

タイトル: 大腸菌の生菌選択的DNA検出<条件検討>

カテゴリ: PCR検査

キーワード: 生菌検出、リアルタイムPCR、大腸菌、EMA-PCR、グラム陰性菌

データソース: タカラバイオ(株)

方法:

培養した大腸菌を生理食塩水に懸濁して生菌サンプルとした。また、その懸濁液の一部を95℃、5分間熱処理したものを死菌サンプルとした。Viable Bacteria Selection Kit for PCR (Gram Negative) (製品コード [7700](#)) の手順に従ってEMA処理を行い、続いてNucleoSpin® Tissue XS (製品コード [740901.50](#)) を用いてDNAを抽出し、得られたDNAを鋳型としてSYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード [RR420A](#)) とThermal Cycler Dice® Real Time Systemを用いたリアルタイムPCRを行った (qPCR 20 μl系に各サンプルを2 μl使用、ターゲットは大腸菌LacZ、増幅サイズ70 bp)。

結果:

生菌由来DNAの検出への影響

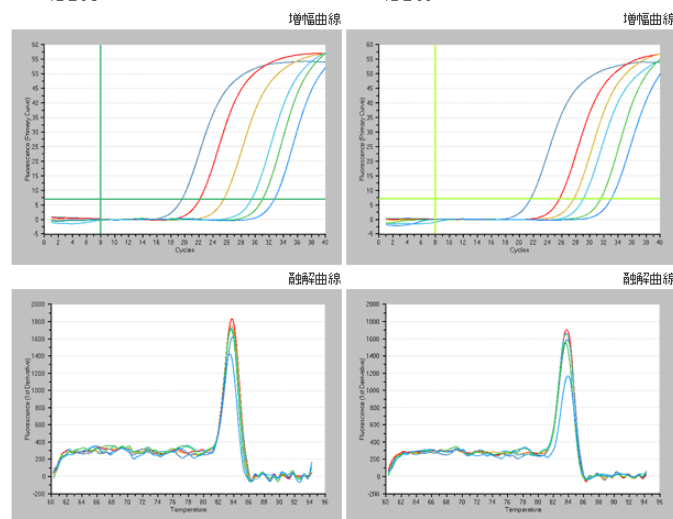
1×10⁷~1×10²個の生菌サンプルでEMA処理あり/なしサンプルの増幅曲線を比較することにより、生菌検出への影響を確認したところ、10⁷~10⁵個では1.5~2サイクル程度のCt値の遅れが認められたが、それ以下の菌数では同等の結果が得られており、検出感度には影響がないことが分かった。

死菌由来DNAの増幅抑制効果

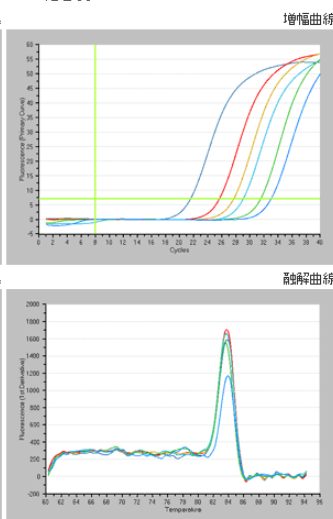
1×10⁷~1×10²個の死菌サンプルでEMA処理あり/なしサンプルの増幅曲線を比較することにより、EMA処理による死菌由来DNAの増幅抑制効果を確認したところ、少なくとも10⁵個までの大腸菌の死菌を完全に抑制できることが分かった。

生菌への影響

<EMA処理なし>

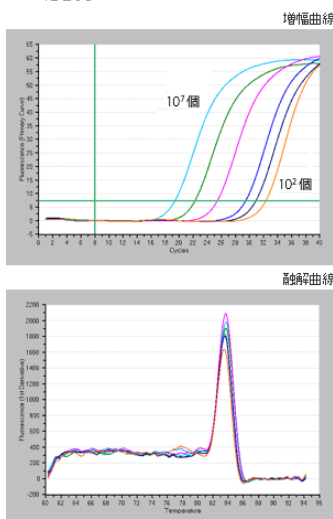


<EMA処理あり>

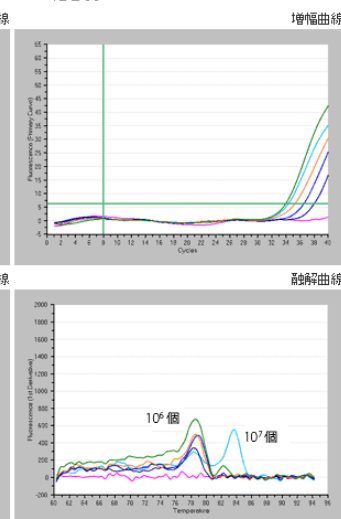


死菌抑制効果

<EMA処理なし>



<EMA処理あり>



備考: