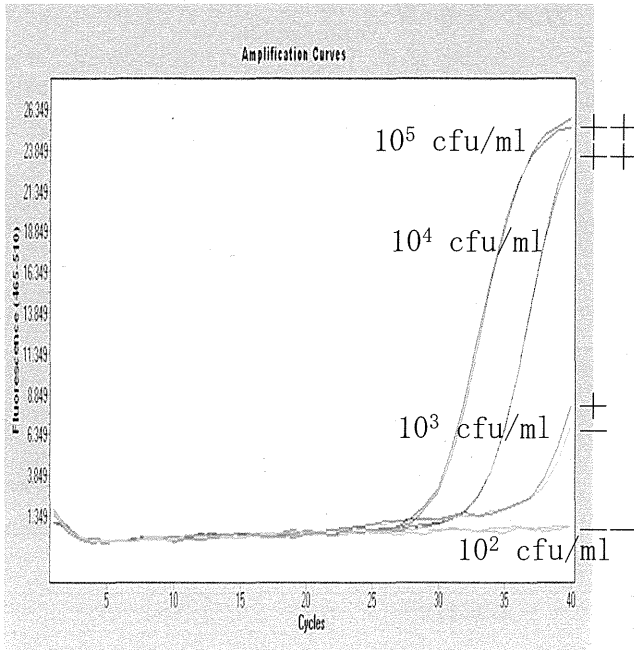
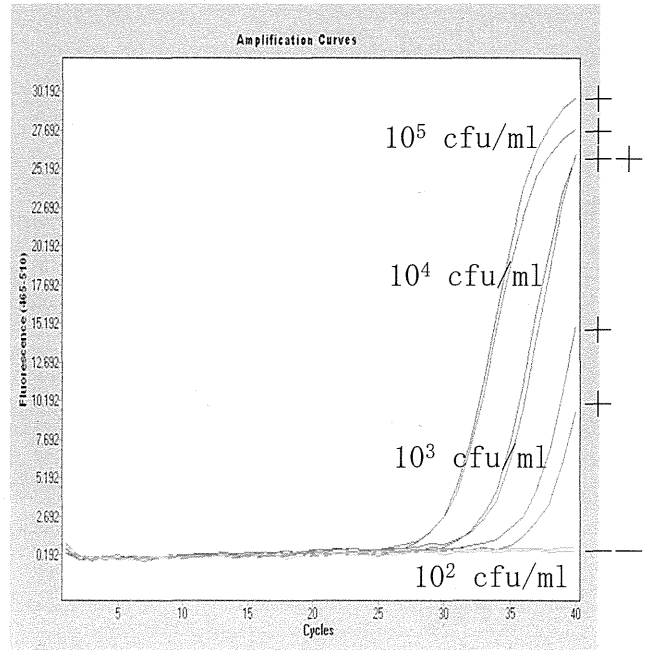


図 15 - 2 Nielsenらの方法でのABI7500fastを使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (auto解析)

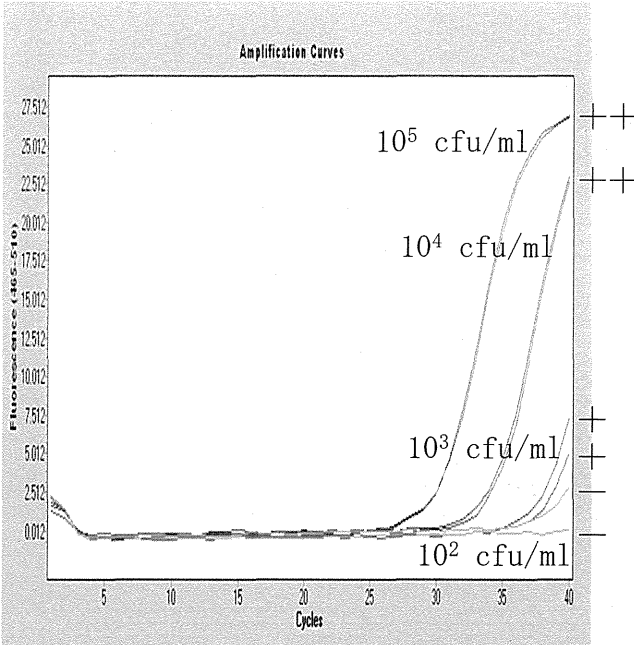
牛レバー



牛挽肉



豚スライス



チーズ

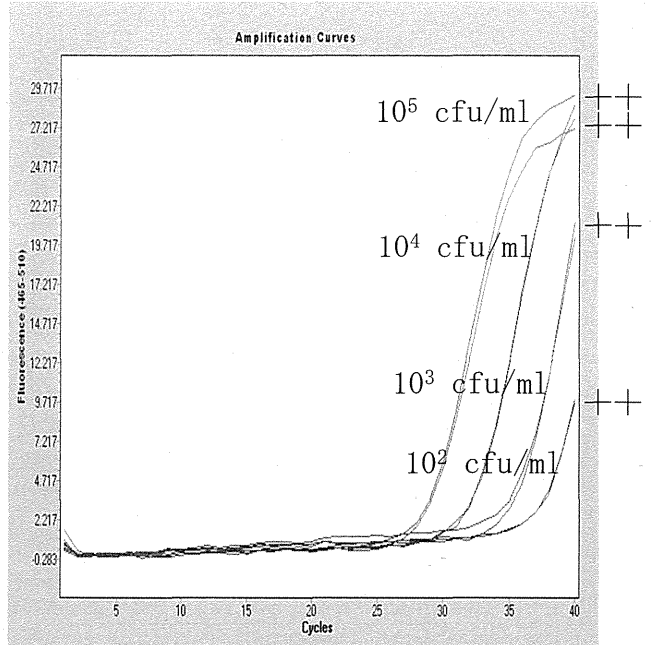
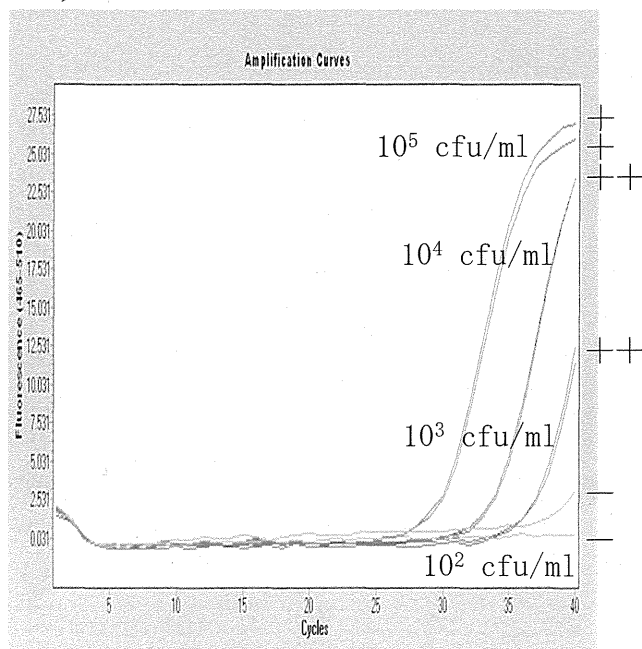
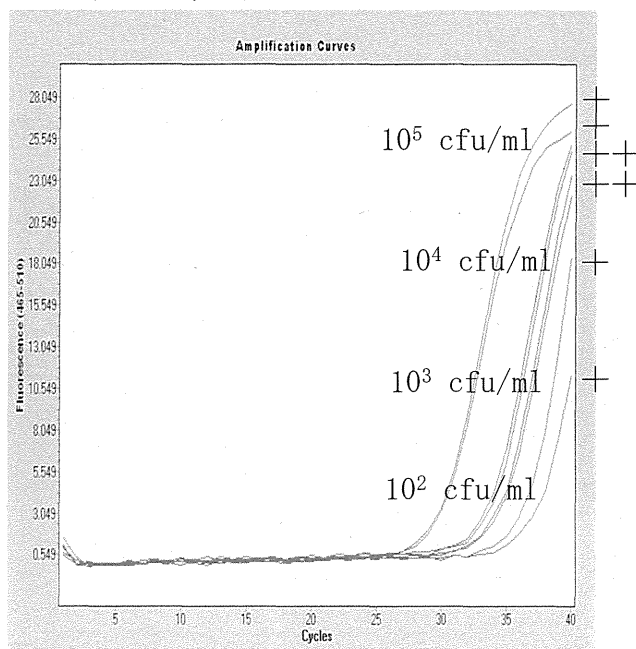


図16-1 Nielsenらの方法でのLC480を使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (auto解析)

