

3)。例外として、Gp16 に属する 0169 と 0183 では *wzx* を含む領域で組換えが起こっており (図 2)、*wzx* 間の相同性は認められなかった。一方で、グループ化されていないものは、最も相同性の高い近隣間で 70%以下の相同性であった [096 と 0170 の *wzx* (相同性=86%) を除く]。以上の結果より、*wzx/wzy* および *wzm/wzt* はグループ内で高い保存性を示し、グループ以外の 0 血清群間では非常に多様であることが確認された。

それぞれの 0 抗原合成遺伝子領域に含まれる *wzx/wzy* および *wzm/wzt* の塩基配列情報を指標として、個別の 0 血清群からなる 147 種類 (Gp16 に属する 0169 と 0183 は *wzx* で区分する) と、グループ化された 15 種類 (Gp1 から Gp15) の計 162 種類の遺伝子型 (0-genotype: 0g-type) が認められた (表 3)。

#### 4. シンプルックス PCR

全 162 種類の 0g-type を識別できる 162 種類の PCR プライマーセットを準備した。34 種類は既報のプライマー配列を使用し、残る 128 種類は本研究などで新しくデザインした (表 3)。0g8 と 0g157 は特異的遺伝子 (それぞれ *orf469* と *rfbE*) を標的とし、それ以外は *wzx* または *wzy*、*wzm* または *wzt* を標的とした。PCR 産物サイズが階段状になるようプライマーセットをデザインし、最小で 132 bp (0g145)、最大で 1,235 bp (0g9) とした (表 3 および図 4)。各プライマーセットは全参考株の精製 DNA および菌体熱処理上清を用いて PCR による評価を行い、対象とする 0 血清群のみで明瞭な PCR 産物が得られることを確認した。

#### 5. マルチプレックス PCR

全 162 種類のプライマーセットを含む 20 種類のマルチプレックス PCR (MP-1~MP-20) をデザインした (表 6 および図 5)。各マルチプレックス PCR は、全参考株の精製 DNA および菌体熱処理上清を用いて PCR による評価を行い、対象とする 0 血清群のみで明瞭な PCR 産物が得られることを確認した。

#### 6. 野生を用いた 0g-type と 0 血清群との対応評価

017、018ab、020、032、046、060、090、097、0170 を除く全ての 0 血清群に分布する野生株 579 株および OUT と判定された 111 株を用いて全マルチプレックス PCR により 0g-type を判定した。(表 2)。579 株のうち 523 株で 0 血清群

と 0g-type の判定結果が一致した。一方で 9 種類の 0 血清群に属する 13 株では 0 血清群と 0g-type の結果が一致しなかった (表 9)。4 種類の 0 血清群に属する 5 株では各株から 2 種類の 0g-type が確認された (表 10)。さらに 20 種類の 0 血清群に属する 38 株では 0gUT と判定された (表 11)。

0 血清群と 0g-type の結果が一致しなかった 13 株について、0g-type の結果に対応した個別抗血清で凝集性を確認したところ、10 株で凝集が確認された (表 9)。2 種類の 0g-type が確認された 5 株では、一方の 0g-type が 0 血清群と一致したのに対し、もう一方の 0g-type に対応した個別抗血清では凝集性が確認されなかった (表 10)。

#### 7. OUT 株の 0g-type 判定

OUT と判定された 111 株のうち、77 株では 37 種類の 0g-type に判定され、1 株では 2 種類の 0g-type (0g23/0gGp10) が確認された (表 12)。残る 33 株では何れの 0g-type にも判定されなかった。0g-type が特定された OUT 株の一部を用いた詳細な凝集試験では、0g115 と判定された菌株では 0109 と 0115、0g133 と判定された菌株では 019 と 0133、0g182 と判定された菌株では 0109 と 0182 など、2 種類の抗血清がほぼ同等に凝集して判定不能となるケースがあった。また単一の 0gGp 内に含まれる関連 0 血清群 [018ab と 018ac (0gGp12)、046 と 0134 (0gGp6) など] でもほぼ同等に凝集して血清学的な判定が困難であることがわかった (データ省略)。

#### 8. 試験的タイピングネットワーク

学会や研究室ホームページなどで PCR による 0g-type 判定法を紹介すると共に試験的なタイピング受託を呼びかけたところ、14 機関から 381 株の依頼があった (図 6)。分離源別ではヒト糞便由来が 43%を占め、動物糞便、食品と続いた。病原因子別では EHEC が 50%を占めた。EHEC では 26 種類の 0g-type が確認され、0g-type が判定できない菌株は 21 株 (5.5%) であった。

#### D. 考察

本研究で開発した 0g-typing PCR は大腸菌全 0 血清群参考株を用いた評価によりその特異性が確認された。さらに野生株を用いた評価により高い実用性も確認された (523/579)。一方で、一部の野生株 (13/579) では 0 血清群と 0g-type の結果が不一致となった。不一致となった菌株の多くは 0g-type に対応した抗血清で

も凝集することから、Og-type に対応した O 抗原を発現しているが、それ以外の表層抗原が Og-type と対応しない抗血清とより強く凝集した結果、不一致になったと予想された。2 種類のクラスターが直列して O 抗原合成遺伝子領域の遺伝子座に存在するケースが 08 参考株で確認されている (Iguchi A et al. DNA Res 2015)。また、他の遺伝子座に挿入する莢膜合成遺伝子クラスターには *wzx/wzy* または *wzm/wzt* のホモログが含まれている (Corbett D and Roberts IS Adv Appl Microbiol 2008)。このように第二の糖鎖合成遺伝子クラスターの存在が、2 種類の Og-type が確認された原因となっているかもしれない。本研究ではいずれの Og-type にも判定できない菌株が確認された (38/579)。ETEC 362 株のゲノム情報と *wzx/wzy* および *wzm/wzt* の配列セットを用いた *in silico* での Og-typing 解析により、*wzx/wzy* と *wzm/wzt* は同一 O 血清群内では高度に保存されていることが示されている (von Mentzer A et al. Nat Genet 2014)。一方で、同一 O 血清群であっても全く異なる (たまた配列的に多様化した) O 抗原合成遺伝子領域を保有するケースも報告されており (Plainvert C et al. J Bacteriol 2007)、配列的な多様性が Og-typing PCR での判定不能に影響している可能性が示唆された。今後の更なるゲノム解析により、Og-type が不能であった原因が明らかになると考えられた。

実験室内での継代などの操作中に O 抗原合成遺伝子領域上に変異が加わり、O 抗原の発現が失われることがある。また本研究でも見られたように、抗血清による交差反応が O 血清群の判定を困難にするケースもある。Og-typing PCR はそのような血清学的判定に伴う見落としや誤判定のリスクに影響されないことから、分離菌株の細分類において有効な手法であると考えられた。

本手法は特別な PCR 酵素を必要せず、マルチプレックス化および反応条件の単一化により短時間での判定が可能であった。具体的には培養液 (または単離コロニー) からスタートして判定結果が得られるまでに約 2 時間半を要し、1 検体の判定に係る費用は消耗品のみで 1000 円を下回った。以上のように本手法は特異性が高く迅速かつ安価であることから、高い実用性が期待された。

上記 ETEC の研究では、少なくとも 10 種類の新規 Og-type が確認されている。さらに、まだ規定されていない新規 O 血清群の存在も予想される。本研究で収集した 01 から 0187 までの O

抗原合成遺伝子領域のゲノム情報は、新規 Og-type の規定やそれらの検出法開発においても重要な基盤になると考えられた。Og-typing PCR に用いるプライマーの配列や反応条件

本研究では、ゲノム情報を集中かつ詳細に解析し、その結果を基にゲノム多様性に反映した論理的かつ網羅的な大腸菌 O 血清群に準ずる新規細分類手法を開発した。このような開発ステップは他属種における血清型またはその他のゲノム多様性を標的とした遺伝学的な分類手法の開発にも応用できると考えられた。

## E. 結論

本研究で開発した Og-typing PCR は、ほぼ全ての O 血清群を遺伝学的に判定できる手法である。大腸菌全 O 血清群参考株を用いた特異性の評価に加え、野生株を用いた評価においてもその実用性が示された。本手法は、分離菌株の O 血清群を低コストで迅速かつ正確に判定することができ、事例発生時の分離菌株の検査や、継続的な病原大腸菌の動向調査において有用であると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M, on behalf of the EHEC Study Group. Molecular Characterization Reveals Three Distinct Clonal Groups among Clinical Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* of Serogroup O103. Journal of Clinical Microbiology 50:2894-2900 (2012)
- 2) Osawa K, Shigemura K, Iguchi A, Shirai H, Imayama T, Seto K, Raharjo D, Fujisawa M, Osawa R, Shirakawa T. Modulation of O-antigen chain length modulated by the *wzz* gene in *Escherichia coli* O157 influenced its sensitivities to serum complement. Microbiology and Immunology 57:616-623 (2013)
- 3) Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene

- cluster. DNA Research 22:101-107 (2015)
- 4) von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, Rasko DA, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling Å, Dougan G. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. Nature Genetics 46:1321-1326 (2014)
  - 5) Mekata H, Iguchi A, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I, Misawa N. Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. Journal of Food Protection 77:1269-1274 (2014)
2. 学会発表
    - 1) 井口純、秋吉充子、伊豫田淳、大西真、大腸菌 O174-O187 の O 抗原合成遺伝子群の構造解析と PCR 検出法、第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 2012. 7. 19 (秋田市)
    - 2) 井口純、伊豫田淳、秋吉充子、大西真、大腸菌の O 抗原合成遺伝子領域の網羅的解析と菌株分類法への利用の検討、第 33 回日本食品微生物学会学術総会、2012. 10. 26 (福岡市)
    - 3) 秋吉充子、井口純、伊豫田淳、大西真、大腸菌の O 抗原合成遺伝子を標的とした PCR 法と LAMP 法の開発、第 33 回日本食品微生物学会学術総会、2012. 10. 26 (福岡市)
    - 4) 井口純、すべての大腸菌 O 血清群を判別する遺伝学的手法の開発、第 24 回日本臨床微生物学会総会、2013. 2. 2-3 (横浜市)
    - 5) 井口純、伊豫田淳、大西真、大腸菌 O 抗原合成遺伝子の網羅的解析と感染症対策に向けた利用、第 7 回日本ゲノム微生物学会年会、2013. 3. 8-10 (滋賀県長浜市)
    - 6) 井口純、伊豫田淳、大西真、大腸菌 O 血清群を判定するマルチプレックス PCR 法の開発、第 86 回日本細菌学会総会、2013. 3. 18-20 (千葉市)
    - 7) Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M, Development of a DNA-based system for the identification of almost all recognized *E. coli* O serogroups. Applied Bioinformatics and Public Health Microbiology 2013、2013. 5. 15-17 (Cambridge, UK)
    - 8) 中村寛海、井口純、藤原敦史、伊豫田淳、長谷篤、小笠原準、ウシ由来 STEC の遺伝学的特徴と系統的關係について、第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2013. 7. 25-26 (つくば)
    - 9) 井口純、伊豫田淳、勢戸和子、大西真、“*E. coli* O-genotyping PCR” の実用化に向けて、第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2013. 7. 25-26 (つくば)
    - 10) 井口純、秋吉充子、伊豫田淳、勢戸和子、大西真、*E. coli* O-genotyping PCR により判定できなかった STEC 株の O 抗原コード領域の解析、第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)
      - 11) 中村寛海、井口純、藤原敦史、伊豫田淳、長谷篤、小笠原準、ウシ由来 STEC の遺伝学的特徴と系統的關係について、第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)
      - 12) 秋吉充子、井口純、伊豫田淳、勢戸和子、大西真、“*E. coli* O-genotyping PCR” の実用性評価、第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013. 10. 3-4 (東京)
      - 13) 井口純、in vitro および in silico による大腸菌 O 血清群の遺伝学的判定法開発の試み、第 25 回日本臨床微生物学会総会、2014. 2. 1-2 (名古屋市)
      - 14) 井口純、大腸菌 O 抗原コード領域を標的とした分類手法 “*E. coli* O-genotyping” 第 87 回日本細菌学会総会、2014. 3. 26-28 (東京)
      - 15) 井口純、細菌ゲノム研究のフロンティア、第 7 回日本暖地畜産学会 2014. 10. 26 (宮崎市)
      - 16) 井口純、秋吉充子、吉崎美和、EHEC 検出・分類マルチプレックス PCR キットの開発と評価、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市)
      - 17) 秋吉充子、加藤結子、中村寛海、井口純、O 血清群別に見た STEC の選択培地上での生育傾向、第 35 回日本

食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19  
(堺市)

1 8) 加藤結子、大島律子、河合央博、西本清仁、佐々木麻里、成松浩志、秋吉充子、中嶋洋、緒方喜久代、伊豫田淳、石原朋子、大西真、井口純、ウシ由来 STEC の O-genotype を含めた遺伝学的特徴解析、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014. 9. 18-19 (堺市)

1 9) 井口純、中村寛海、O 血清群別に見た STEC の選択培地上での生育傾向、第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2014. 7. 15-16 (京都市)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 出願特許

1) 発明の名称：LAMP 法を用いた大腸菌 O 抗原型の検査方法および検査試薬キット、出願日：2012 年 4 月 12 日、出願番号：特願 2012-091273、発明者：井口純、出願人：国立大学法人宮崎大学

2) 発明の名称：PCR 法を用いた大腸菌の広域 O 血清群判定方法、出願日：2013 年 3 月 28 日、出願番号：特願 2013-068464、発明者：井口純、出願人：国立大学法人宮崎大学

3) 発明の名称：PCR 法を用いた大腸菌の広域 O 血清群判定方法、出願日：2014 年 3 月 28 日、出願番号：PCT/JP2014/059097、発明者：井口純、出願人：国立大学法人宮崎大学

表 1. 本研究で使用した SSI 由来大腸菌 O 血清群参考株および O 抗原合成遺伝子領域の塩基配列情報源のリスト

O 血清群	SSI 参考株	O 抗原合成 遺伝子領域塩基配列のアクセシオン 番号	サイズ	配列情報の参考文献
O1	U5-41	GU299791	10301 bp	Li D. et al. J. Microbiol. Methods 82 (1), 71-77 (2010)
O2	U9-41	GU299792	15394 bp	Li D. et al. J. Microbiol. Methods 82 (1), 71-77 (2010)
O3	U14-41	EU694097	14049 bp	Ren Y. et al. J. Microbiol. Methods 75 (2), 329-334 (2008)
O4	U4-41	AY568960	14433 bp	D'Souza J. M. et al. FEMS Microbiol. Lett. 244 (1), 27-32 (2005)
O5	U1-41	AB811596	19014 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O6	Bi7458-41	AB811597	18341 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O7	Bi7509-41	AF125322	15943 bp	Marolda C. L. et al. Microbiology 145 (Pt 9), 2485-2495 (1999)
O8	93404-41	AB811598	26523 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O9	Bi316-42	D43637	13316 bp	Kido N. et al. J. Bacteriol. 177 (8), 2178-2187 (1995)
O10	Bi8337-41	AB811599	21154 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O11	Bi623-42	HQ388393	14174 bp	Yang L. et al. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 61 258-268 (2011)
O12	Bi626-42	AB811600	16805 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O13	Su4321-41	AB972413	18293 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O14	Su4411-41	AB972414	16727 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O15	F7902-41	AY647261	11893 bp	Beutin L. et al. J. Clin. Microbiol. 43 (2), 703-710 (2005)
O16	F11119-41	AB811601	17903 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O17	K12a	AB812084	15422 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O18ab	F10018-41	AB811602	18945 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O18ac	D-M3219-54	AB811603	19922 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O19	F8188-41	AB811604	17909 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O20	P7a	AB811605	16391 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O21	E19a	EU694098	8041 bp	Ren Y. et al. J. Microbiol. Methods 75 (2), 329-334 (2008)
O22	E14a	AB811606	16589 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O23	E39a	AB811607	9332 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O24	E41a	DQ220292	18772 bp	Cheng J. et al. Curr. Microbiol. 53 (6), 470-476 (2006)
O25	E47a	GU014554	17547 bp	Wang Q. et al. J. Clin. Microbiol. 48 (6), 2066-2074 (2010)
O26	H311b	AF529080	13270 bp	D'Souza J. M. et al. Gene 297 (1-2), 123-127 (2002)
O27	F9884-41	GU014555	9510 bp	Wang Q. et al. J. Clin. Microbiol. 48 (6), 2066-2074 (2010)
O28ab	K1a	AB811608	14024 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O28ac	Kattwijk	AB811609	15777 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O29	1085-87	EU294173	14249 bp	Wang Q. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O30	P2a	AB811610	15355 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O32	P6a	EU296410	7286 bp	Wang Q. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O33	E40	AB811611	16305 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O34	H304	AB811612	21470 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O35	E77a	FJ940774	14060 bp	Liu B. et al. Vet. Microbiol. 142 (3-4), 373-378 (2010)
O36	H502a	AB811613	17217 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O37	H510c	AB811614	19104 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O38	F11621-41	AB811615	15239 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O39	H7	AB811616	21940 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O40	H316	EU296417	13698 bp	Wang Q. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O41	H710C	AB811617	19935 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O42	P11a	AB811618	16901 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O43	Bi7455-41	AB811619	19971 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O44	H702c	AB811620	15423 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O45	H61	AY771223	14483 bp	DebRoy C. et al. Appl. Environ. Microbiol. 71 (8), 4919-4924 (2005)
O46	P1c	AB811621	13542 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O48	U8-41	AB811622	19477 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press

