

表 1 プライマー及びプローブの塩基配列と反応液調製

標的遺伝子プライマー等	塩基配列 (5' -3')	容量 (μL)
<i>STh</i> プライマー (10p)	aaagtggctcctgaaagcatgaatag	0.5
プライマー (10p)	cacccggtacaagcaggatt	0.5
プローブ (5p)	FAM-Agcaattactgctgtgaattgtgtt-TAMRA	0.33
<i>STp</i> プライマー	gcaaaatccgtttaactaatctcaaa	0.5
プライマー (10p)	acagaaataaaaaatgccaacattagc	0.5
プローブ (5p)	FAM-ttacctcccgtcatgtgtttcacggat-TAMRA	0.33
<i>Lt</i> プライマー (10p)	ccggcagaggatggttacag	0.5
プライマー (10p)	gaatccagggtcttctctcaa	0.5
プローブ (5p)	FAM-ttacctcccgtcatgtgtttcacggat-TAMRA	0.33
2 × Enviromental Mastermix		12.5
蒸留水		5.51
鋳型 DNA		3

表2 供試菌株の性状及びmEC培地における増殖結果

菌株 No.	毒素産生性		分離平板培地での発育								mEC 培地中の菌数 (log cfu/mL)	
	コンベンショナル PCR ^{*1} (Oneshot STp/STh/LT)	リアルタイム PCR ^{*2}	SMAC 寒天培地		DHL 寒天培地		トリガリスキ- 改良培地		クモアガ - STEC 基礎培地		mEC 培養温度	
			mEC 培養温度		mEC 培養温度		mEC 培養温度		mEC 培養温度		36	42
			36	42	36	42	36	42	36	42		
05	STh	ST	+	+	+	+	+	+	+	+	> 8.0	> 8.0
K1	STh	ST	+	+	+	+	+	+	+	+	> 8.0	> 7.0
K2	STh	ST	+	+	+	+	+	+	+	+	> 8.0	> 7.0
F1	STh	ST	+	+	+	+	+	+	+	+	> 8.0	> 7.0

*1 コンベンショナル PCR は、各エンテロトキシンの検出を個別の増幅反応で行う。

*2 リアルタイム PCR は、各耐熱性エンテロトキシン (ST) の検出に同じ蛍光色素 FAM を使用しているため、マルチプレクス反応系では区別ができない。

表3 リアルタイム PCR による食品培養液の毒素産生性遺伝子検出感度

食品	血清型 (菌株 No.)	検出感度 (log cfu/mL)	
		ST	LT
ミニトマト	0169 (T5)	約 2.0	-
	06 (T6)	約 2.0	約 2.0
大根の漬物	0148 (T11)	約 2.0	-
	0169 (T5)	約 2.0	-
	06 (T6)	約 2.0	約 2.0
根深ネギ	0148 (T11)	約 2.0	-
	0169 (T5)	約 3.0	-
	06 (T6)	約 2.0	約 2.0
生食用ボイルわかめ	0148 (T11)	約 2.0	-
	0169 (T5)	約 2.0	-
	06 (T6)	約 2.0	約 2.0
	0148 (T11)	約 2.0	-

*T5 (ST 遺伝子保有株)、T6 (LT、ST 遺伝子保有株)、T11 (ST 遺伝子保有株)