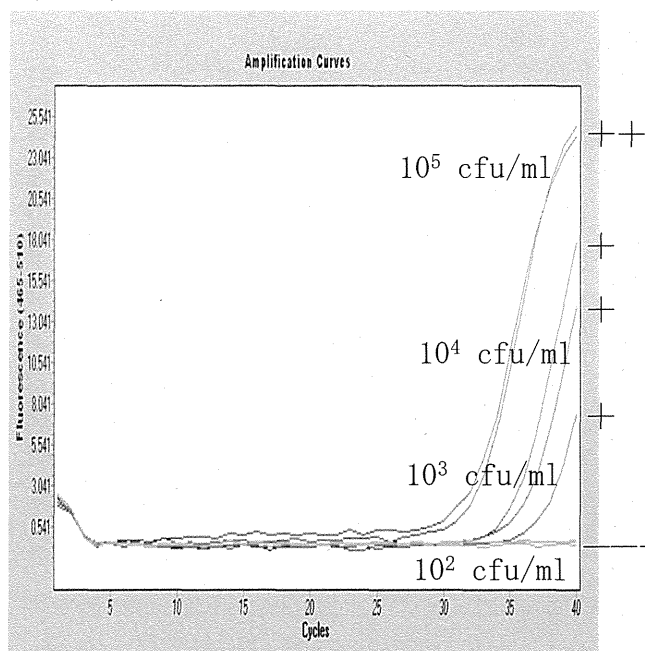
レタス



カイワレダイコン



トマト



ホウレンソウ

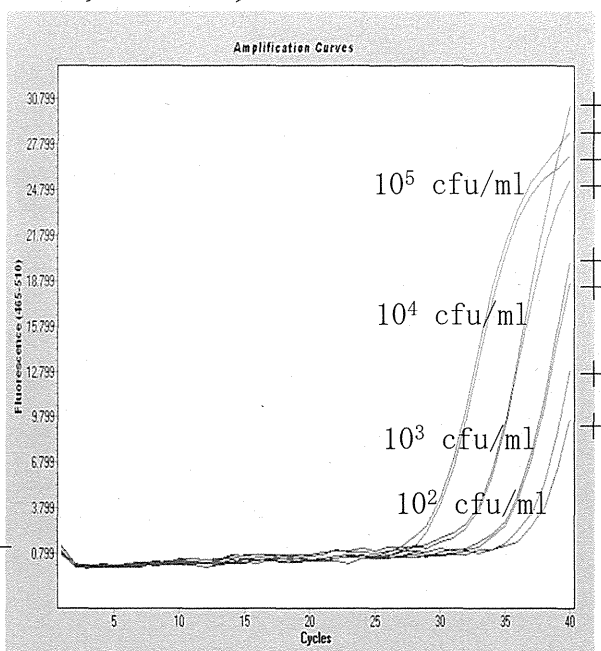
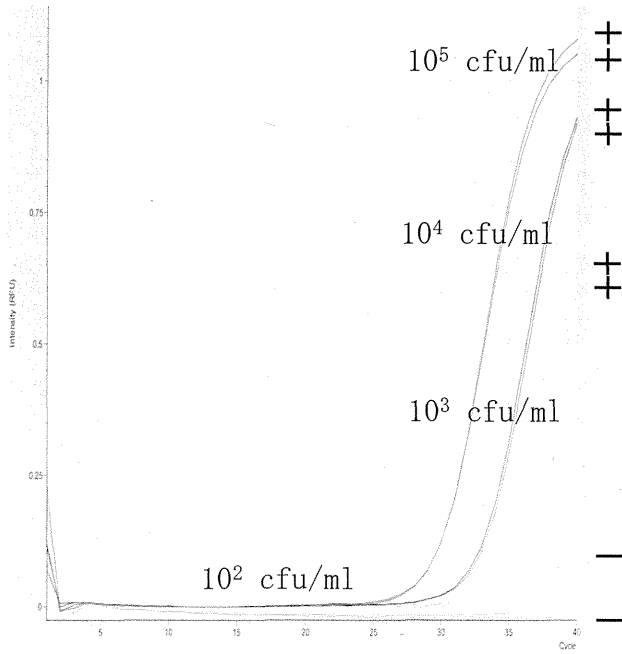
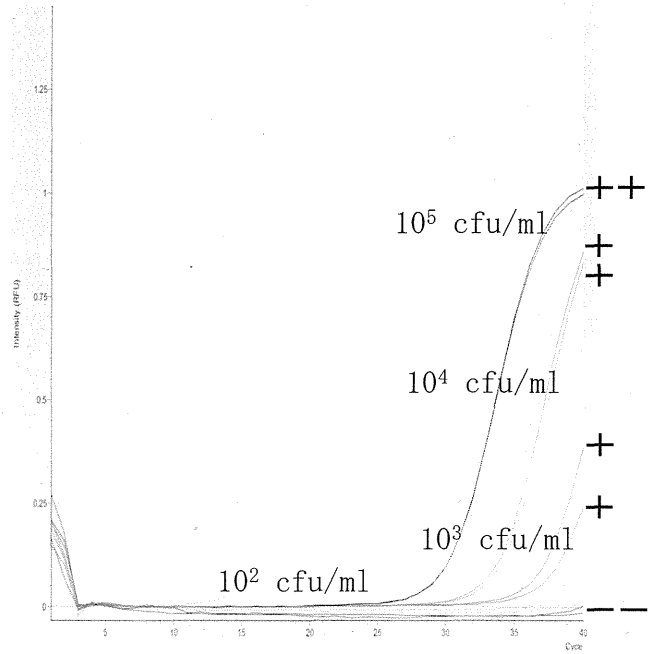


図16-2 Nielsenらの方法でのLC480を使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (auto解析)

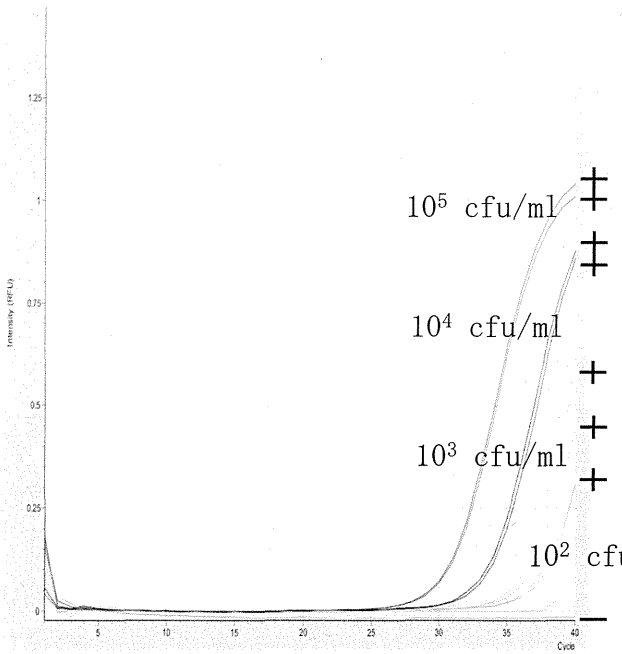
牛レバー



牛挽肉



豚スライス



チーズ

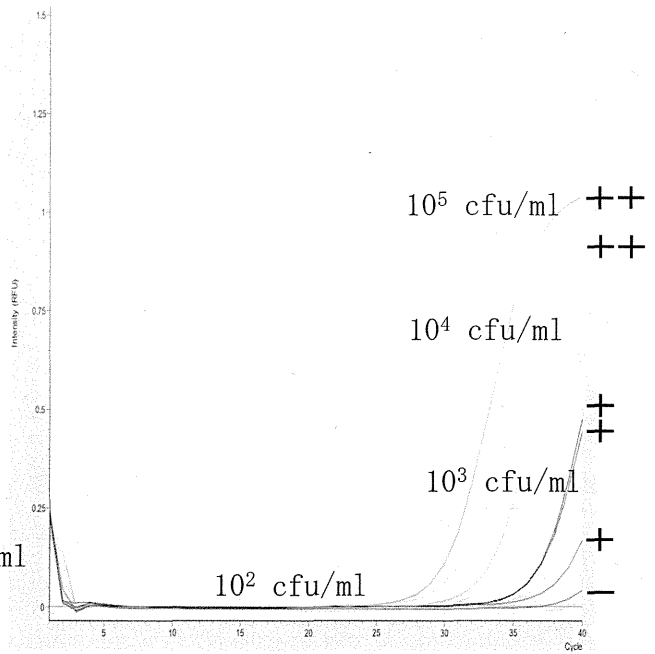
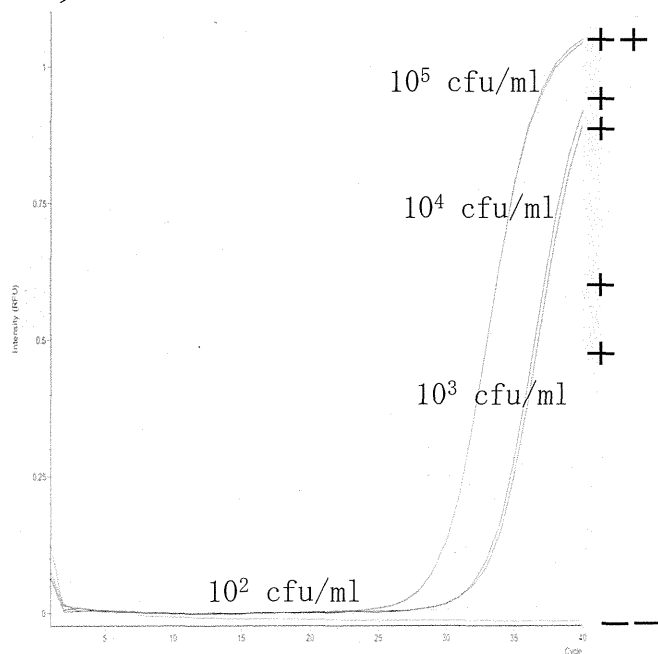
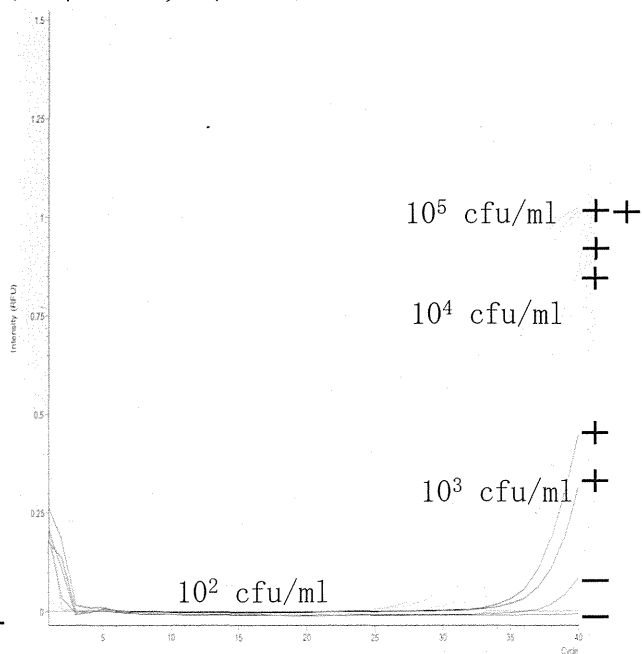


図 1 7 - 1 Nielsenらの方法でのLCnanoを使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (auto解析)