O49	U12-41	AB811623	19664 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O50	U18-41	AB811624	16181 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O51	U19-41	AB812020	20072 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O52	U20-41	AY528413	18900 bp	Feng L. et al. J. Bacteriol. 186 (14), 4510-4519 (2004)
O53	Bi7327-41	AB812021	17467 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O54	Su3972-41	AB812085	20197 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O55	Su3912-41	AF461121	27730 bp	Wang Q. et al. J. Bacteriol. 184 (10), 2620-2625 (2002)
O56	Su3684-41	DQ220293	13075 bp	Cheng J. et al. Curr. Microbiol. 53 (6), 470-476 (2006)
O57	F8198-41	AB972415	11798 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O58	F8962-41	EU294175	17770 bp	Wang Q. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O59	F9095-41	AY654590	16573 bp	Guo H. et al. FEMS Microbiol. Lett. 248 (2), 153-161 (2005)
O60	F10167a-41	AB812022	22813 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O61	F10167a-42	GU220362	15464 bp	Li X. et al. Carbohydr. Res. 345 (11), 1581-1587 (2010)
O62	F10524-41	AB812023	21256 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O63	F10598-41	AB812024	19338 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O64	K6b	AB812025	22017 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O65	K11a	AB812026	22182 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O66	P1a	DQ069297	15137 bp	Cheng J. J. et al. Microbiol. 45 (1), 69-74 (2007)
O68	P7d	AB812027	13294 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O69	P9b	AB812028	20114 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O70	P9c	AB812029	20765 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O71	P10a	GU445927	13743 bp	Hu B. et al. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 59 (2), 161-169 (2010)
O73	P12a	DQ000313	10486 bp	Feng L. et al. Microbiology 153 (1), 139-147 (2007)
O74	E3a	AB812030	15182 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O75	E3b	GU299795	12945 bp	Li D. et al. J. Microbiol. Methods 82 (1), 71-77 (2010)
O76	E5d	AB812031	15443 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O77	E10	AB972416	15419 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O78	E38	FJ940775	12655 bp	Liu B. et al. Vet. Microbiol. 142 (3-4), 373-378 (2010)
O79	E39	EU294162	12892 bp	Liu B. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O80	E71	AB812032	21073 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O81	H5	AB812033	18282 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O82	H14	AB812034	15306 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O83	H17a	AB812035	13926 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O84	H19	AB812036	20537 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O85	H23	GU299798	11203 bp	Perepelov A. V. et al. Innate Immunity 17(2), 164-173 (2011)
O86	H35	AY220982	19288 bp	Guo H. et al. Appl. Environ. Microbiol. 71 (12), 7995-8001 (2005)
O87	H40	EU294177	7267 bp	Liu B. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O88	H53	AB812037	21331 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O89	H68	AB812038	32654 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O90	H77	AB812039	20886 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O91	H307b	AY035396	10196 bp	Perelle S. et al, J. Appl. Microbiol. 93 (5), 758-764 (2002)
O92	H308a	AB812040	16295 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O93	2885-2	AB812041	16390 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O95	H311a	AB812042	20111 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O96	H319	AB812043	14195 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O97	H320a	AB812044	19827 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O98	H501d	DQ180602	14333 bp	Cunneen M. M. and Reeves P. R. Mol. Biol. Evol. 24 (6), 1355-1365 (2007)
O99	H504c	FJ940773	17685 bp	Perepelov A. V. et al. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 57 (1), 80-87 (2009)
O100	H509a	AB812045	20808 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O101	H510a	AB812046	26407 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O102	H511	AB812047	19219 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O103	H515b	AY532664	12033 bp	Fratamico P. M. et al. Can. J. Microbiol. 51 (6), 515-522 (2005)
O104	H519	AF361371	12105 bp	Wang L. et al. Gene 270 (1-2), 231-236 (2001)
O105	H520b	EU294171	11106 bp	Wang Q. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O106	H521a	AB972417	15419 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O107	H705	EU694095	10884 bp	Wang Q. et al. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 55 (1), 47-54 (2009)
O108	H708b	AB812048	25592 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press

O109	H709c	HM485572	16597 bp	Perepelov A. V. et al. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 61 (1), 47-53 (2011)
O110	H711c	AB812049	16588 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O111	Stoke W	AF078736	14516 bp	Bastin D. A. and Reeves P. R. Gene 164 (1), 17-23 (1995)
O112ab	32W	EU296413	10812 bp	Liu B. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O112ac	Guanabara 1685	AB812050	16668 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O113	6182-50	AF172324	14263 bp	Paton A. W. and Paton J. C. Infect. Immun. 67 (11), 5930-5937 (1999)
O114	26w	AY573377	13272 bp	Feng L. et al. J. Clin. Microbiol. 42 (8), 3799-3804 (2004)
O115	27w	GU068041	15588 bp	Wang Q. et al. Mol. Cell. Probes 24 (5), 286-290 (2010)
O116	28w	AB812051	20297 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O117	30w	DQ465247	10886 bp	Liu Y. et al. Mol. Cell. Probes 21 (4), 295-302 (2007)
O118	31w	AB972418	20533 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O119	34w	GQ499368	17610 bp	Liu B. et al. Vet. Microbiol. 142 (3-4), 373-378 (2010)
O120	35w	AB812052	19924 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O121	39w	AY208937	15155 bp	Fratamico P. M. et al. J. Clin. Microbiol. 41 (7), 3379-3383 (2003)
O123	43w	AB972419	22904 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O124	Ew227	AB972420	17893 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O125	Ew2129-54	AB812053	21385 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O126	E611	DQ465248	11783 bp	Liu Y. et al. Mol. Cell. Probes 21 (4), 295-302 (2007)
O127	4932-53	AB812054	22349 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O128	56-54	AY217096	19013 bp	Shao J. et al. FEBS Lett. 553 (1-2), 99-103 (2003)
O129	178-54	AB972421	18333 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O130	Ew4866-53	EU296421	10990 bp	Liu B. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O131	S239	AB812055	18140 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O132	N87	AB812056	18692 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O133	N282	AB812057	16946 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O134	4370-53	AB812058	14265 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O135	Coli Pecs	AB972422	16164 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O136	1111-55	AB812059	12191 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O137	RVC1787	AB972423	16392 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O138	CDC62-57	DQ109551	14139 bp	Wang L. et al. Vet. Microbiol. 111 (3-4), 181-190 (2005)
O139	CDC63-57	DQ109552	12507 bp	Wang L. et al. Vet. Microbiol. 111 (3-4), 181-190 (2005)
O140	CDC149-51	AB812060	20161 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O141	RVC2907	DQ868765	15601 bp	Han W. et al. Appl. Environ. Microbiol. 73 (12), 4082-4088 (2007)
O142	C771	AB812061	18883 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O143	4608-58	EU294164	14105 bp	Liu B. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O144	1624-56	AB812062	18384 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O145	E1385-3	AY647260	15475 bp	Feng L. et al. J. Bacteriol. 187 (2), 758-764 (2005)
O146	CDC2959-54	DQ465249	11888 bp	Liu Y. et al. Mol. Cell. Probes 21 (4), 295-302 (2007)
O147	G1253	DQ868766	10319 bp	Han W. et al. Appl. Environ. Microbiol. 73 (12), 4082-4088 (2007)
O148	E519-66	DQ167407	10241 bp	Feng L. et al. Microbiology 153 (1), 139-147 (2007)
O149	D616	DQ868764	8729 bp	Han W. et al. Appl. Environ. Microbiol. 73 (12), 4082-4088 (2007)
O150	1935	EU294168	13552 bp	Liu B. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O151	880-67	AB972424	20446 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O152	1184-68	EU294170	11575 bp	Liu B. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O153	14097	AB812063	12998 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O154	E1541-68	AB812064	20962 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O155	E1529-68	AY657020	12755 bp	Guo H. et al. FEMS Microbiol. Lett. 248 (2), 153-161 (2005)
O156	E1585-68	AB812065	21656 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O157	A2	AF061251	14002 bp	Wang L. and Reeves P. R. Infect. Immun. 66 (8), 3545-3551 (1998)
O158	E1020-72	GU068044	14597 bp	Wang Q. et al. Mol. Cell. Probes 24 (5), 286-290 (2010)
O159	E2476-72	EU294176	13749 bp	Liu B. et al. FEMS Microbiol. Rev. 32 (4), 627-653 (2008)
O160	E110-69	AB812066	14841 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O161	E110-69	GU220361	15878 bp	Li X. et al. Carbohydr Res. 19;345(11):1581-1587
O162	10B-1	AB812067	25001 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O163	SN3B-1	AB812068	20184 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O164	SC647	AB972425	19387 bp	Iguchi A. et al. DNA Res. in press
O165	E78634	GU068045	11292 bp	Wang Q. et al. Mol. Cell. Probes 24 (5), 286-290 (2010)

O166	3866-54	GU299794	10140 bp	Liu B. <i>Microbiology</i> 156 (6), 1642-1649 (2010)
O167	E10702	EU296408	12864 bp	Liu B. et al. <i>FEMS Microbiol. Rev.</i> 32 (4), 627-653 (2008)
O168	E10710	EU296403	14804 bp	Liu B. et al. <i>FEMS Microbiol. Rev.</i> 32 (4), 627-653 (2008)
O169	1792-54	AB812069	21813 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O170	745-56	AB812070	14143 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O171	244-54	AB812071	18684 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O172	3288-85	AY545992	12850 bp	Guo H. et al. <i>J. Appl. Microbiol.</i> 97 (1), 181-190 (2004)
O173	L119B-10	GU068046	13697 bp	Wang Q. et al. <i>Mol. Cell. Probes</i> 24 (5), 286-290 (2010)
O174	C8/55	AB812072	14063 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O175	C12/55	AB812073	17948 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O176	E29518	AB812074	17248 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O177	E40874	DQ008593	13198 bp	Beutin L. et al. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 43 (10), 5143-5149 (2005)
O178	E54071	AB812075	17202 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O179	E43478	AB812076	17188 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O180	86-381	AB812077	21994 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O181	92-1250	AB812078	19016 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O182	99-1287	AB812079	16810 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O183	99-2442	AB627352	18026 bp	Iguchi A. et al. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 49 (10), 3678-3680 (2011)
O184	99-4473	AB812080	22184 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O185	99-6301	AB812081	16331 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O186	182-02	AB812082	22931 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press
O187	559-59	AB812083	22170 bp	Iguchi A. et al. <i>DNA Res.</i> in press



表 2. 本研究で使用した野生株の O 血清群別リスト

株数	O 血清群 <sup>a</sup>
1	O9, O11, O22, O24, O28ab, O29, O30 <sup>d</sup> , O34, O37, O41 <sup>c</sup> , O43, O52, O53, O61, O62, O65, O66, O68, O70 <sup>c</sup> , O71, O81, O82, O85, O105, O108, O112ab, O112ac, O123, O129, O135, O139, O152, O167, O171, O179, O182, O185
2	O3, O10, O12, O13 <sup>b</sup> , O14 <sup>c</sup> , O23 <sup>c</sup> , O25, O27, O33, O35, O42, O45, O48, O50 <sup>b</sup> , O54, O56, O57 <sup>c</sup> , O58, O59, O63, O69, O77, O78, O80, O83, O84, O88, O89, O93, O95, O96, O98, O99, O110, O114, O116, O117, O132, O133, O134, O137, O138, O140 <sup>c</sup> , O142, O143, O144, O147, O148, O149, O151, O154, O155 <sup>d</sup> , O158, O162, O164, O166, O169, O173 <sup>b</sup> , O177, O180, O181
3	O4, O7, O15, O21, O38, O40 <sup>c</sup> , O64 <sup>c</sup> , O74 <sup>d</sup> , O76, O79 <sup>c</sup> , O87 <sup>c</sup> , O100, O106, O120, O124 <sup>b</sup> , O125, O127, O130, O136, O159, O161, O163, O168, O187 <sup>c</sup>
4	O1 <sup>c</sup> , O6, O18ac, O16, O19 <sup>b,c</sup> , O44, O49, O73, O75, O102, O104 <sup>c</sup> , O107, O119, O131, O150, O153 <sup>b,c</sup> , O160, O178, O184 <sup>c</sup>
5	O5, O28ac, O51, O55, O109 <sup>b</sup> , O115, O118, O126, O146, O172 <sup>c</sup> , O176, O186
6	O36 <sup>b,c</sup> , O39 <sup>c</sup> , O92, O174, O175
7	O2 <sup>c</sup> , O128
8	O8, O26, O86, O101 <sup>d</sup> , O156
9	O113, O141 <sup>b,c</sup>
≥ 10 <sup>e</sup>	O91(13), O103(24), O111(16), O121(10), O145(10), O157(14), O165(11), O183(12), OUT(111)

a: 9 種類の O 血清群 (O17, O18ab, O20, O32, O46, O60, O90, O97, O170) を除く全 O 血清群に分布

b: O 血清群と O-type が一致しなかった 9 種類の O 血清群に属する 13 株 (詳細は表 9 参照)

c: 何れの O-type にも判定されなかった 20 種類の O 血清群に属する 38 株 (詳細は表 10 参照)

d: 2 種類の O-type が確認された 4 種類の O 血清群に属する 5 株 (詳細は表 11 参照)

e: ()内は供試菌株数を示す

表 3. プライマー配列のリスト

O-genotype	関連する O 血清群	標的遺伝子	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	サイズ (bp)	参照
Og1	O1	wzx	Og1-PCR_F Og1-PCR_R	GTGAGCAAAAGTGAATAAGGAACG CGGTGATACGAATACCATCCTAC	1098	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og3	O3	wzy	Og3-PCR_F Og3-PCR_R	GAATGAGTGCCACAATGGCTA GCAGAAAGAATGGACACGCAT	571	井口ら
Og4	O4	wzx	Og4-PCR_F Og4-PCR_R	TTGTTGGGATAATGTGCATGTTCC AATAATTTGCTATACCCACACCCTC	664	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og5	O5	wzy	Og5-PCR_F Og5-PCR_R	AGGGCAATCTCCGTAATGA CCTCTGGGCTATAAACAACC	566	井口ら
Og6	O6	wzy	Og6-PCR_F Og6-PCR_R	GGATGACGATGTGATTTTGGCTAAC TCTGGGTTTGTGTGTATGAGGC	783	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og7	O7	wzx	Og7-PCR_F Og7-PCR_R	CTATCAAATACCTCTGCTGGAATC TGGCTTCGAGATTAACCTATTCCT	610	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og8	O8	orf469	Og8-PCR_F Og8-PCR_R	CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG	448	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og9	O9	wzt	Og9-PCR_F Og9-PCR_R	CGTCGGCAAGGCGTATAAATA CCCAGAAATCCATGCTC	1235	井口ら
Og10	O10	wzy	Og10-PCR_F Og10-PCR_R	GCTGGAGTTGCAGGTGCTATA AAGGGCGCAGGAATGGAAGTA	546	井口ら
Og11	O11	wzy	Og11-PCR_F Og11-PCR_R	ATTAATGGGGCCAGATGGAGT ATTGCGCTGGGATGAATACA	509	井口ら
Og12	O12	wzy	Og12-PCR_F Og12-PCR_R	CAATGGGGTTGTCGTATCAAA AAAAATGCCCATAGGACCA	885	井口ら
Og15	O15	wzy	Og15-PCR_F Og15-PCR_R	TGGGCAATGGATTGGTATCT AGGGAAGAACACCGCTCCTAA	608	井口ら
Og16	O16	wzx	Og16-PCR_F Og16-PCR_R	GGTTCAATCTCACAGCAACTCAG GTTAGAGGATAATAGCCAAGCGG	302	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og19	O19	wzy	Og19-PCR_F Og19-PCR_R	ATAAGCGCGAGCTTAGCTCTT CACAACACGGCGCTAAGTAAA	389	井口ら
Og21	O21	wzx	Og21-PCR_F Og21-PCR_R	CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG TGAAAAAAGGGAAACAGAAGAGCC	209	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og22	O22	wzx	Og22-PCR_F Og22-PCR_R	TGTCGCCACTACTTCCCGGTTTA AGCCCATGACATTACTACGGCACT	458	Fratamico PM. et al. Food Analytical Methods. 2009 2:169-179
Og23	O23	wzy	Og23-PCR_F Og23-PCR_R	TCGTGGTAATGGAGGAGATG TGCCCTCTCGGCTCTGTATA	427	井口ら
Og24	O24	wzx	Og24-PCR_F Og24-PCR_R	TGGGATTTATGCGTTGCTT TGCGAGAAGAGGAGTAGTCGA	233	井口ら
Og25	O25	wzy	Og25-PCR_F Og25-PCR_R	AGAGATCCGCTTTTTTTGTTTCGC GTTCTGGATACCTAACGAATACCC	230	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og26	O26	wzx	Og26-PCR_F Og26-PCR_R	GGGGTGGGTAATATTGG AGCGCTATTTACAGAAAGA	241	Paddack Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
Og27	O27	wzy	Og27-PCR_F Og27-PCR_R	AACCCTATGGGAAGCTCTGGA ACACACAGGCAACACATCGA	382	井口ら
Og28ab	O28ab	wzy	Og28ab-PCR_F Og28ab-PCR_R	AAGCGCAGTGGATCTCGTT ACCACCCATGCGCATAGTAAT	446	井口ら
Og29	O29	wzy	Og29-PCR_F Og29-PCR_R	TGCTCCCTGCTGGTGGTTATA TACGTCAAGCCTGGTGCTAAT	260	井口ら
Og30	O30	wzy	Og30-PCR_F Og30-PCR_R	GAATGGGAGGGATATCAGAA TTGCGCTACCCTGAATAGCAT	894	井口ら
Og32	O32	wzy	Og32-PCR_F Og32-PCR_R	TCCCAACCCTGTTGCTTTAA CAGCCAGACCAGTAGAGGAAA	452	井口ら
Og33	O33	wzy	Og33-PCR_F Og33-PCR_R	GGGGCGTGGTGTGTTATTAT TCACCTACGACCAATGCAGAA	783	井口ら
Og34	O34	wzy	Og34-PCR_F Og34-PCR_R	TGCTTCTGTGGGGAGTTTA AATGGCATAATTCGTGCCATC	247	井口ら
Og35	O35	wzy	Og35-PCR_F Og35-PCR_R	TGCAGGTGCTCAATTGGTT CCATCCAATACGGAGCAATT	303	井口ら
Og36	O36	wzy	Og36-PCR_F Og36-PCR_R	AATCCAGGGATGGTTATCA TATAGAGAAATGGCACACGCTG	292	井口ら
Og37	O37	wzy	Og37-PCR_F	TTCGCCCTTGAGGAGAATT	683	井口ら

