

図3 *V. cholerae* O1 検出に及ぼすアルカリペプトン水の影響 (1)

*V. cholerae* O1 Inaba 株を 0 CFU (lanes 1, 4, 7), 1 CFU (lanes 2, 5, 8), および 100CFU (lanes 3, 6, 9) となるように冷凍エビ 25g に接種し、一次増菌培地であるアルカリペプトン水 (lanes 1-3, pH9.2, 1% NaCl; 4-6, pH8.6, 0% NaCl; 7-9, pH8.6, 1% NaCl) 225ml を添加後、37°C で静置培養した。培養後、10 倍希釈溶液 1μl を鋳型 DNA として *ctxA* 遺伝子の検出を行った。M, 1kb-ladder; lane 10, blank

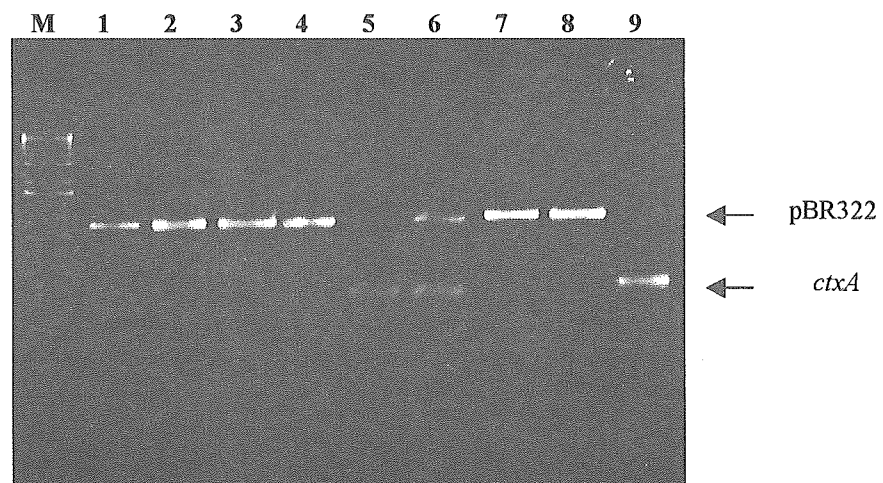


図4 *V. cholerae* O139 検出に及ぼすアルカリペプトン水の影響 (1)

*V. cholerae* O139 Bengal 株を 0 CFU (lanes 1, 4, 7), 1 CFU (lanes 2, 5, 8), および 100CFU (lanes 3, 6, 9) となるように冷凍エビ 25g に接種し、一次増菌培地であるアルカリペプトン水 (lanes 1-3, pH8.6, 0% NaCl; 4-6, pH9.2, 1% NaCl; 7-9, pH8.6, 1% NaCl) 225ml を添加後、37°C で静置培養した。培養後、10 倍希釈溶液 1μl を鋳型 DNA として *ctxA* 遺伝子の検出を行った。M, 1kb-ladder

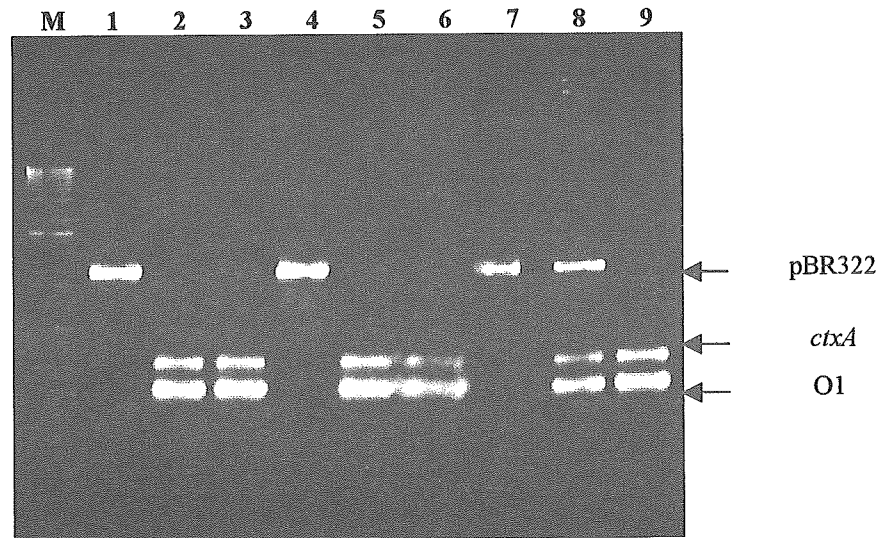


図5 *V. cholerae* O1 検出に及ぼすアルカリペプトン水の影響 (2)

図3と同様に、*V. cholerae* O1 Inaba 株について冷凍エビへの添加回収試験を行った。0 CFU (lanes 1, 4, 7), 1 CFU (lanes 2, 5, 8)および100CFU(lanes 3, 6, 9)接種サンプル、ならびにアルカリペプトン水の条件については図4と同様に行い、*ctxA* 遺伝子に加え、O1, O139 特異的遺伝子の同時検出を行った。M, 1kb-ladder

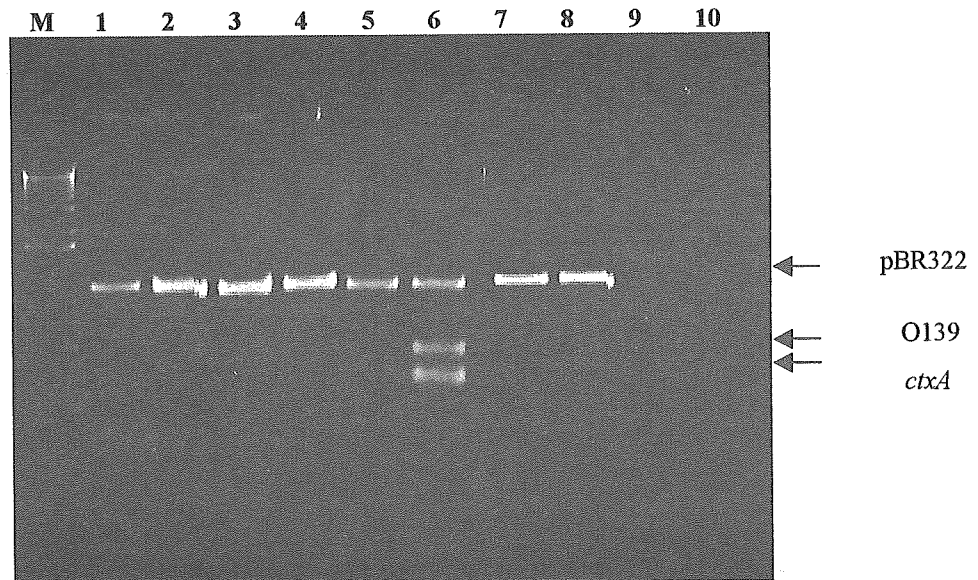


図6 *V. cholerae* O139 検出に及ぼすアルカリペプトン水の影響 (2)

図4と同様に、*V. cholerae* O139 Bengal 株について冷凍エビへの添加回収試験を行った。0 CFU (lanes 1, 4, 7), 1 CFU (lanes 2, 5, 8), および100CFU(lanes 3, 6, 9)接種サンプルおよびアルカリペプトン水の条件については図4と同様に行い、*ctxA* 遺伝子に加え、O1, O139 特異的遺伝子の同時検出を行った。M, 1kb-ladder, lane 10, blank