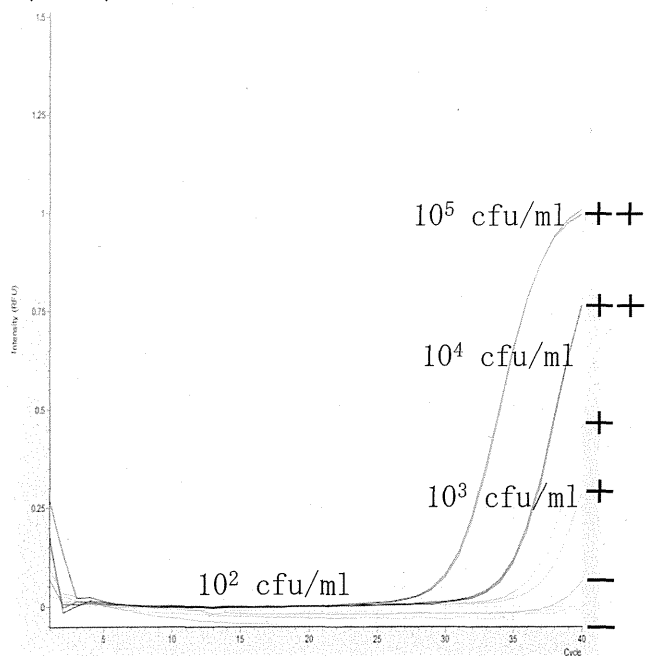
レタス



カイワレダイコン



トマト



ホウレンソウ

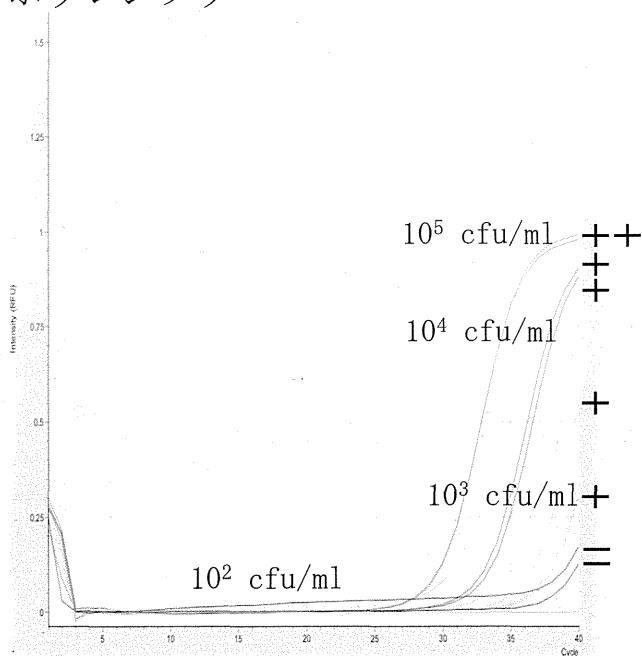
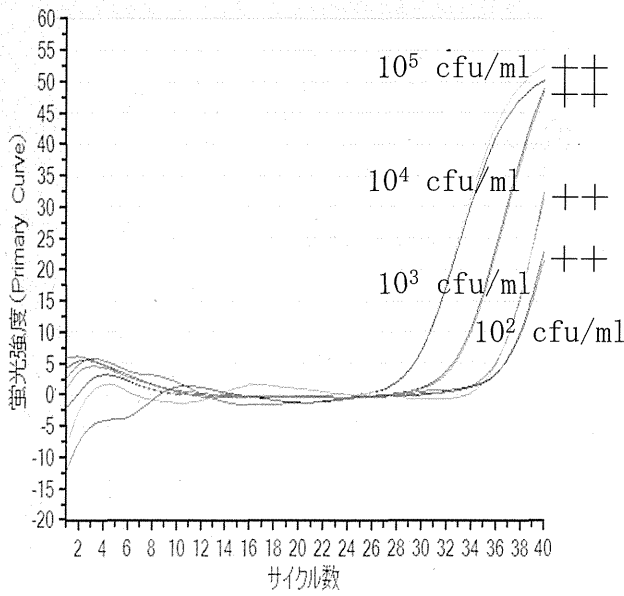
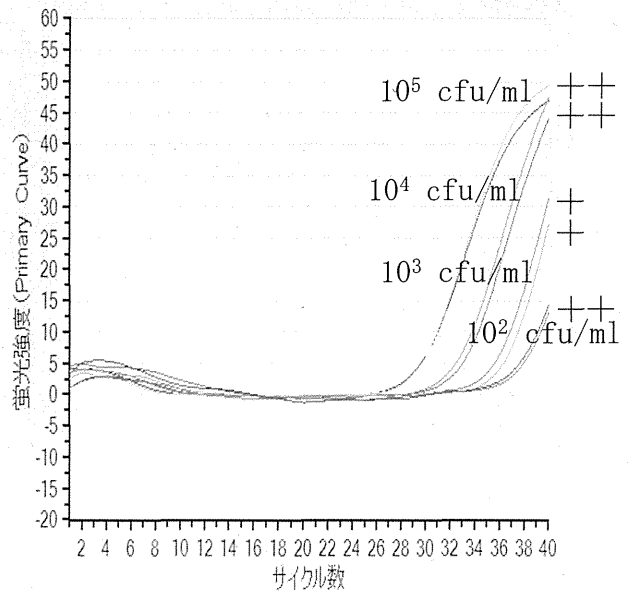


図 1 7 - 2 Nielsenらの方法でのLCnanoを使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (auto解析)

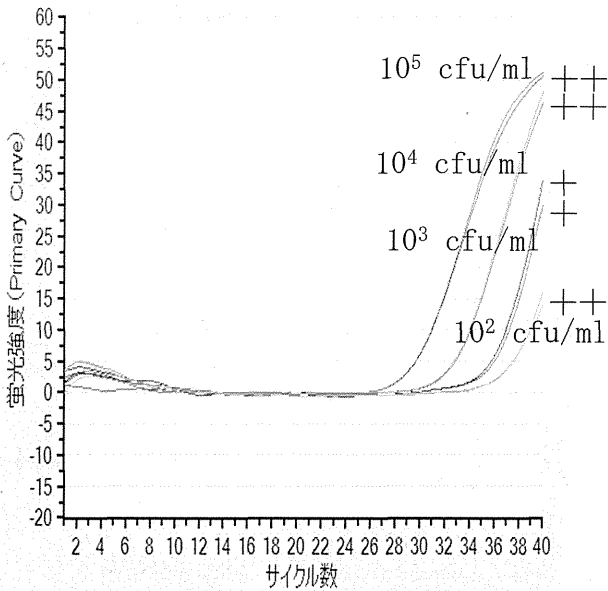
牛レバー



牛挽肉



豚スライス



チーズ

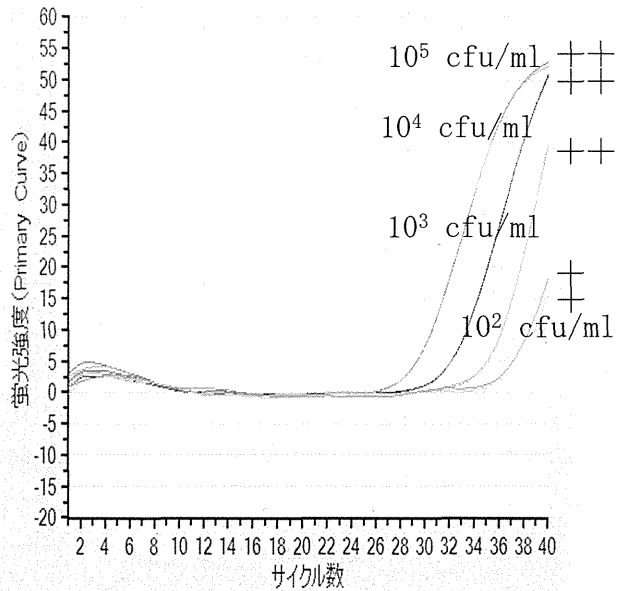
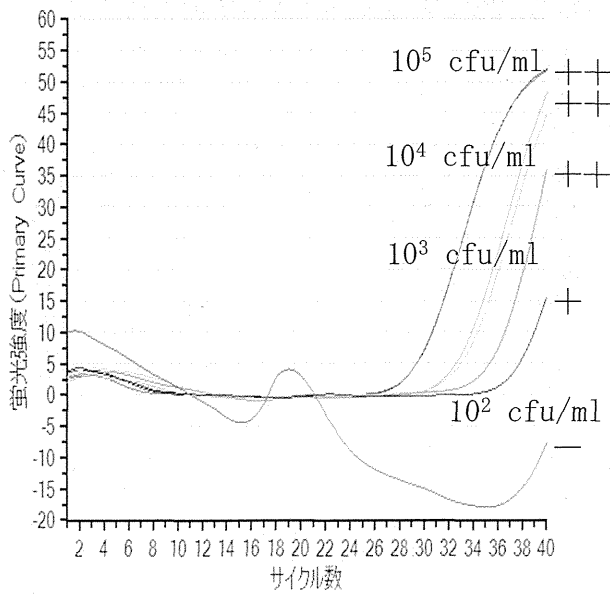
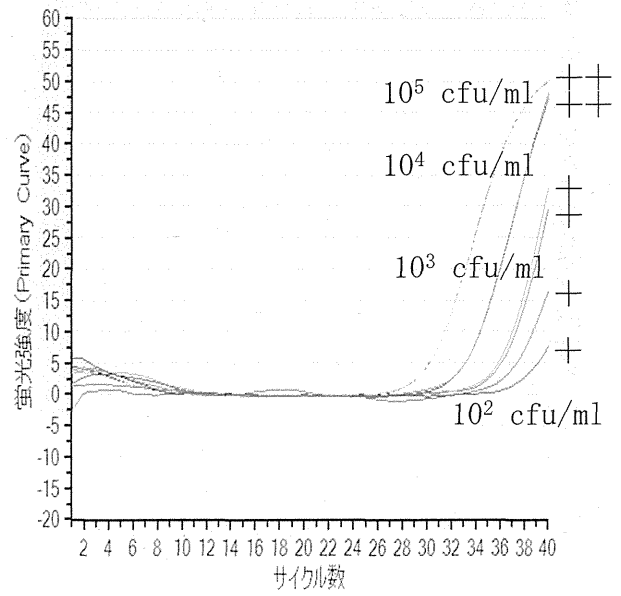


図18-1 Nielsenらの方法でのDiceを使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (auto解析)

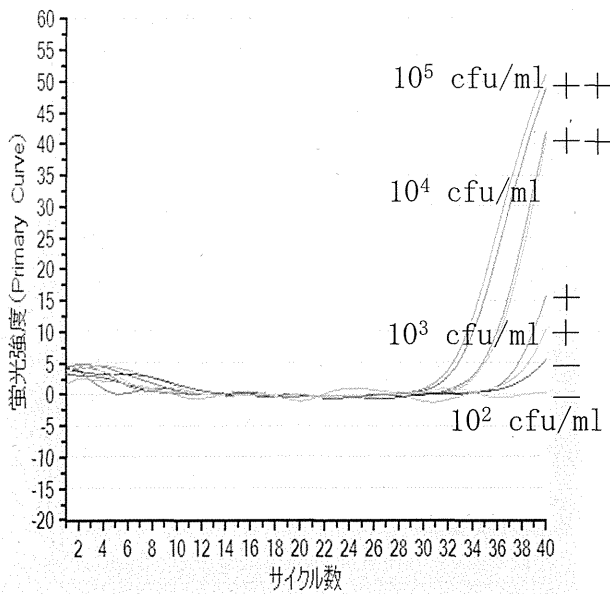
レタス



カイワレダイコン



トマト



ホウレンソウ

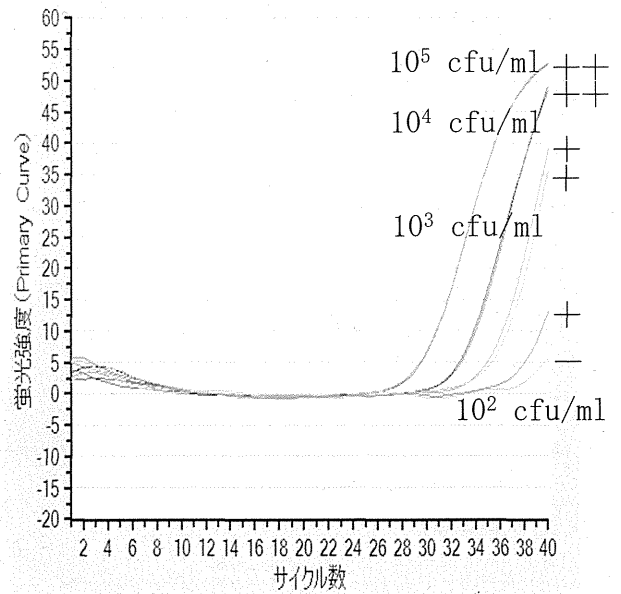


図18-2 Nielsenらの方法でのDiceを使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (auto解析)