			Og37-PCR_R	TTATGCGCTCCCATTCCAA		
Og38	O38	wzy	Og38-PCR_F Og38-PCR_R	TCGCCATTGTTACACCCAGT ATTCGAAAGTGCTGGGAAAG	822	井口ら
Og39	O39	wzy	Og39-PCR_F Og39-PCR_R	GGATGGAGCGGAATACTGATT CAAACCAACCGGCATAATA	667	井口ら
Og40	O40	wzy	Og40-PCR_F Og40-PCR_R	ACGGGTAATAGCTTAGGGCAA CGAGCTACCCAATATGCTGCT	1082	井口ら
Og41	O41	wzx	Og41-PCR_F Og41-PCR_R	TGGATCGCTCGTTATTTGG CGCCACCCCTTGGTATATAAA	942	井口ら
Og43	O43	wzy	Og43-PCR_F Og43-PCR_R	TTTTGGGTGCAACTTTCAT GCTTTACCCATTGTAGCGAA	1041	井口ら
Og45	O45	wzy	Og45-PCR_F Og45-PCR_R	GTCCCCAGGGTTGTGTATG AATAAGGGAGCCCGCAT	916	井口ら
Og48	O48	wzy	Og48-PCR_F Og48-PCR_R	TATGGTGTGCTTTCTCCAA AGGAATTGCAGTTGTCCGA	793	井口ら
Og49	O49	wzy	Og49-PCR_F Og49-PCR_R	AGTTGCCTTTTCTGGGTGA TCGTATCCAATTAAGCCAGCC	789	井口ら
Og51	O51	wzy	Og51-PCR_F Og51-PCR_R	CCATGAGGGGAAACAATGTTG TTTTCCCTTGCTCTCGATA	583	井口ら
Og52	O52	wzm	Og52-PCR_F Og52-PCR_R	TTTGGTCGACGGTTAGT CAACTGTGGGAAGATGA	543	Feng L. et al. J Bacteriol. 2004 186:4510-9.
Og53	O53	wzy	Og53-PCR_F Og53-PCR_R	AAGCTCAAGGGCATGTTTT TTCCCTAACCCCTGCACTAA	806	井口ら
Og54	O54	wzy	Og54-PCR_F Og54-PCR_R	TGGCAATATATGCGTTTGTGA TGTGGACCACGTCCAACCTC	351	井口ら
Og55	O55	wzy	Og55-PCR_F Og55-PCR_R	TCCTTATTTGTGCGGGGG CCAGGAAAGCTGCCAATTATC	207	井口ら
Og56	O56	wzx	Og56-PCR_F Og56-PCR_R	CTTGGGGTTGAAGTTGGAT TGCTAATAACAATGCGCCTG	250	井口ら
Og58	O58	wzy	Og58-PCR_F Og58-PCR_R	TAGGTGCAAGTCTATGTGGG TAGCCTGGCAGCACAGATTT	1046	井口ら
Og59	O59	wzy	Og59-PCR_F Og59-PCR_R	TGATCCAGCGGGTGAATATT ACACCTGGGTTGAACTCTCCA	783	井口ら
Og60	O60	wzm	Og60-PCR_F Og60-PCR_R	TAGGTGCGGCATGGCTAATAT GAATTGGCCAACATCACGAA	443	井口ら
Og61	O61	wzy	Og61-PCR_F Og61-PCR_R	ATCTCAGACCGTCCGGATATT GCATCGAACCGGGCTATA	487	井口ら
Og63	O63	wzy	Og63-PCR_F Og63-PCR_R	ATTCGGTGTGCTGGAATTA TGAACATTATGCCACCGATG	995	井口ら
Og64	O64	wzy	Og64-PCR_F Og64-PCR_R	TGGCAATACAAGTCTGATGC AGGGCGTTACCGGATAGAAAT	727	井口ら
Og65	O65	wzy	Og65-PCR_F Og65-PCR_R	TGTTGGCGCTGGTTTTATGTT CCCATAATTGCACCGCATAA	381	井口ら
Og66	O66	wzy	Og66-PCR_F Og66-PCR_R	CGAGCAAAATAATCCAC TCAACTAAACGAAACG	301	Cheng J. et al. J Microbiol. 2007 45:69-74.
Og69	O69	wzy	Og69-PCR_F Og69-PCR_R	ACCTGGCTTTGGAGTTGATGA TAGCCAATGGTAGTCGACCAA	653	井口ら
Og70	O70	wzy	Og70-PCR_F Og70-PCR_R	CTTGGCAAAGGCACAAATCT CCTTCCGCTGCCAATAAAT	393	井口ら
Og71	O71	wzx	Og71-PCR_F Og71-PCR_R	GCATTATTAGCCACTTCAA AGCCGTATCATTAGAGCAGA	344	Hu B. et al. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010 59:161-9
Og74	O74	wzy	Og74-PCR_F Og74-PCR_R	TCCAAAGGTGATATGTTGGCA TATGCGCAGGAAAGTCAATG	289	井口ら
Og75	O75	wzy	Og75-PCR_F Og75-PCR_R	GAGATATACATGGGAGGTAGGCT ACCCGATAATCATATTCTCCCAAC	511	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og76	O76	wzy	Og76-PCR_F Og76-PCR_R	TGGCTTTTATGGCGATATGTG TTGTGAGTATAAGCCCCCAA	457	井口ら
Og78	O78	wzx	Og78-PCR_F Og78-PCR_R	GGTATGGGTTTGGTGGTA AGAATCACAACCTCTCGGCA	992	Liu B. et al. Vet Microbiol. 2010 142:373-8
Og79	O79	wzy	Og79-PCR_F Og79-PCR_R	AAATGGTCGTGACGCGAAA TTGTCTGTACGCCCTGAAAT	333	井口ら
Og80	O80	wzy	Og80-PCR_F Og80-PCR_R	TGTTGTTGATTCCACTAGCGT CGAGAGTACCTGGTTCCCAAA	285	井口ら

Og81	O81	wzy	Og81-PCR_F Og81-PCR_R	TGGTAGGTTTGGTGGTGAAT GGACGGATGACAAATGCGATA	329	井口ら
Og82	O82	wzx	Og82-PCR_F Og82-PCR_R	TCCCTATTTAACCAGGGTCT TGAATCCCTAAAACCTCGGCTT	538	井口ら
Og83	O83	wzx	Og83-PCR_F Og83-PCR_R	GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC	362	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
Og84	O84	wzx	Og84-PCR_F Og84-PCR_R	GTTGGCATATCAATTGGGGTT CGTTCCAAGAAGCACTCCAGT	775	井口ら
Og85	O85	wzy	Og85-PCR_F Og85-PCR_R	TTCCGAGGAGATCTCGATGT TTCCATCATTCCAGCTTGT	388	井口ら
Og86	O86	wzy	Og86-PCR_F Og86-PCR_R	GAGTATTTTTGGTTCACCCTT TAGCCCACTATGAATAGAGC	731	Liu B. et al. Vet Microbiol. 2010 142:373-8
Og87	O87	wzy	Og87-PCR_F Og87-PCR_R	GGATGAATGGGAAAAGCAA TCACGCGTAAATCTTCAATCC	167	井口ら
Og88	O88	wzy	Og88-PCR_F Og88-PCR_R	CTGCGCTGGAGCATTCTAT GGCGCGAAACTTTTCAATGC	781	井口ら
Og91	O91	wzy	Og91-PCR_F Og91-PCR_R	GCCTGCGATACCAGTATCCTT CCCCATAATTGGGATCATAT	953	井口ら
Og92	O92	wzf	Og92-PCR_F Og92-PCR_R	TATTCGCGTGGAAATGCTCTT CAACGGGCTCTTCCATAAA	233	井口ら
Og93	O93	wzy	Og93-PCR_F Og93-PCR_R	AAAGTGCCCGATATGCGAA CCACATAAGCTTGAGTTGCGT	229	井口ら
Og95	O95	wzf	Og95-PCR_F Og95-PCR_R	ATGGCTCCATTTCTGTCTGC AACAGCCAAAGCTTCGTCGAT	272	井口ら
Og96	O96	wzy	Og96-PCR_F Og96-PCR_R	TTAGGAGTTTTCAAAGCGG TGGTATCGGAATGCATTGCT	938	井口ら
Og97	O97	wzf	Og97-PCR_F Og97-PCR_R	AGGCAGATCGTCCACAGTCA ACAGGATAAATGCCAGCCAA	184	井口ら
Og98	O98	wzy	Og98-PCR_F Og98-PCR_R	TCCAGGCAAATGCAGTGCTT TGCTTTGTGCTTGGAGGATA	1139	井口ら
Og99	O99	wzf	Og99-PCR_F Og99-PCR_R	TATGTTCCCGCATTCTTA ATAGCGGCGATCTAAAGGGAT	226	井口ら
Og100	O100	wzy	Og100-PCR_F Og100-PCR_R	TATGGGGGGCGAATTAGGTAT ACCTGCCAGGACGAAAGAAA	1006	井口ら
Og102	O102	wzy	Og102-PCR_F Og102-PCR_R	TCCGGTAAGTATCTTACGGCA GCACCAAATAGCGAAATACCA	1025	井口ら
Og103	O103	wzx	Og103-PCR_F Og103-PCR_R	TAAGTACGGGGTGTCTTTTT AAGCTCCCGAGCAGTATAA	716	Paddack Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
Og104	O104	wzx	Og104-PCR_F Og104-PCR_R	AAGGCAGTAGCACGTTTAGCC AATAGCTGCGCCTAAAGCTGA	993	井口ら
Og105	O105	wzy	Og105-PCR_F Og105-PCR_R	GCTGTTGGTATTGCTTTTTGG TGCGCTGCCACTTAAATCAA	246	井口ら
Og108	O108	wzy	Og108-PCR_F Og108-PCR_R	AGCTTCCCTGTCTACGGTTGA CCATCCCATCACCAAATTGA	647	井口ら
Og109	O109	wzy	Og109-PCR_F Og109-PCR_R	GGATAATGGGGTGTCTTTTT GCTTCCATCCTTGACAGATAT	409	井口ら
Og110	O110	wzy	Og110-PCR_F Og110-PCR_R	CCTTGGATAGGAGCGGTTTAT ACAACCAAAGCCGTTATCA	493	井口ら
Og111	O111	wzx	Og111-PCR_F Og111-PCR_R	CAAGAGTGTCTGGGCTTCT AACGCAAGACAAGGCAAAAC	451	Paddack Z. et al. Vet Microbiol. 2012 156:381-8
Og112ab	O112ab	wzy	Og112ab-PCR_F Og112ab-PCR_R	CGGGTTAACAGCCATTTTTT CAGCCCCATTACCAGTAAT	241	井口ら
Og112ac	O112ac	wzx	Og112ac-PCR_F Og112ac-PCR_R	CTGTCTTTTTGCGCAATTA AAATCCCAAGCAAGGGTAGA	1180	井口ら
Og113	O113	wzy	Og113-PCR_F Og113-PCR_R	GCATGTATGATGCATAGCTCGCC TGATATCGTTCGCTAACCACCCA	419	DebRoy C. et al. Appl Environ Microbiol. 2004 70:1830-2
Og114	O114	wzy	Og114-PCR_F Og114-PCR_R	TCCCAAGCCATTATATTTGG TCTGATGCTGGCATCACACTC	553	井口ら
Og115	O115	wzy	Og115-PCR_F Og115-PCR_R	CGTCGTGATGTGCATTGTTT GCAACACTAAACGCCTCTTT	327	Wang Q. et al. Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
Og116	O116	wzx	Og116-PCR_F Og116-PCR_R	TCCTGCAATGACACTGACGAA ATAATCCCAATACCGCCAT	156	井口ら
Og119	O119	wzx	Og119-PCR_F	GTTAACAATCAGCTCGATAAAC	650	Liu B. et al.