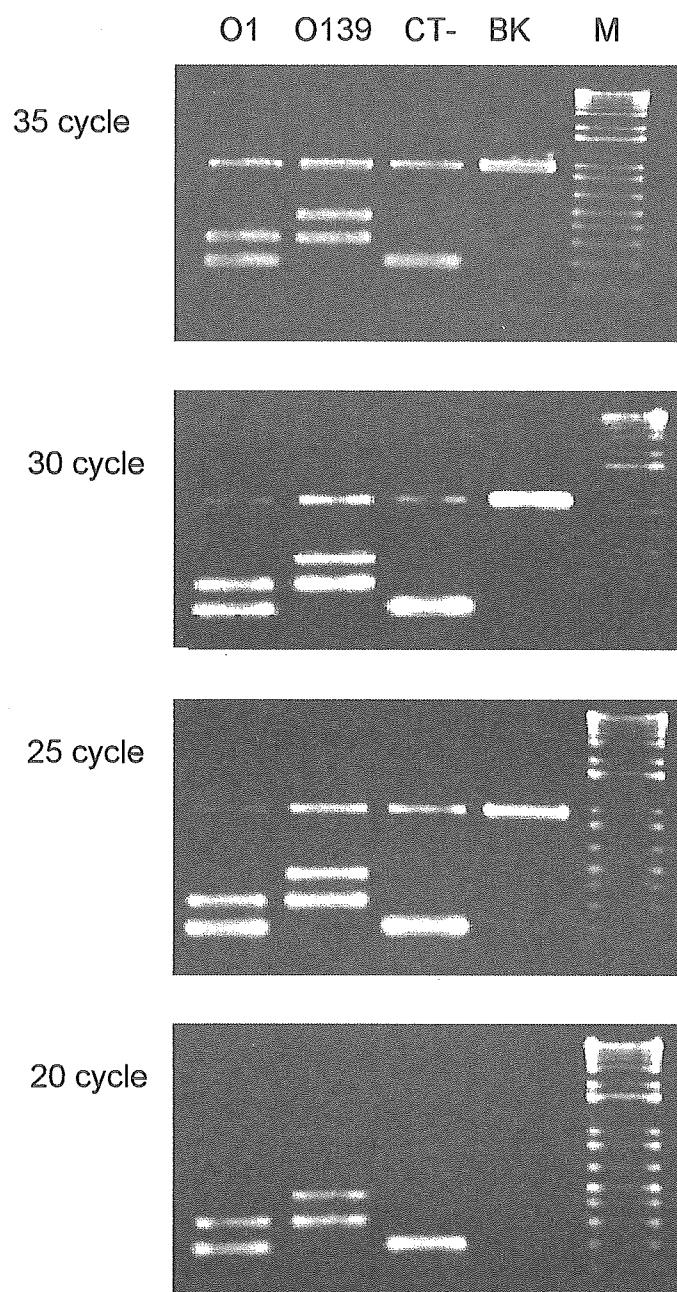


図7 PCR サイクル数の変動による検出感度の影響評価(1)  
*V. cholerae* O1 Inaba, O139 Bengal, O1 (*ctxA*-)株一夜培養液用いて、図6で示した Multiplex PCR 法による当該遺伝子群の検出を行った。20 サイクル反応系では若干の検出感度の低下が認められる。

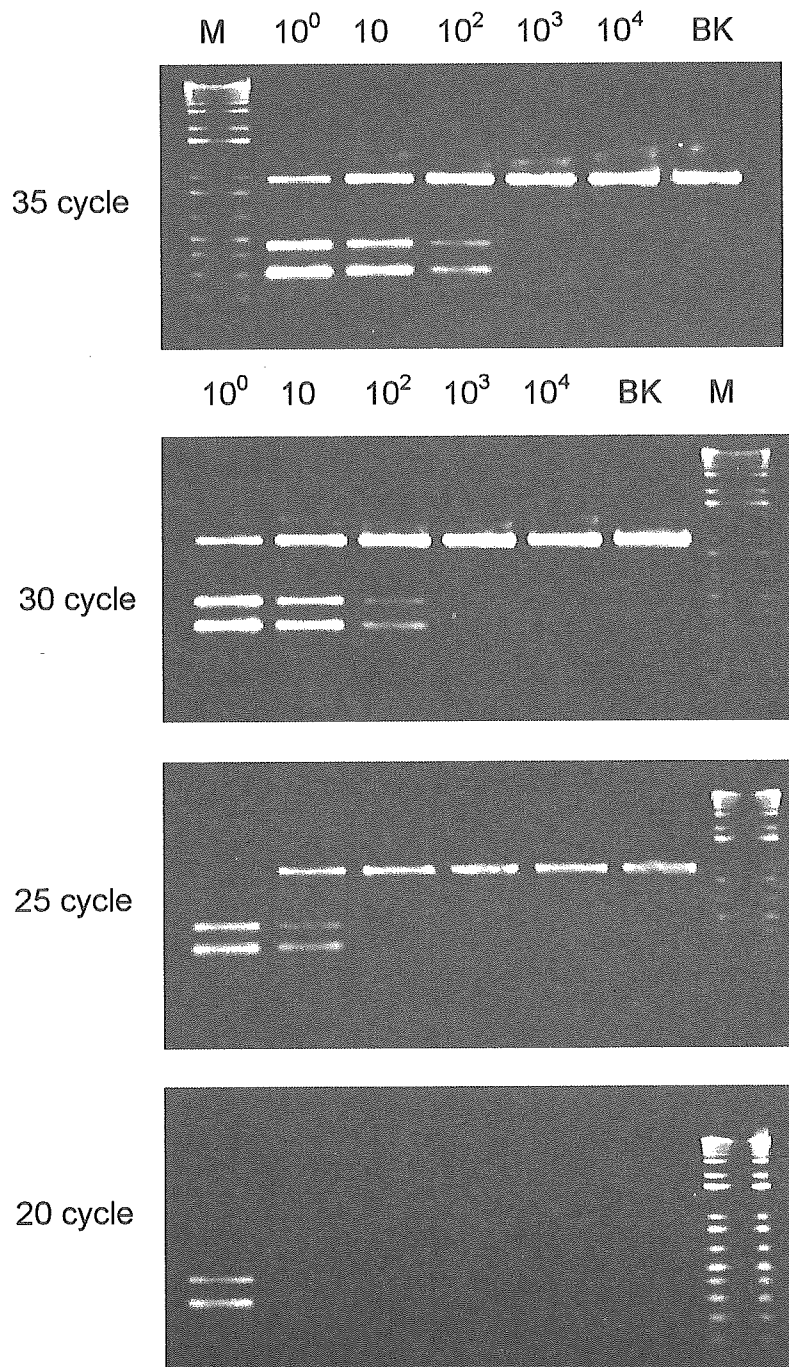


図8 PCRサイクル数の変動による検出感度の影響評価(2)