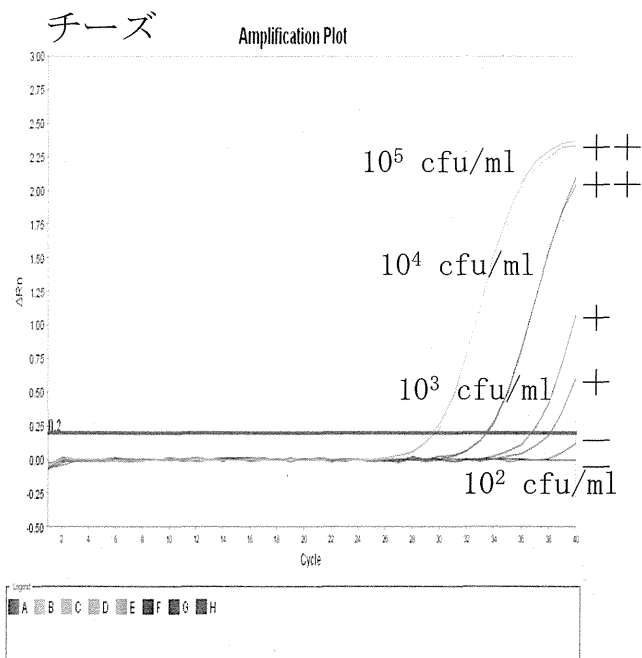
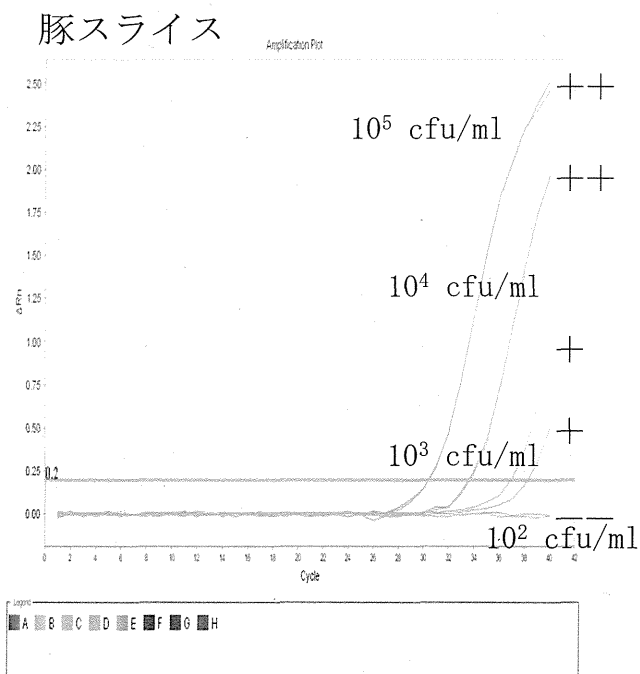
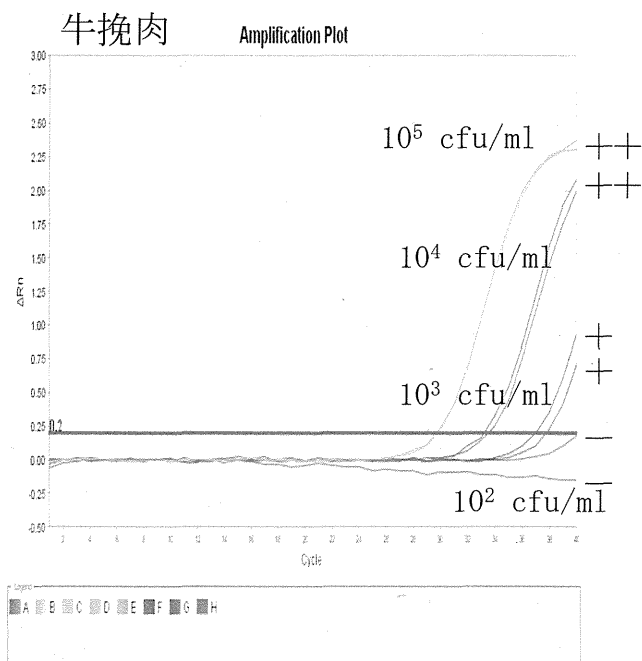
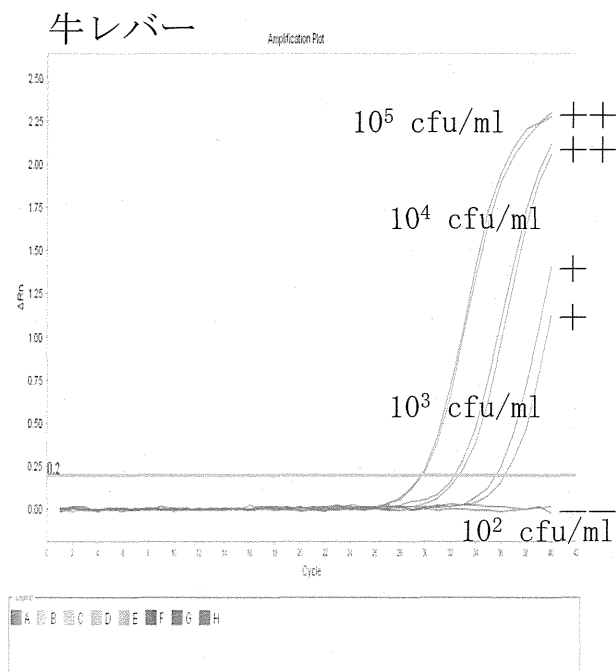


図 19-1 Nielsenらの方法でのABI7500を使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (manual解析)

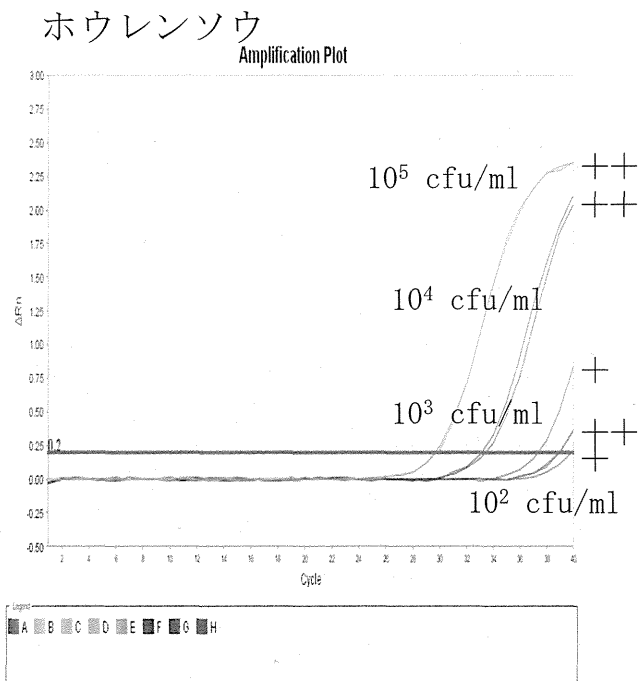
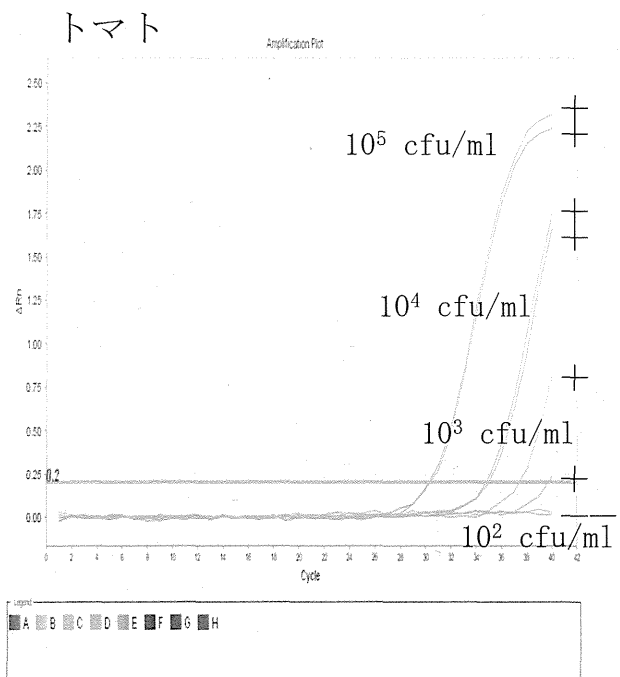
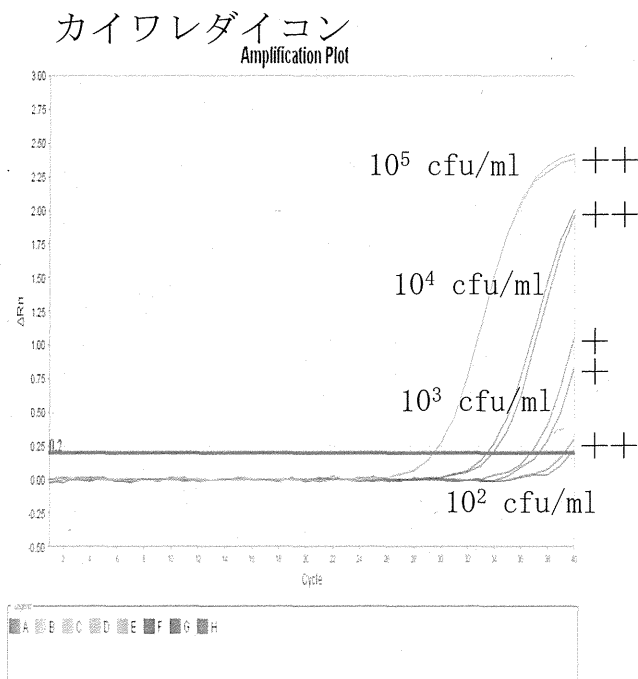
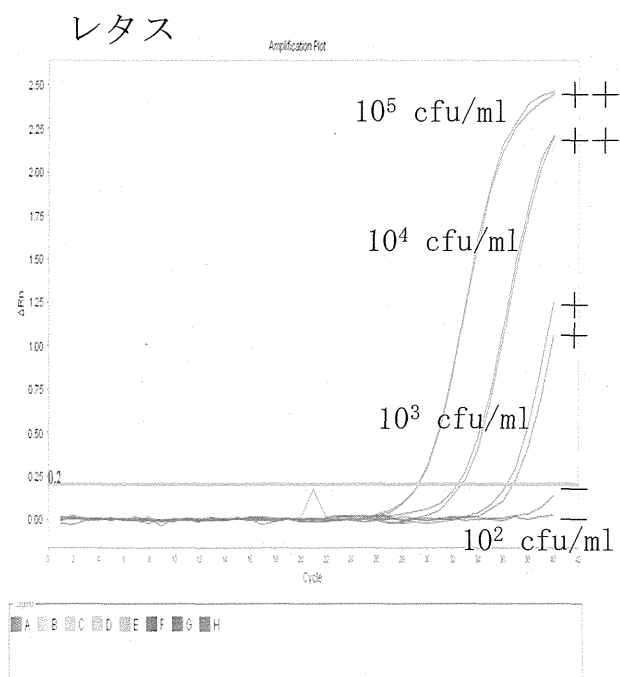
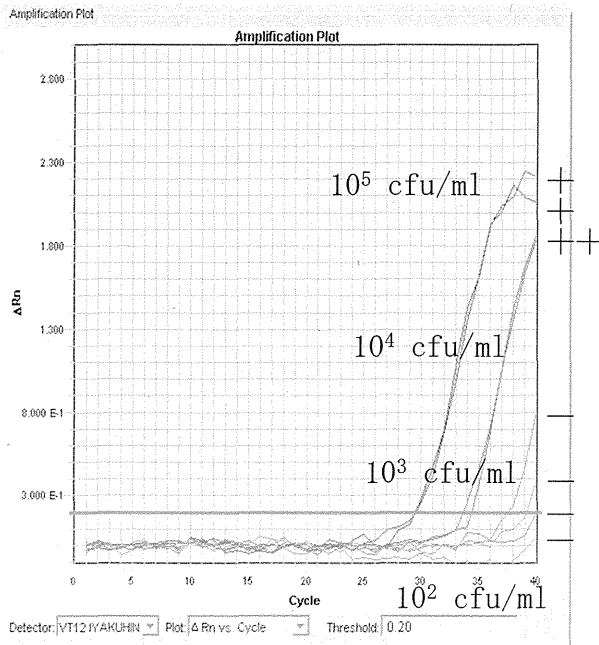
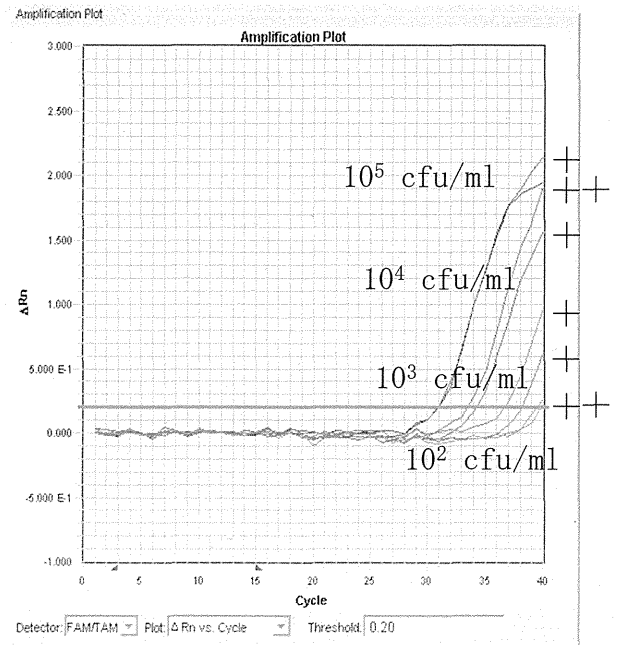