			Og119-PCR_R	TTTGCAAGTAAACACCCTAAAC		Vet Microbiol. 2010 142:373-8
Og120	O120	wzx	Og120-PCR_F Og120-PCR_R	TATGGGAGTGGGGTTATGCA ATGGCGTCCAAGAGGATAGAT	329	井口ら
Og121	O121	wzy	Og121-PCR_F Og121-PCR_R	CAATGGGCGTTAATACAGCC TTCCACCCATCCAACCTCTAA	193	井口ら
Og125	O125	wzy	Og125-PCR_F Og125-PCR_R	TGAATGCTTTGGGCGAAAGT CTCGTCTTGAACCTACCAGCA	210	井口ら
Og126	O126	wzy	Og126-PCR_F Og126-PCR_R	ATGGACCTGATAAAGCATCG AACTTAATACGACCGGGAAA	645	Wang Q. et al. Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
Og128	O128	wzy	Og128-PCR_F Og128-PCR_R	ATGATTTCTTACGGAGTGC CTCTAACCTAATCCCTCCC	782	Li Y. et al. J Clin Microbiol. 2006 44:4376-83.
Og130	O130	wzy	Og130-PCR_F Og130-PCR_R	TAGCCCGTCAATCCAACCTTA CGCAACAAATATAGGAACCC	944	井口ら
Og131	O131	wzy	Og131-PCR_F Og131-PCR_R	AAATTGGATTGCCTGCCCT AAAGATGCAACCGCCTGTC	238	井口ら
Og132	O132	wzy	Og132-PCR_F Og132-PCR_R	GGCGTGAGAACCCTCAATA AAACCGAGTTCCACCAACAA	215	井口ら
Og133	O133	wzy	Og133-PCR_F Og133-PCR_R	TCTGCGTTATGGCAACTGTCA CACTCGCAAACGTCTCACATT	1017	井口ら
Og136	O136	wzy	Og136-PCR_F Og136-PCR_R	TGTTGAAGGTGCGTAATAGC AAATACACGCCCATCAATG	210	井口ら
Og138	O138	wzy	Og138-PCR_F Og138-PCR_R	CTGCATGGTTCCTTTCTGTCA CGGACAAAATGGCCAATACG	267	井口ら
Og139	O139	wzy	Og139-PCR_F Og139-PCR_R	TACGCATTGTAACGAGGAT CATCCCGACCGATAAAAGAA	287	井口ら
Og140	O140	wzy	Og140-PCR_F Og140-PCR_R	CTGCGCATGCAATTTCTTTG AAACCGATCCTAGCCGGAA	409	井口ら
Og141	O141	wzy	Og141-PCR_F Og141-PCR_R	TTGGGTGCTTATAGTTGGG CGAAAATCGGTAAGCTATGGA	745	井口ら
Og142	O142	wzy	Og142-PCR_F Og142-PCR_R	TGGGCCTGCATCATTTTTTC GGGCACGTTGACGTAATCTAA	538	井口ら
Og143	O143	wzy	Og143-PCR_F Og143-PCR_R	TGGCCTGCATGCTCTTTTT ATATACCCCTCCGAGGACAAA	500	井口ら
Og144	O144	wzx	Og144-PCR_F Og144-PCR_R	CGATGCAGATTAATTCAGCCT AACTGTGGCTCATGCCAATA	406	井口ら
Og145	O145	wzy	Og145-PCR_F Og145-PCR_R	TTGCGCACAGCATGGTTAT TACAATGCACCGCAACAGT	132	井口ら
Og146	O146	wzx	Og146-PCR_F Og146-PCR_R	CGCCACAATTACCATGGGA CCCTCCAGGCAAAATTACA	801	井口ら
Og147	O147	wzy	Og147-PCR_F Og147-PCR_R	TGGAATGCTCTCATTCCATTTGCCT GATGACATTACCCAACCAGAACC	399	DebRoy et al. Foodborne Pathog Dis. 2010 7:1407-1414
Og148	O148	wzx	Og148-PCR_F Og148-PCR_R	TGGCAACCATTGTCTTGCA CCCCAAGCCCATATAGTAA	865	井口ら
Og149	O149	wzy	Og149-PCR_F Og149-PCR_R	TTTGGTGCAGATACTCAGA GAACAATAGATGCGATACAA	709	Han W. et al. Appl Environ Microbiol. 2007 73:4082-8
Og150	O150	wzx	Og150-PCR_F Og150-PCR_R	ACCACCGGGATATGAACATGA AGTCCAAAGCAACCAACCAA	1089	井口ら
Og152	O152	wzy	Og152-PCR_F Og152-PCR_R	AGGCGCTGATTACTTCCGATA ACCTACCCCACTTCCGATTTT	568	井口ら
Og154	O154	wzx	Og154-PCR_F Og154-PCR_R	TCCGACACAGTTAGGTGCGTA TAATCACCCGACAATAAGCC	299	井口ら
Og155	O155	wzy	Og155-PCR_F Og155-PCR_R	ATGCCATAGGCAATTTGATT GAGCATCGTGCAGCTGATA	671	井口ら
Og156	O156	wzy	Og156-PCR_F Og156-PCR_R	GGA AAAATGGAACATTTAGCGG TCGGAGTGCCAACCAAAAATA	236	井口ら
Og157	O157	<i>rfbE</i>	Og157-PCR_F Og157-PCR_R	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG	296	Bertrand R. and Roig B. Water Res. 2007 41:1280-6
Og158	O158	wzy	Og158-PCR_F Og158-PCR_R	CTGCGGTATTACCCAGAACAA ACGCATTGATGCATTTCTCT	693	井口ら
Og159	O159	wzy	Og159-PCR_F Og159-PCR_R	TGTGTATGTTAGGCGGGGTAA AGTCGGTTCATTTGTTGCA	298	井口ら
Og160	O160	wzx	Og160-PCR_F Og160-PCR_R	TGTTTCAGGGGCTTGAAAAG CAACTTGATACGTTGTCCCA	333	井口ら