*V. cholerae* O139 Bengal 株一夜培養菌液について、 $10^0$ - $10^4$  希釈液を作成し、これらを鋳型として Multiplex PCR を 20、25、30、および 35 サイクルの反応サイクルで行った。

条件1  
denature 1分  
annealing 1分  
extension 1分

条件2  
denature 30秒  
annealing 30秒  
extension 1分

条件3  
denature 30秒  
annealing 30秒  
extension 30秒

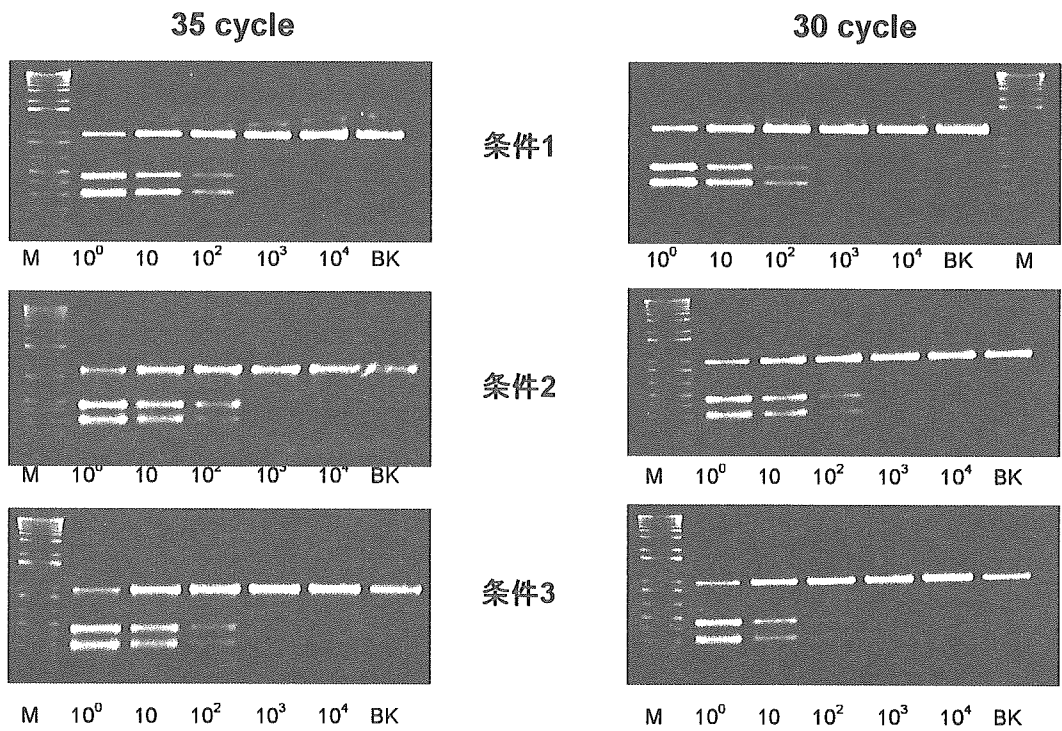


図9 PCR反応時間の検討

図8と同様に、*V. cholerae* O139 Bengal 株一夜培養菌液について、 $10^0$ - $10^4$  希釈液を作成し、これらを鋳型として Multiplex PCR を行った。反応時間は条件1-3 とし、サイクル数は 35 もしくは 30 サイクルとした。

表1 供試 PCR プライマー

Gene	Primer	Sequences (5' to 3')	Size (bp)	PCR conditions	References				
<i>ctxA</i>	Forward	ACAGAGTGAGTACTTTGACC	308	94°C, 1'; 55°C, 1', 72°C, 1' (35 cycles)	5				
	Reverse	ATACCATCCATATATTTGGGAG							
O1	Forward	GTTTCACTGAACAGATGGG	192		94°C, 1'; 55°C, 1', 72°C, 1' (35 cycles)	5			
	Reverse	GGTCATCTGTAAGTACAAC							
O139	Forward	AGCCTCTTTATTACGGGTGG	449			94°C, 1'; 55°C, 1', 72°C, 1' (35 cycles)	5		
	Reverse	GTCAAACCCGATCGTAAAGG							
pBR322	Forward	GTCACCCTGGATGCTGTAG	1000				94°C, 1'; 55°C, 1', 72°C, 1' (35 cycles)		
	Reverse	GGCTGGTAAGAGCCGCGAG							
16s rDNA	16S_008fwd	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	510					94°C, 1'; 55°C, 1', 72°C, 1' (35 cycles)	3
	16S_517rvs	ATTACCGCGGCTGCTGG							
16s-23s	prVC-F+	TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG	301	94°C, 1'; 55°C, 1', 72°C, 1' (35 cycles)					4
	prVC-R-	AGTCACTTAACCATAACAACCCG							