図 19-2 Nielsenらの方法でのABI7500を使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (manual解析)

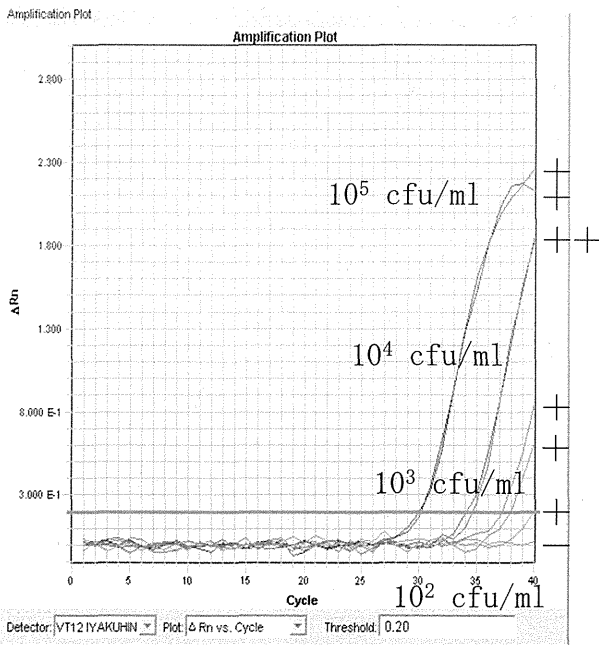
牛レバー



牛挽肉



豚スライス



チーズ

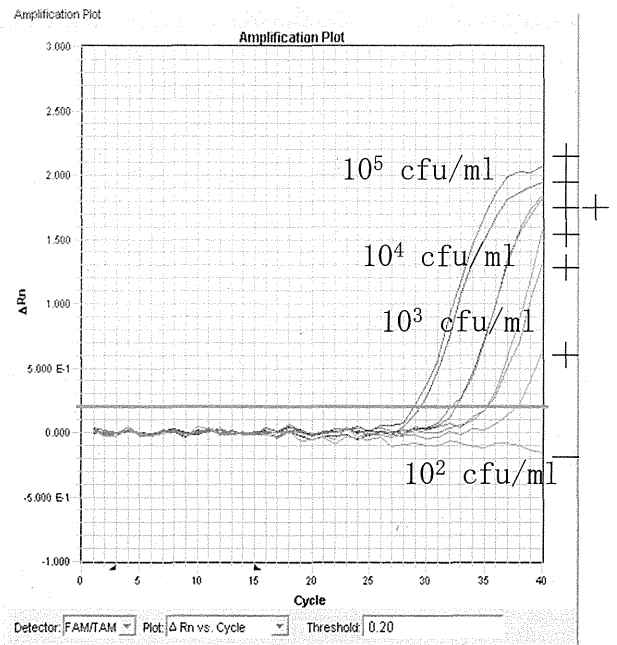
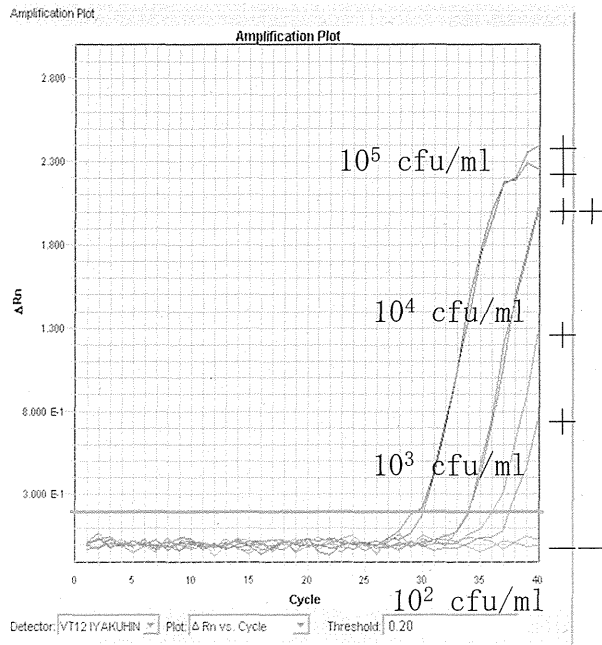
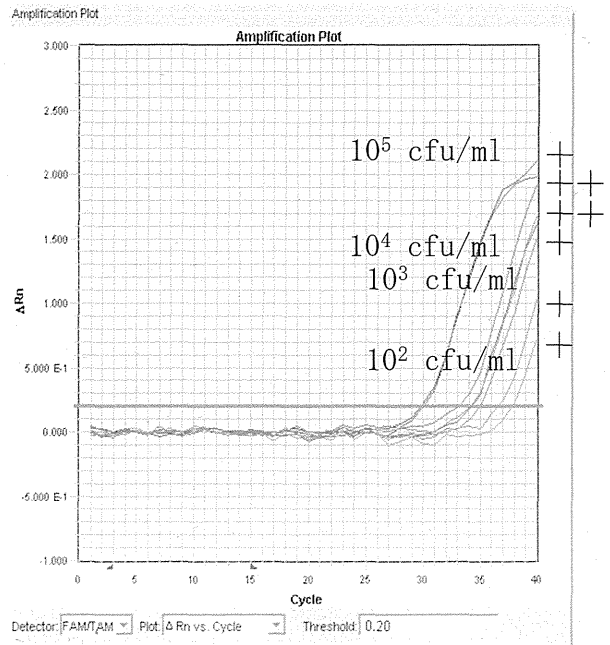


図 20-1 Nielsenらの方法でのABI7900を使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (manual解析)

