの組み合わせ

Subset名	A-1	A-2	B-1	B-2	C-1	C-2	D-1	D-2	E-1	E-2	F-1	F-2
Primer 1	3232 (FAM)	0424 (VIC)	3820 (VIC)	2074 (PET)	3336 (FAM)	0960 (NED)	2163a (FAM)	2163b (VIC)	1982 (VIC)	0580 (FAM)	0577 (NED)	2401 (VIC)
Primer 2	4156 (PET)	1955 (NED)		2372 (NED)		2996 (PET)	4120 (NED)	4052 (PET)		0802 (NED)	2165 (FAM)	3690 (PET)
Primer 3				3155 (FAM)		3192 (VIC)				1644 (PET)		

調製液量 (μL)

Subset名	A-1	A-2	B-1	B-2	C-1	C-2	D-1	D-2	E-1	E-2	F-1	F-2
Primer 1	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Primer 2	0.8	0.8	0	0.8	0	0.8	0.8	0.8	0	0.8	0.8	0.8
Primer 3	0	0	0	0.8	0	0.8	0	0	0	0.8	0	0
精製水	0.8	0.8	1.6	0	1.6	0	0.8	0.8	1.6	0	0.8	0.8
総量	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
Primer 1	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Primer 2	40	40	0	40	0	40	40	40	0	40	40	40
Primer 3	0	0	0	40	0	40	0	0	0	40	0	0
精製水	40	40	80	0	80	0	40	40	80	0	40	40
総量 (μL)	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120

Institution
Laboratory name
 結核研究所抗酸菌部結核
 菌情報科
 Location
 東京都清瀬市松山3-1-24
 Head/Responsible person
 村瀬 良朗

SOP (Standard Operating Procedure)
 キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法
 の標準作業手順書

Code:
 Version: no.1.1
 Date: of release
 2023/May./10
 Page: **14** of **17**

Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 15 of 17
--	--	--

図1. Subsetプライマー・プレートにおけるSubsetプライマー混合液の配置図

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	A-1	A-2	B-1	B-2	C-1	C-2						
D												
E												
F	D-1	D-2	E-1	E-2	F-1	F-2						
G												
H												

表 5. PCR マスターミックスの調製

	1反応分 (μ L)	110反応分* (μ L)
H ₂ O	0.15	17
2 x GC Buffer I	5.0	550
dNTPs Mixture	0.8	88
Ex Taq HS	0.05	6
Total	6.0	660

*8検体分析する場合、96反応 (1検体あたり12反応) 行うため、多めに110反応程度調製する

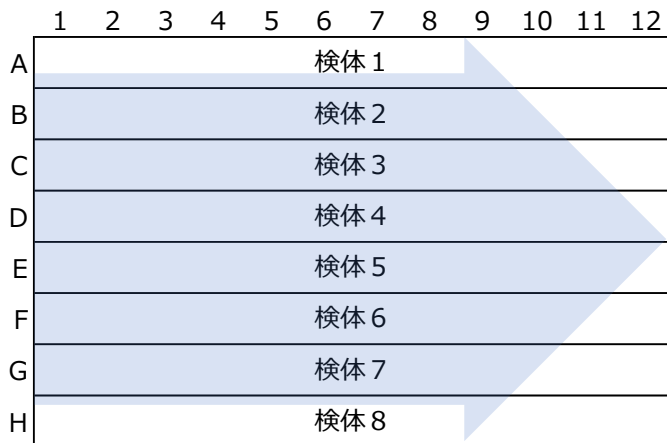
図 2. プライマーミックスの分注

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
検体1	A	Subset_A-1	Subset_A-2	Subset_B-1	Subset_B-2	Subset_C-1	Subset_C-2	Subset_D-1	Subset_D-2	Subset_E-1	Subset_E-2	Subset_F-1	Subset_F-2
検体2	B												
検体3	C												
検体4	D												
検体5	E												
検体6	F												
検体7	G												
検体8	H												

12種類のSubsetプライマー混合液を同じ列に分注していく。8検体分析する場合、A~H行の計8行に分注する。8連チャンネルマイクロピペットを用い、6種類 (Subset_A-1~C-2とSubset_D-1~F-2) ずつ分注する。

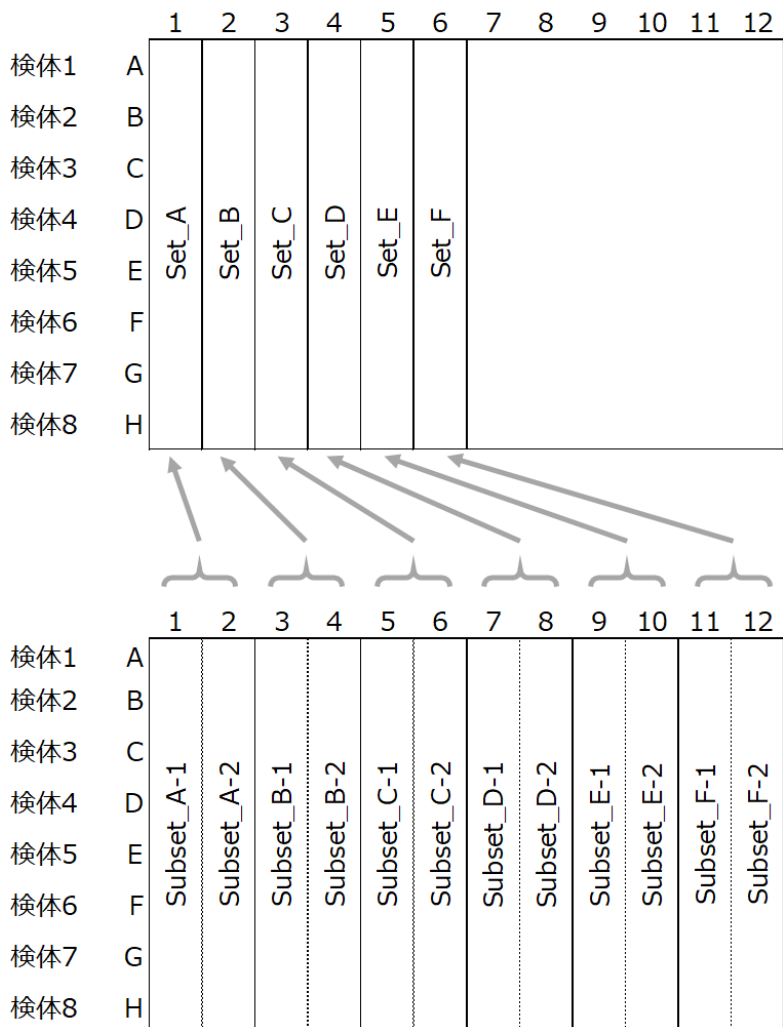
Institution Laboratory name 結核研究所抗酸菌部結核 菌情報科 Location 東京都清瀬市松山3-1-24 Head/Responsible person 村瀬 良朗	SOP (Standard Operating Procedure) キャピラリー・シーケンサーを用いた結核菌VNTR法 の標準作業手順書	Code: Version: no.1.1 Date: of release 2023/May./10 Page: 16 of 17
--	--	--

図3. DNAサンプルの分注



DNAサンプルを同じ行に分注していく。
DNAサンプルごとに任意の行を決め、1～12列の計12列に分注する。8連チャンネルマイクロピペットを用い、全サンプルを同時に分注する。

図4. PCR産物の混和と希釈



検体ごとに、2種類のSubset PCR産物をまとめる。8検体を分析する場合、96反応液（12反応液×8検体）を48溶液にまとめる。