Og161	O161	wzx	Og161-PCR_F Og161-PCR_R	TATGTTGGCGGATATTCGGT AGGCAACGGATGGAATTGAT	349	井口ら
Og163	O163	wzy	Og163-PCR_F Og163-PCR_R	GCAATCTTGAAGCCAGAACCT AAGATGTTCCACTCCCTGCAA	342	井口ら
Og165	O165	wzx	Og165-PCR_F Og165-PCR_R	GGCGTAAATAAAATATGGGGG GCCCTCTAACAAACGAATTGT	1042	井口ら
Og166	O166	wzy	Og166-PCR_F Og166-PCR_R	TTCATAGCTGGCCTCCTTGTT TCTATTGCCGGAATCCTTTCT	462	井口ら
Og167	O167	wzy	Og167-PCR_F Og167-PCR_R	TCAGGGCAATTACAATCCTT TCGCGCATAGAATAGCATGTC	403	井口ら
Og168	O168	wzy	Og168-PCR_F Og168-PCR_R	AGTGAGCCTGCTGCATTATGT ACGCTGCTGGATACTATCCGA	282	井口ら
Og169	O169	wzx	Og169-PCR_F Og169-PCR_R	GCCGGTTCAACAATCGTAAT GCCGCTTTAACAAATGCTTTC	221	井口ら
Og170	O170	wzy	Og170-PCR_F Og170-PCR_R	TTGCGTTCGGAAATGTACTC AATCCAACACCCGATTTTG	271	井口ら
Og171	O171	wzy	Og171-PCR_F Og171-PCR_R	AGCGGTGTGGTTCGTCTTTT TGAATCCGAGGGGTATCAAA	212	井口ら
Og172	O172	wzx	Og172-PCR_F Og172-PCR_R	TGGGGGTGTGGTATGTTTT AATGCTCCCTTGAATCCTGTT	1108	井口ら
Og173	O173	wzy	Og173-PCR_F Og173-PCR_R	TTCAAAGTGTCTGGAGGGA TGGCTGAGACTTGACTATTTT	606	Wang Q. et al. Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
Og174	O174	wzy	Og174-PCR_F Og174-PCR_R	CGGAAGTCGGACTGCTATTTT TATGTGACCTAGCACCCCAA	541	井口ら
Og175	O175	wzy	Og175-PCR_F Og175-PCR_R	TTCCGCAAGCTACCTGCTTT TGTATCCCCAAACCATCAT	690	井口ら
Og176	O176	wzy	Og176-PCR_F Og176-PCR_R	TTGGCGTGCCAGGTATATATC TGACAGAGCTATCCCCTTGA	809	井口ら
Og177	O177	wzy	Og177-PCR_F Og177-PCR_R	CCGATACACCGGATGGATTAT AAGCCAGTACCAGAACAGGA	427	井口ら
Og179	O179	wzy	Og179-PCR_F Og179-PCR_R	ACGGGCTGATTATTTGTCTCT AAACAAGACCCTTGCCATA	608	井口ら
Og180	O180	wzy	Og180-PCR_F Og180-PCR_R	TGGCATCAACGAATGATGCA TTGCCATGCTTACCAATA	744	井口ら
Og181	O181	wzy	Og181-PCR_F Og181-PCR_R	AGGACTCCGATTTACTACCGC ACAGCGAATGCAACAATTGG	261	井口ら
Og182	O182	wzy	Og182-PCR_F Og182-PCR_R	CGGTGATGGTCTATTCTTGG TGCTTGCAACACTGTGTTA	510	井口ら
Og183	O183	wzx	Og183-PCR_F Og183-PCR_R	CGTGGTAACCAATTCGCAA GGGAATAACGAACGGTTTACA	666	井口ら
Og184	O184	wzy	Og184-PCR_F Og184-PCR_R	TTCTGGTCACCAGCTTGAT TCCTGCCCTCACATGGATAT	964	井口ら
Og185	O185	wzy	Og185-PCR_F Og185-PCR_R	TGGTCGGTTGCCTTGTTTT CTGACCGATAAAAGCCAACA	254	井口ら
Og187	O187	wzy	Og187-PCR_F Og187-PCR_R	CTTCTGTTGGTCTGCTTTGT AAAAAGAACGGTCTCGCTA	828	井口ら
OgGp1	O20, O137	wzy	Og137-PCR_F Og137-PCR_R	GGGATAGTTTTATTGTTGCA GTTAGCCATCCCAAGGTA	1007	Wang Q. et al. Mol Cell Probes. 2010 24:286-90.
OgGp2	O28ac, O42	wzx	Og28ac-PCR_F Og28ac-PCR_R	GGTAATACACTTGTGTGGTGGGT ATGATTGACCATCCCAGGCCGTAT	218	Fratamico PM. et al. Can J Microbiol. 2010 56:308-16
OgGp3	O118, O151	wzy	Og118-PCR_F Og118-PCR_R	GTGGGAGTCTGAATCAAGTTGCGA AGCAACCTTACCAATCCTAAGGG	344	Liu Y et al. Foodborne Pathog Dis. 2008 5:449-457
OgGp4	O90, O127	wzy	Og127-PCR_F Og127-PCR_R	TTCATCTCCGCTGGGAATACA AATTGGTGACGCTGGAATGA	451	井口ら
OgGp5	O123, O186	wzy	Og186-PCR_F Og186-PCR_R	TTTCAACAGGTTGCAATGCC CCCACCAATACCACTGGAATA	362	井口ら
OgGp6	O46, O134	wzy	Og46-PCR_F Og46-PCR_R	TTAACTGGTTCAAGGACGGG TGACCGTTATTGCAAGCGAT	445	井口ら
OgGp7	O2, O50	wzx	Og2-PCR_F Og2-PCR_R	TGGCCTTGTTGATATACTGCGGA TCACAGAGCTGAGCGAACTGTTCA	813	Fratamico PM. et al. Can J Microbiol. 2010 56:308-16
OgGp8	O107, O117	wzy	Og117-PCR_F Og117-PCR_R	TGTTCTCCACTGCGATCATAGGT ACATAGAGTACCCGACACCATCAC	518	Liu Y et al. Mol Cell Probes. 2007 21:295-302.
OgGp9	O17,	wzy	Og44-PCR_F	GAGGGCCGGATACATTTGTA	849	井口ら

	O44, O73, O77, O106		Og44-PCR_R	ATACCACAGCGGGATGAAGTT		
OgGp10	O13, O129, O135	wzy	Og13-PCR_F Og13-PCR_R	TGGTGGTGGGAAGATTACTGGA CCAAACAAGAACGTGCGCTAAA	774	井口ら
OgGp11	O153, O178	wzy	Og153-PCR_F Og153-PCR_R	TCGGTAACGGCTTTGCATTA AACCCAGCCAATAGCAAAA	703	井口ら
OgGp12	O18ab, O18ac	wzx	Og18ab-PCR_F Og18ab-PCR_R	GTCGGTGGTTGGATTACAGTTAG CTACTATCATCCTCACTGACCACG	551	Li D. et al. J Microbiol Methods. 2010 82:71-7
OgGp13	O124, O164	wzx	Og124-PCR_F Og124-PCR_R	AGTCACCGCGATGAATGATT GCATTAAGTGGCGTCTGAATT	270	井口ら
OgGp14	O62, O68	wzy	Og62-PCR_F Og62-PCR_R	TCATGGTGGTCATCAAGCTTT ACAATGCTGGATGAAATGCC	548	井口ら
OgGp15	O89, O101, O162	wzt	Og89-PCR_F Og89-PCR_R	TCTGTTGGACATCGCTCTAGG AATGCTAATCTCACGCGCAT	198	井口ら
( <i>E. coli</i> -specific PCR)		<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> _F <i>gyrB</i> _R	AGTGATCATGACCGTTCTGCA TTTGCCATGTAGCGTTCA	622	井口ら

表 4. シンプレックス PCR の反応液組成

PCR grade water	14.94	
5x KAPA Extra Buffer (without Mg <sup>2+</sup> )	6	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	
dNTP mix (10mM each dNTP)	0.9	
Forward primer (10 μM)	1.5	final 0.5 μM
Reverse primer (10 μM)	1.5	final 0.5 μM
KAPA Taq DNA polymerase (5 U/ml)	0.16	
Template DNA	2	
total	30 μl	

表 5. シンプレックス PCR の反応条件

1. Initial Denaturation	-	-	25 cycles
2. Denaturation	94°C	30 sec	
3. Annealing	58°C	30 sec	
4. Extension	72°C	1 min	
5. Final Extension	-	-	

表 6. マルチプレックス PCR 用プライマーミックスの組み合わせと組成

マルチ プレッ クス PCR	プライマー名	関連する O 血清群	O-genotype	サイズ (bp)	混和するプライマー (100 mM) の組成 forward/reverse (μl)
MP-1	Og165_PCR	O165	Og165	1042	160/160
	Og103_PCR	O103	Og103	716	80/80
	Og111_PCR	O111	Og111	451	80/80
	Og157_PCR	O157	Og157	296	160/160
	Og26_PCR	O26	Og26	241	80/80
	Og121_PCR	O121	Og121	193	80/80
	Og145_PCR	O145	Og145	132	80/80
				TE	1760
			Total	3520	
MP-2	Og112ac_PCR	O112ac	Og112ac	1180	80/80
	Og148_PCR	O148	Og148	865	80/80
	Og158_PCR	O158	Og158	693	80/80
	Og114_PCR	O114	Og114	553	80/80
	Og144_PCR	O144	Og144	406	80/80
	Og159_PCR	O159	Og159	298	80/80
	Og169_PCR	O169	Og169	221	80/80
				TE	2400
			Total	3520	
MP-3	Og1_PCR	O1	Og1	1098	80/80
	Og146_PCR	O146	Og146	801	80/80
	Og119_PCR	O119	Og119	650	80/80
	Og142_PCR	O142	Og142	538	80/80
	Og167_PCR	O167	Og167	403	80/80
	Og74_PCR	O74	Og74	289	80/80
	Og125_PCR	O125	Og125	210	80/80
				TE	2400
			Total	3520	
MP-4	Og63_PCR	O63	Og63	995	80/80
	Og6_PCR	O6	Og6	783	80/80
	Og126_PCR	O126	Og126	645	80/80
	Og143_PCR	O143	Og143	500	80/80
	Og27_PCR	O27	Og27	382	80/80
	Og168_PCR	O168	Og168	282	80/80
	Og136_PCR	O136	Og136	210	80/80
				TE	2400
			Total	3520	
MP-5	Og78_PCR	O78	Og78	992	80/80
	Og128_PCR	O128	Og128	782	80/80
	Og15_PCR	O15	Og15	608	80/80
	Og166_PCR	O166	Og166	462	80/80
	Og161_PCR	O161	Og161	349	80/80
	Og29_PCR	O29	Og29	260	80/80
	Og55_PCR	O55	Og55	207	80/80
				TE	2400
			Total	3520	
MP-6	Og91_PCR	O91	Og91	953	80/80
	Og86_PCR	O86	Og86	731	80/80
	Og152_PCR	O152	Og152	568	80/80
	Og8_PCR	O8	Og8	448	80/80



	Og115_PCR	O115	Og115	327	80/80
	Og25_PCR	O25	Og25	230	80/80
				TE	2560
			Total		3520
MP-7	Og137_PCR	O20, O137	OgGp1	1007	80/80
	Og44_PCR	O17, O44, O73, O77, O106	OgGp9	849	80/80
	Og153_PCR	O153, O178	OgGp11	703	80/80
	Og18ab_PCR	O18ab, O18ac	OgGp12	551	80/80
	Og127_PCR	O90, O127	OgGp4	451	160/160
	Og118_PCR	O118, O151	OgGp3	344	80/80
	Og124_PCR	O124, O164	OgGp13	270	80/80
	Og28ac_PCR	O28ac, O42	OgGp2	218	80/80
			TE	2080	
			Total		3520
MP-8	Og9_PCR	O9	Og9	1235	80/80
	Og41_PCR	O41	Og41	942	80/80
	Og33_PCR	O33	Og33	783	80/80
	Og108_PCR	O108	Og108	647	80/80
	Og174_PCR	O174	Og174	541	80/80
	Og60_PCR	O60	Og60	443	80/80
	Og54_PCR	O54	Og54	351	80/80
	Og80_PCR	O80	Og80	285	80/80
	Og92_PCR	O92	Og92	233	80/80
			TE	2080	
			Total		3520
MP-9	Og98_PCR	O98	Og98	1139	160/160
	Og96_PCR	O96	Og96	938	80/80
	Og59_PCR	O59	Og59	783	80/80
	Og69_PCR	O69	Og69	653	80/80
	Og82_PCR	O82	Og82	538	80/80
	Og177_PCR	O177	Og177	427	80/80
	Og71_PCR	O71	Og71	344	160/160
	Og95_PCR	O95	Og95	272	80/80
	Og93_PCR	O93	Og93	229	80/80
			TE	1760	
			Total		3520
MP-10	Og172_PCR	O172	Og172	1108	80/80
	Og88_PCR	O88	Og88	781	80/80
	Og37_PCR	O37	Og37	683	80/80
	Og117_PCR	O107, O117	OgGp8	518	80/80
	Og23_PCR	O23	Og23	427	80/80
	Og163_PCR	O163	Og163	342	80/80
	Og170_PCR	O170	Og170	271	80/80
	Og99_PCR	O99	Og99	226	80/80
	Og116_PCR	O116	Og116	156	80/80
			TE	2080	
			Total		3520
MP-11	Og150_PCR	O150	Og150	1089	80/80
	Og30_PCR	O30	Og30	894	80/80
	Og84_PCR	O84	Og84	775	80/80
	Og183_PCR	O183	Og183	666	80/80
	Og75_PCR	O75	Og75	511	80/80
	Og113_PCR	O113	Og113	419	80/80
	Og160_PCR	O160	Og160	333	80/80

	Og138_PCR	O138	Og138	267	80/80
	Og132_PCR	O132	Og132	215	80/80
				TE	2080
			Total		3520
MP-12	Og40_PCR	O40	Og40	1082	80/80
	Og45_PCR	O45	Og45	916	80/80
	Og13_PCR	O13, O129, O135	OgGp10	774	80/80
	Og7_PCR	O7	Og7	610	80/80
	Og182_PCR	O182	Og182	510	80/80
	Og109_PCR	O109	Og109	409	80/80
	Og79_PCR	O79	Og79	333	80/80
	Og181_PCR	O181	Og181	261	80/80
	Og171_PCR	O171	Og171	212	80/80
				TE	2080
			Total		3520
MP-13	Og58_PCR	O58	Og58	1046	80/80
	Og12_PCR	O12	Og12	885	80/80
	Og141_PCR	O141	Og141	745	80/80
	Og179_PCR	O179	Og179	608	80/80
	Og11_PCR	O11	Og11	509	80/80
	Og140_PCR	O140	Og140	409	80/80
	Og81_PCR	O81	Og81	329	80/80
	Og56_PCR	O56	Og56	250	80/80
	Og21_PCR	O21	Og21	209	80/80
				TE	2080
			Total		3520
MP-14	Og43_PCR	O43	Og43	1041	80/80
	Og187_PCR	O187	Og187	828	80/80
	Og180_PCR	O180	Og180	744	80/80
	Og173_PCR	O173	Og173	606	80/80
	Og110_PCR	O110	Og110	493	80/80
	Og147_PCR	O147	Og147	399	80/80
	Og120_PCR	O120	Og120	329	80/80
	Og185_PCR	O185	Og185	254	80/80
	Og89_PCR	O89, O101, O162	OgGp15	198	80/80
				TE	2080
			Total		3520
MP-15	Og102_PCR	O102	Og102	1025	80/80
	Og38_PCR	O38	Og38	822	80/80
	Og64_PCR	O64	Og64	727	80/80
	Og51_PCR	O51	Og51	583	80/80
	Og61_PCR	O61	Og61	487	80/80
	Og70_PCR	O70	Og70	393	80/80
	Og35_PCR	O35	Og35	303	80/80
	Og34_PCR	O34	Og34	247	80/80
	Og97_PCR	O97	Og97	184	80/80
				TE	2080
			Total		3520
MP-16	Og133_PCR	O133	Og133	1017	80/80
	Og2_PCR	O2, O50	OgGp7	813	80/80
	Og149_PCR	O149	Og149	709	80/80
	Og5_PCR	O5	Og5	566	80/80
	Og22_PCR	O22	Og22	458	80/80
	Og19_PCR	O19	Og19	389	80/80

	Og16_PCR	O16	Og16	302	80/80
	Og105_PCR	O105	Og105	246	80/80
	Og87_PCR	O87	Og87	167	80/80
				TE	2080
				Total	3520
MP-17	Og100_PCR	O100	Og100	1006	80/80
	Og176_PCR	O176	Og176	809	80/80
	Og175_PCR	O175	Og175	690	80/80
	Og3_PCR	O3	Og3	571	80/80
	Og76_PCR	O76	Og76	457	80/80
	Og85_PCR	O85	Og85	388	80/80
	Og66_PCR	O66	Og66	301	160/160
	Og112ab_PCR	O112ab	Og112ab	241	80/80
				TE	2080
				Total	3520
MP-18	Og104_PCR	O104	Og104	993	80/80
	Og53_PCR	O53	Og53	806	80/80
	Og155_PCR	O155	Og155	671	80/80
	Og62_PCR	O62, O68	OgGp14	548	80/80
	Og32_PCR	O32	Og32	452	80/80
	Og65_PCR	O65	Og65	381	80/80
	Og154_PCR	O154	Og154	299	80/80
	Og131_PCR	O131	Og131	238	80/80
				TE	2240
				Total	3520
MP-19	Og184_PCR	O184	Og184	964	80/80
	Og48_PCR	O48	Og48	793	80/80
	Og39_PCR	O39	Og39	667	80/80
	Og10_PCR	O10	Og10	546	80/80
	Og28ab_PCR	O28ab	Og28ab	446	80/80
	Og186_PCR	O123, O186	OgGp5	362	160/160
	Og36_PCR	O36	Og36	292	80/80
	Og156_PCR	O156	Og156	236	80/80
				TE	2080
				Total	3520
MP-20	Og130_PCR	O130	Og130	944	80/80
	Og49_PCR	O49	Og49	789	80/80
	Og4_PCR	O4	Og4	664	80/80
	Og52_PCR	O52	Og52	543	80/80
	Og46_PCR	O46, O134	OgGp6	445	80/80
	Og83_PCR	O83	Og83	362	80/80
	Og139_PCR	O139	Og139	287	80/80
	Og24_PCR	O24	Og24	233	80/80
				TE	2240
				Total	3520

表 7. マルチプレックス PCR の反応液組成

PCR grade water	14.42
5x KAPA Extra Buffer (without Mg <sup>2+</sup> )	6
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3
dNTP mix (10 mM each dNTP)	0.9
multiplex primer mix (表 6 参照)	3.52
KAPA Taq DNA polymerase (5 U/ml)	0.16
Template DNA	2
total	30 $\mu$ l

表 8. マルチプレックス PCR の反応条件

1. Initial Denaturation	94°C	1 min	25 cycles
2. Denaturation	94°C	30 sec	
3. Annealing	58°C	30 sec	
4. Extension	72°C	1 min	
5. Final Extension	72°C	2 min	