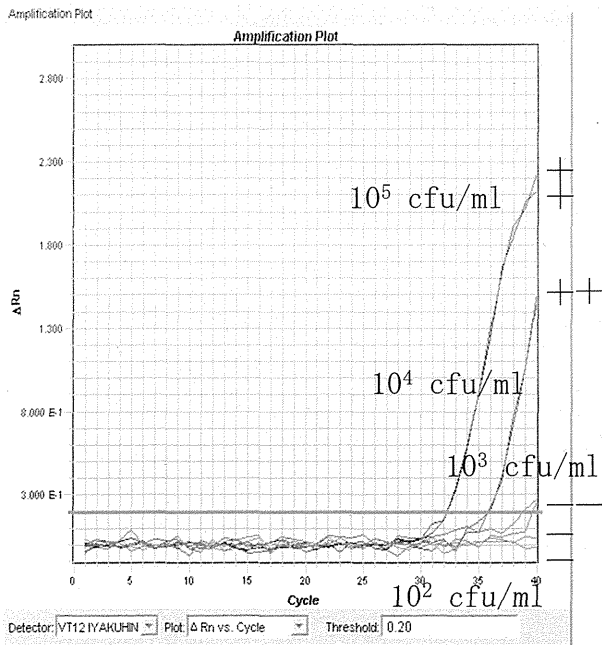
レタス



カイワレダイコン



トマト



ホウレンソウ

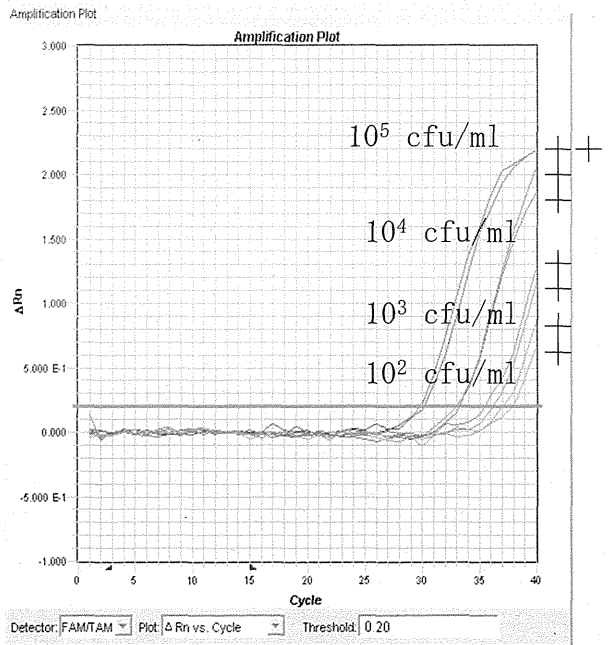
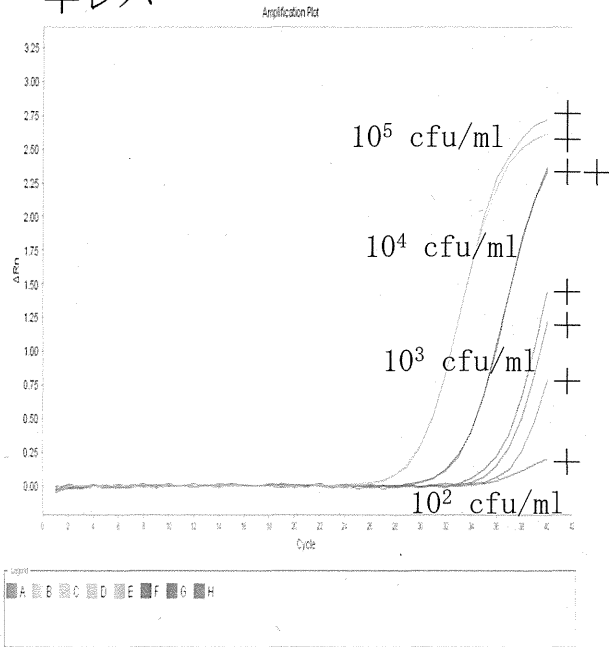
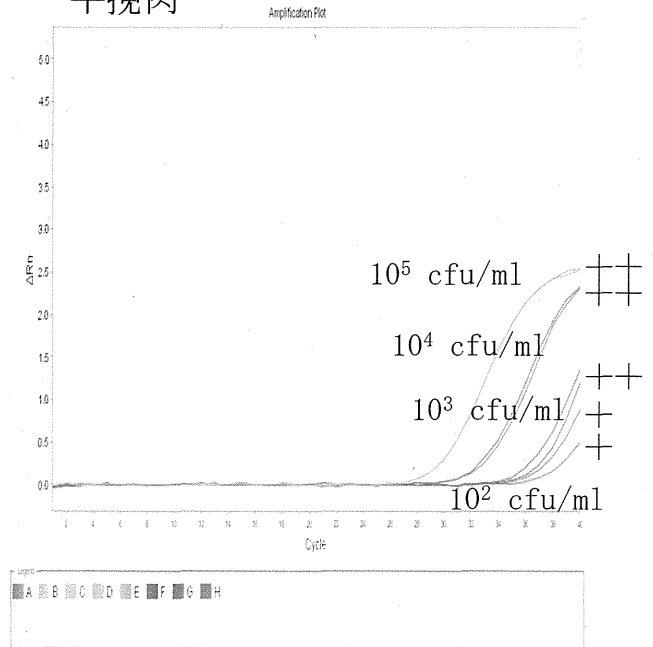


図 20-2 Nielsenらの方法でのABI7900を使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (manual解析)

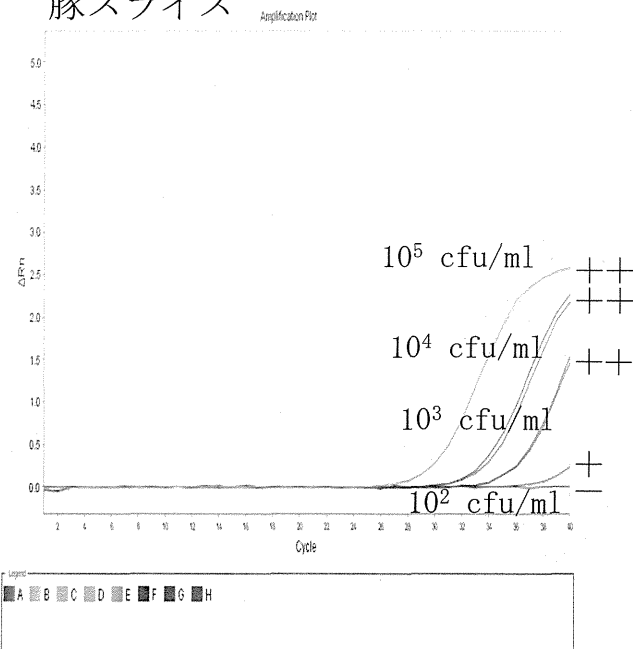
牛レバー



牛挽肉



豚スライス



チーズ

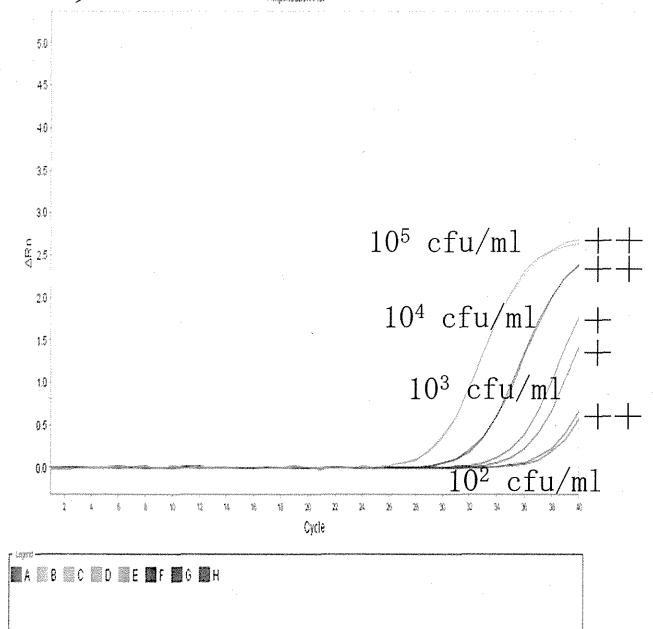
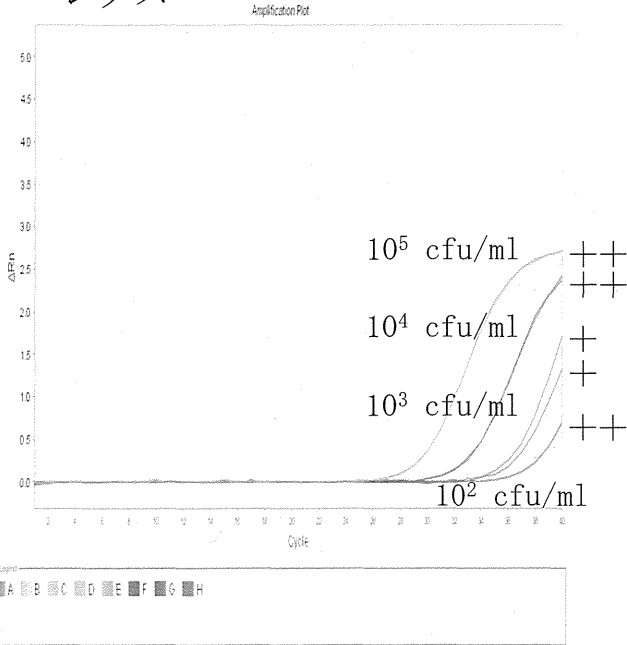
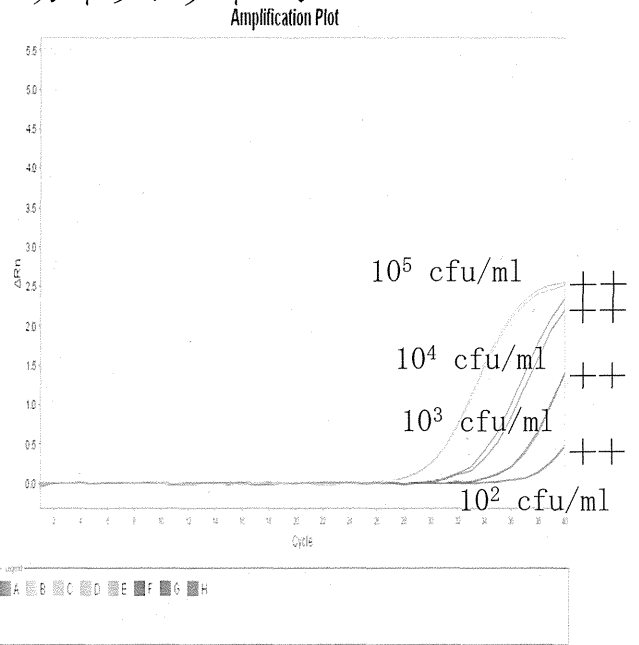


図 2 1 - 1 Nielsenらの方法でのABI7500fastを使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (manual解析)