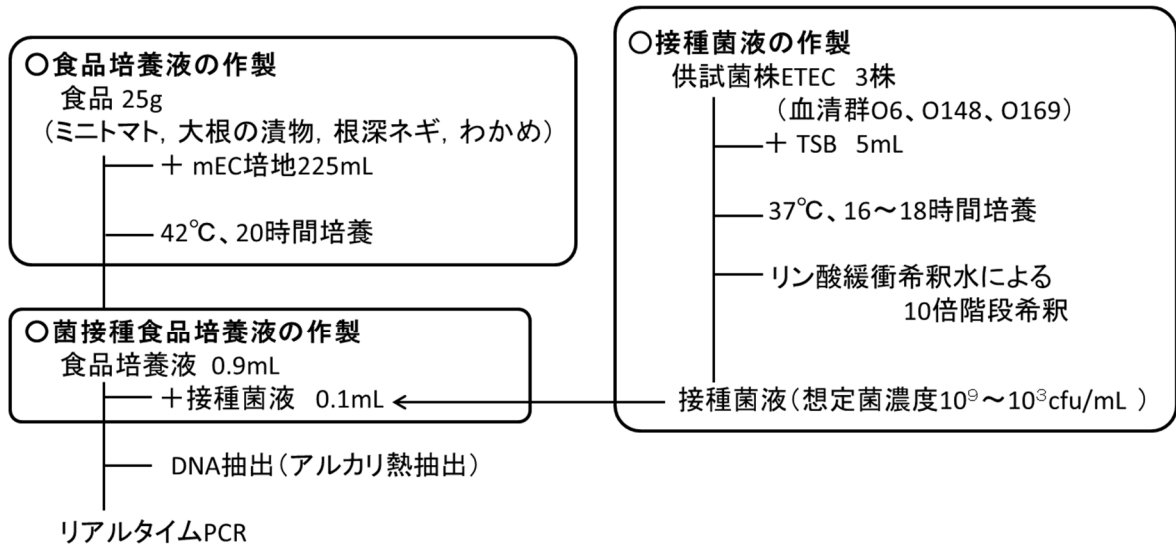


図1 ST及びLT遺伝子検出法の検出感度試験

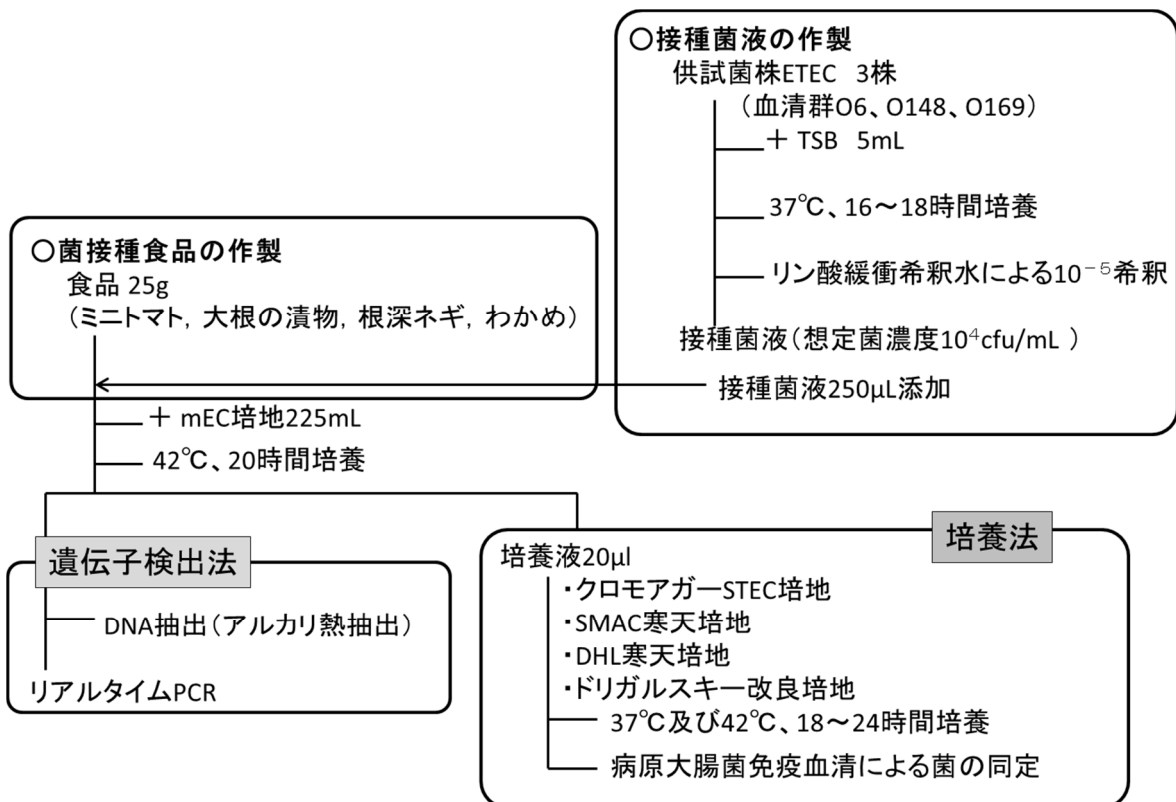


図2 食品からの培養法及び毒素遺伝子スクリーニング検出による毒素原性大腸菌検査法の検討