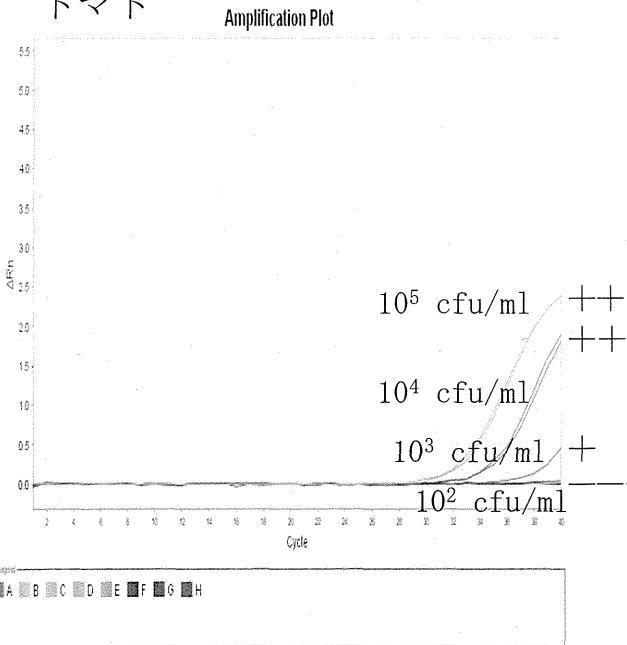
レタス



カイワレダイコン



トマト



ホウレンソウ

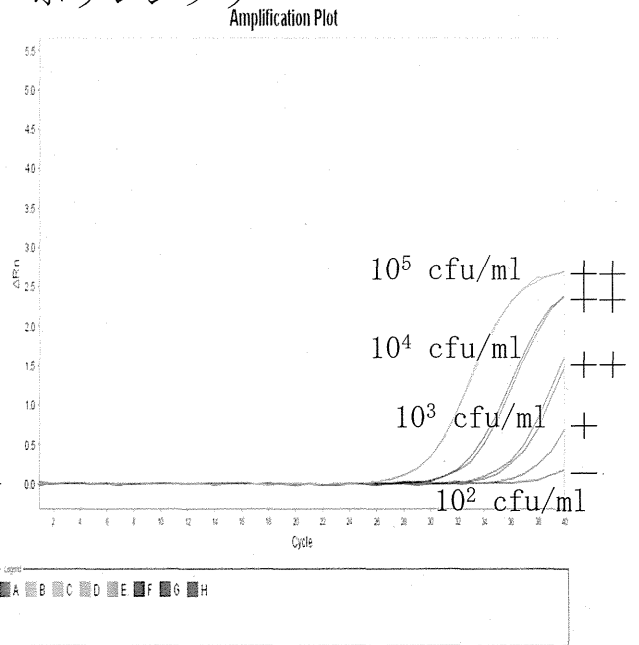
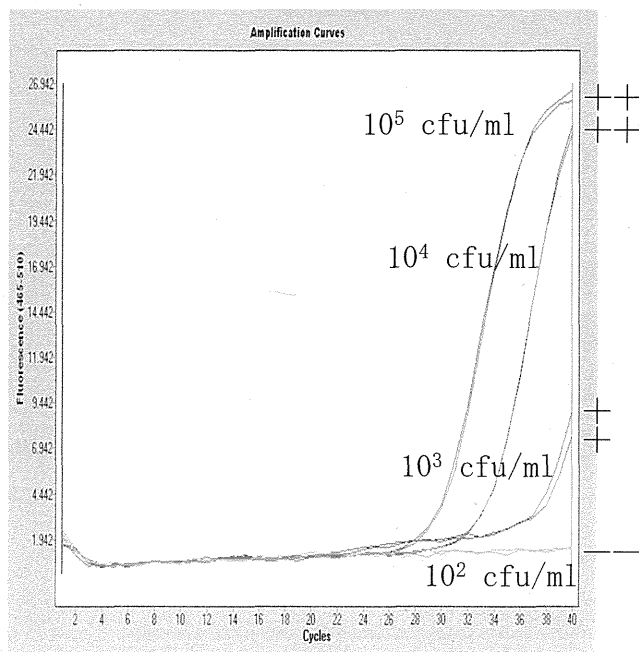
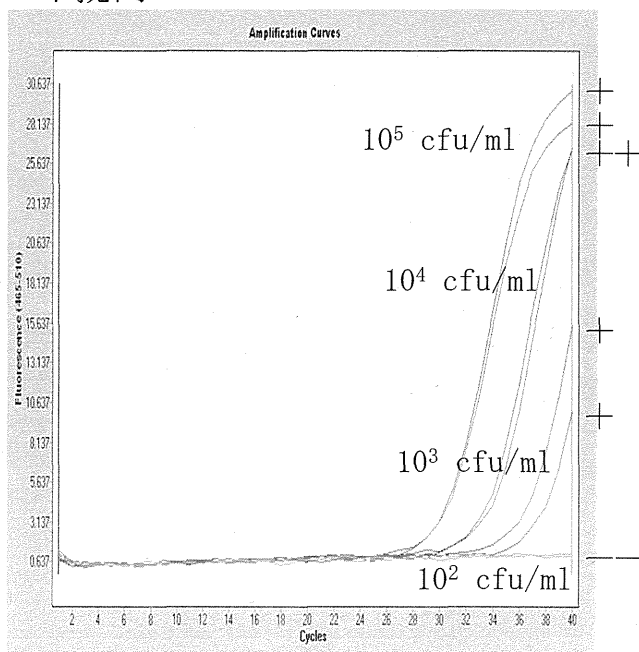


図 2 1 - 2 Nielsenらの方法でのABI7500fastを使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (manual解析)

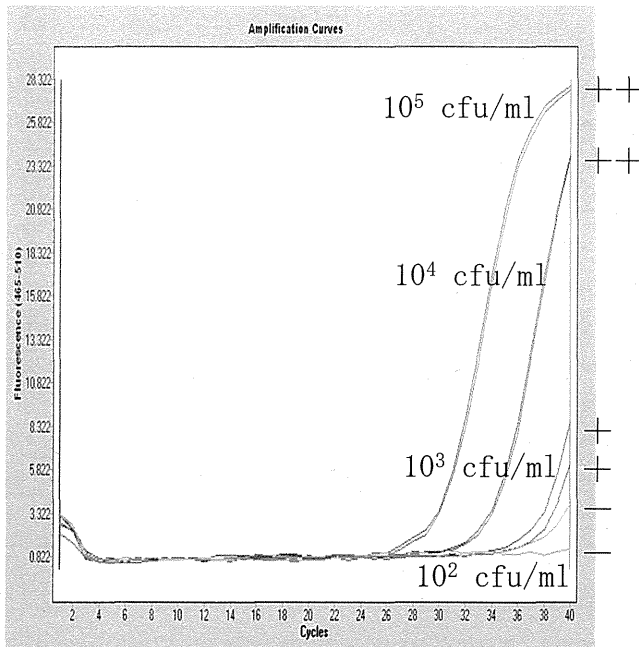
牛レバー



牛挽肉



豚スライス



チーズ

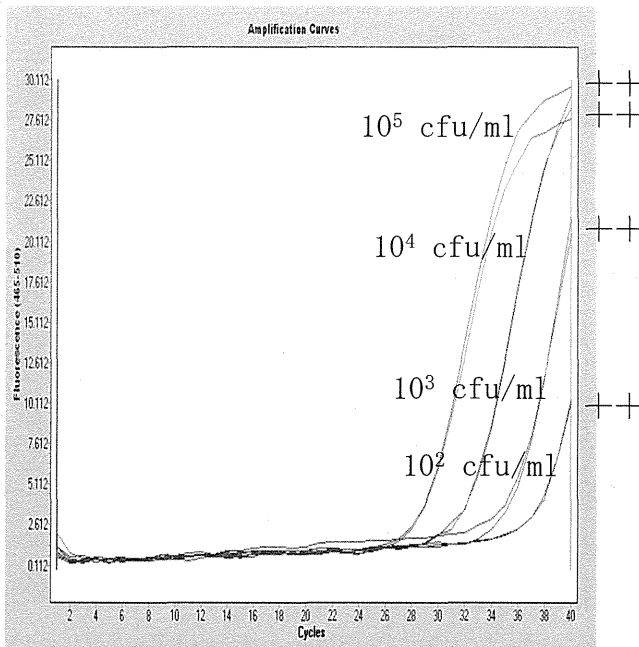
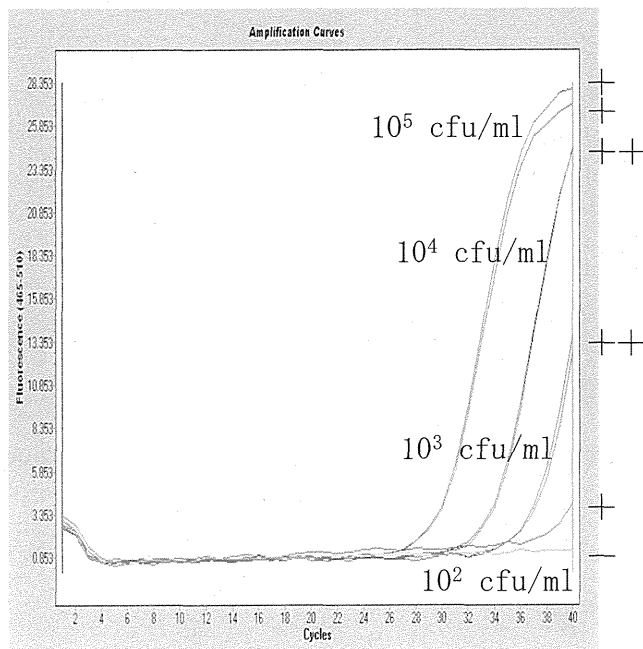
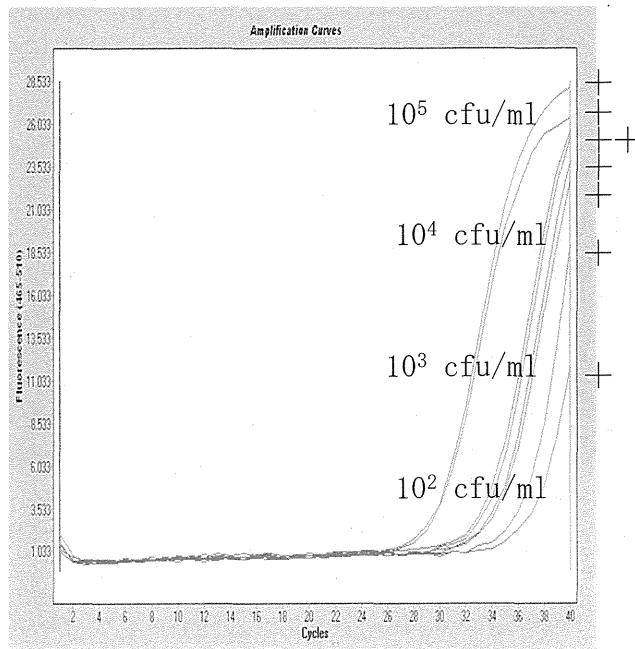


図 2 2 - 1 Nielsenらの方法でのLC480を使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (manual解析)

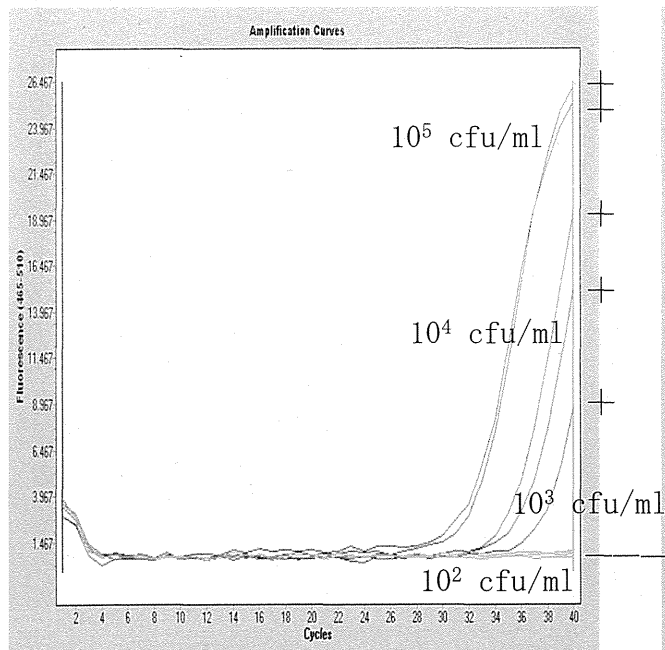
レタス



カイワレダイコン



トマト



ホウレンソウ

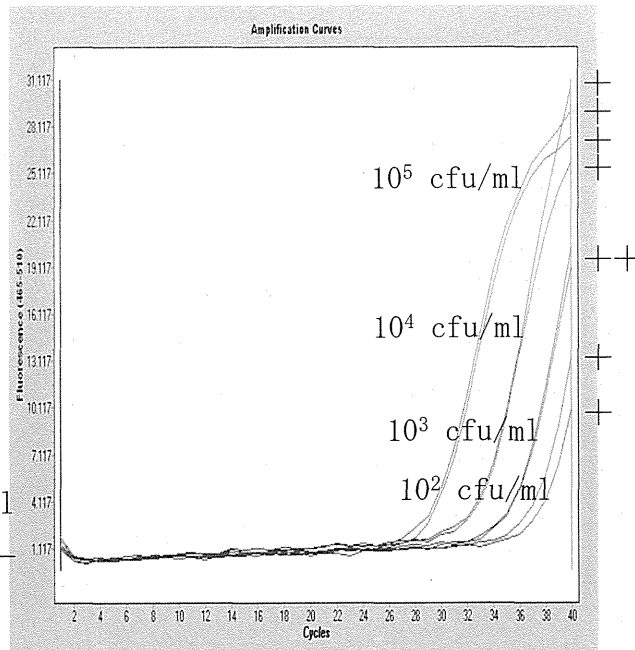
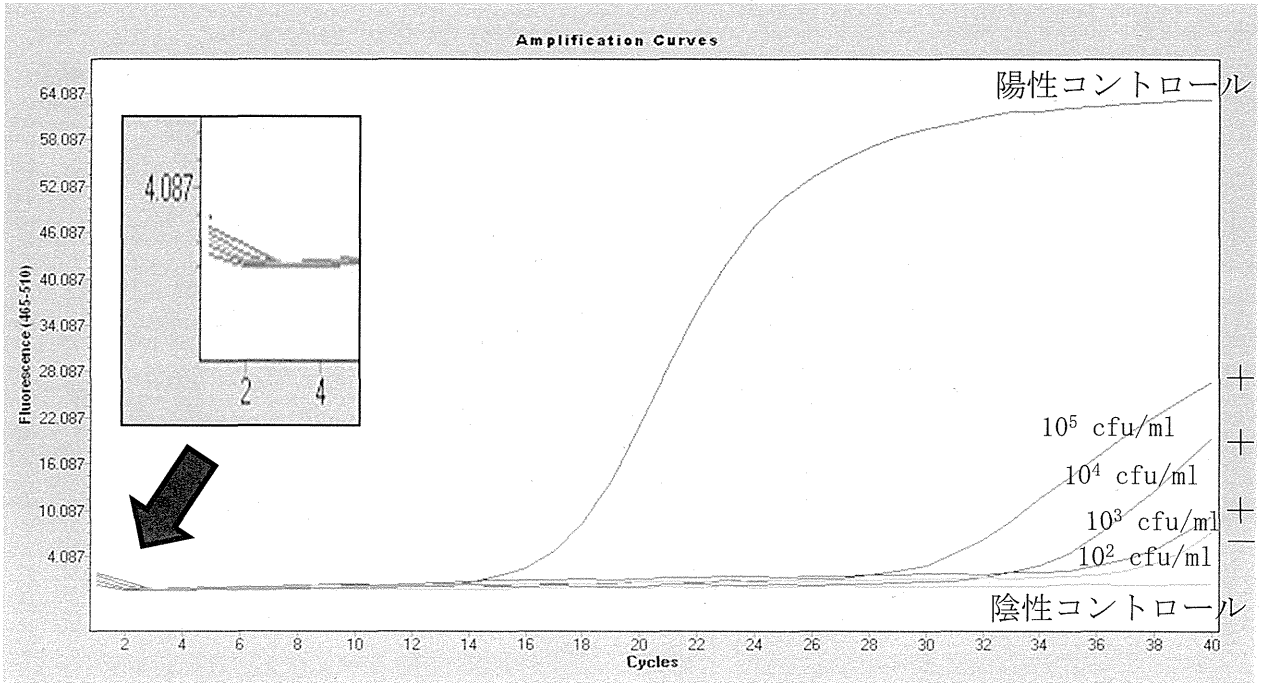


図 2 2 - 2 Nielsenらの方法でのLC480を使用した食品培養液からの各濃度のVT1遺伝子の検出 (manual解析)

(a)



(b)

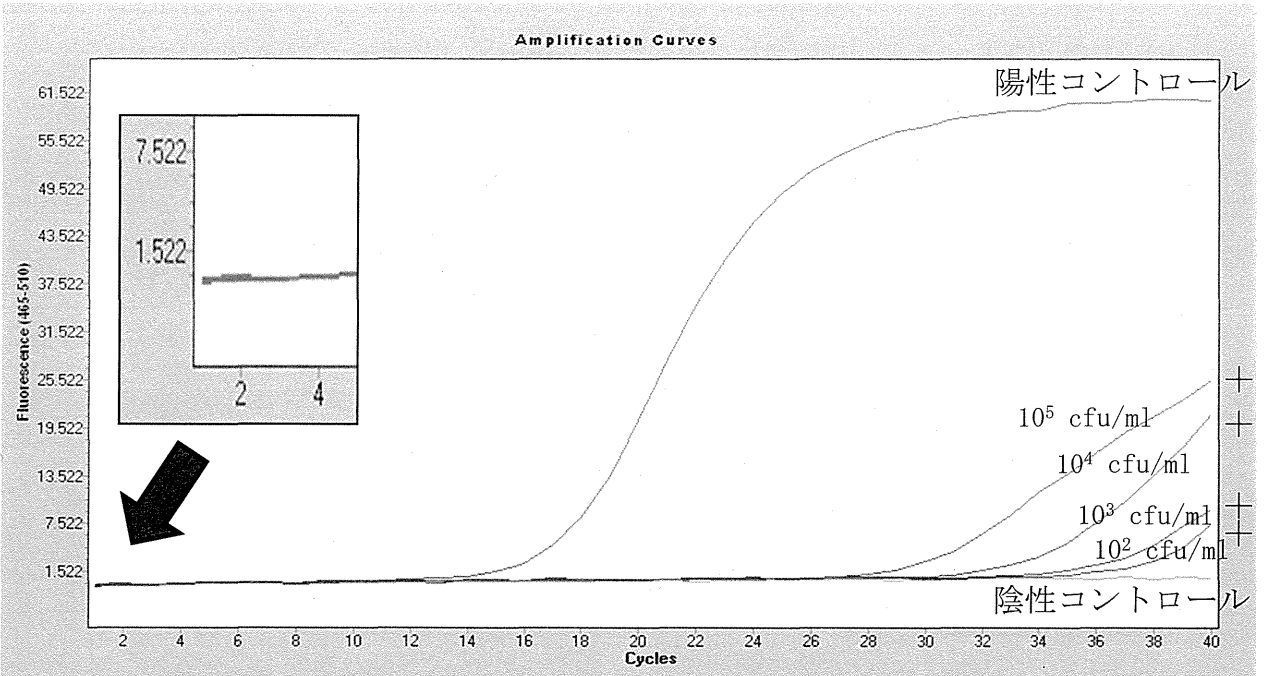


図 2 3 試薬とDNAの混和操作による増幅曲線の改善
(a) 混和なし、(b) 混和あり (10回タッピング)

表1 総反応液量の比較のための反応液調製

反応試薬	総反応液量 (μl)		
	50	30	
TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (アプライド・バイオシステムズ ジャパン)	25	15	
プライマー* (10 pmol/μl)	VT1-F	3	1.8
	VT1-R	3	1.8
	VT2-F	3	1.8
	VT2-R	3	1.8
プローブ** (5 pmol/μl)	VT1-P	2	1.2
	VT2-P	2	1.2
滅菌精製水	4	0.4	
合計	45	25	

* VT1-F 5' GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C 3'

VT1-R 5' CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT 3'

VT2-F 5' GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA 3'

VT2-R 5' GAA AGT ATT TGT TGC CGT ATT AAC GA 3'

** VT1-P 5' FAM- CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A -TAMRA 3'

VT2-P 5' FAM- ATG TCT ATC AGG CGC GTT TTG ACC ATC TT -TAMRA 3'

表2 各検出法の反応液調製

遺伝子検出法		容量 (μ l)	
CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 (タカラバイオ)	2×Cycleave Reaction Mixture	12.5	
	VT Primer/Probe Mix (5×conc.)	5	
	滅菌精製水	2.5	
	合計	20	
Nielsenらの方法	TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (アプライド・バイオシステムズ ジャパン)	15	
	プライマー* (10 pmol/ μ l)	VT1-F	1.8
		VT1-R	1.8
		VT2-F	1.8
		VT2-R	1.8
	プローブ** (5 pmol/ μ l)	VT1-P	1.2
		VT2-P	1.2
	滅菌精製水	0.4	
	合計	25	

* VT1-F 5' GGA TAA TTT GTT TGC AGT TGA TGT C 3'

VT1-R 5' CAA ATC CTG TCA CAT ATA AAT TAT TTC GT 3'

VT2-F 5' GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA 3'

VT2-R 5' GAA AGT ATT TGT TGC CGT ATT AAC GA 3'

** VT1-P 5' FAM- CCG TAG ATT ATT AAA CCG CCC TTC CTC TGG A -TAMRA 3'

VT2-P 5' FAM- ATG TCT ATC AGG CGC GTT TTG ACC ATC TT -TAMRA 3'

表3 比較したリアルタイムPCR測定機器、試薬および解析方法の組合せ

機器名 (メーカー名)	遺伝子検出法	
	CycleavePCR 0-157 (VT gene) Screening Kit	Nielsenらの方法
ABI PRISM 7500 (アプライド・バイオシステムズ ジャパン)	Auto解析	Auto解析
	Manual解析	Manual解析
ABI PRISM 7900 (アプライド・バイオシステムズ ジャパン)	Auto解析	Auto解析
	Manual解析	Manual解析
ABI PRISM 7500fast (アプライド・バイオシステムズ ジャパン)	Auto解析	Auto解析
	Manual解析	Manual解析
LightCycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティックス)	Auto解析 (Abs quant/2nd derivative max)	Auto解析 (Abs quant/2nd derivative max)
		Manual解析 (fit points)
LightCycler nano (ロシュ・ダイアグノスティックス)	—	Auto解析 (Auto quant)
Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ)	Auto解析 (CP法)	Auto解析 (CP法)

表4 供試検体の生菌数および大腸菌群数

食品	食品名	検体	一般生菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	
食肉	牛レバー	1	9.6×10^2	<10	
		2	4.0×10^2	<10	
		3	1.0×10^2	<10	
	牛挽肉	1	1.0×10^6	3.1×10^2	
		2	1.4×10^5	3.3×10^2	
		3	2.7×10^5	4.1×10^4	
食肉	豚スライス肉	1	3.8×10^4	1.4×10^2	
		2	2.7×10^3	5.4×10^2	
		3	2.7×10^3	2.1×10^2	
	チーズ	チーズ (ヤギナチュラルチーズ)	1	1.2×10^9	2.7×10^2
			2	9.1×10^8	<10
			3	1.0×10^8	2.9×10^6
野菜	レタス	1	3.9×10^5	1.4×10^2	
		2	1.8×10^5	4.0×10	
		3	6.8×10^4	6.8×10^2	
		カイワレダイコン	1	1.7×10^7	5.9×10^5
			2	3.7×10^7	1.4×10^4
			3	1.2×10^7	4.2×10^4
	トマト	1	<10	<10	
		2	<100	<10	
		3	3.0×10^2	<10	
	ほうレンソウ	1	1.7×10^6	7.0×10^3	
		2	1.7×10^6	4.1×10^3	
		3	4.1×10^7	4.1×10^6	