

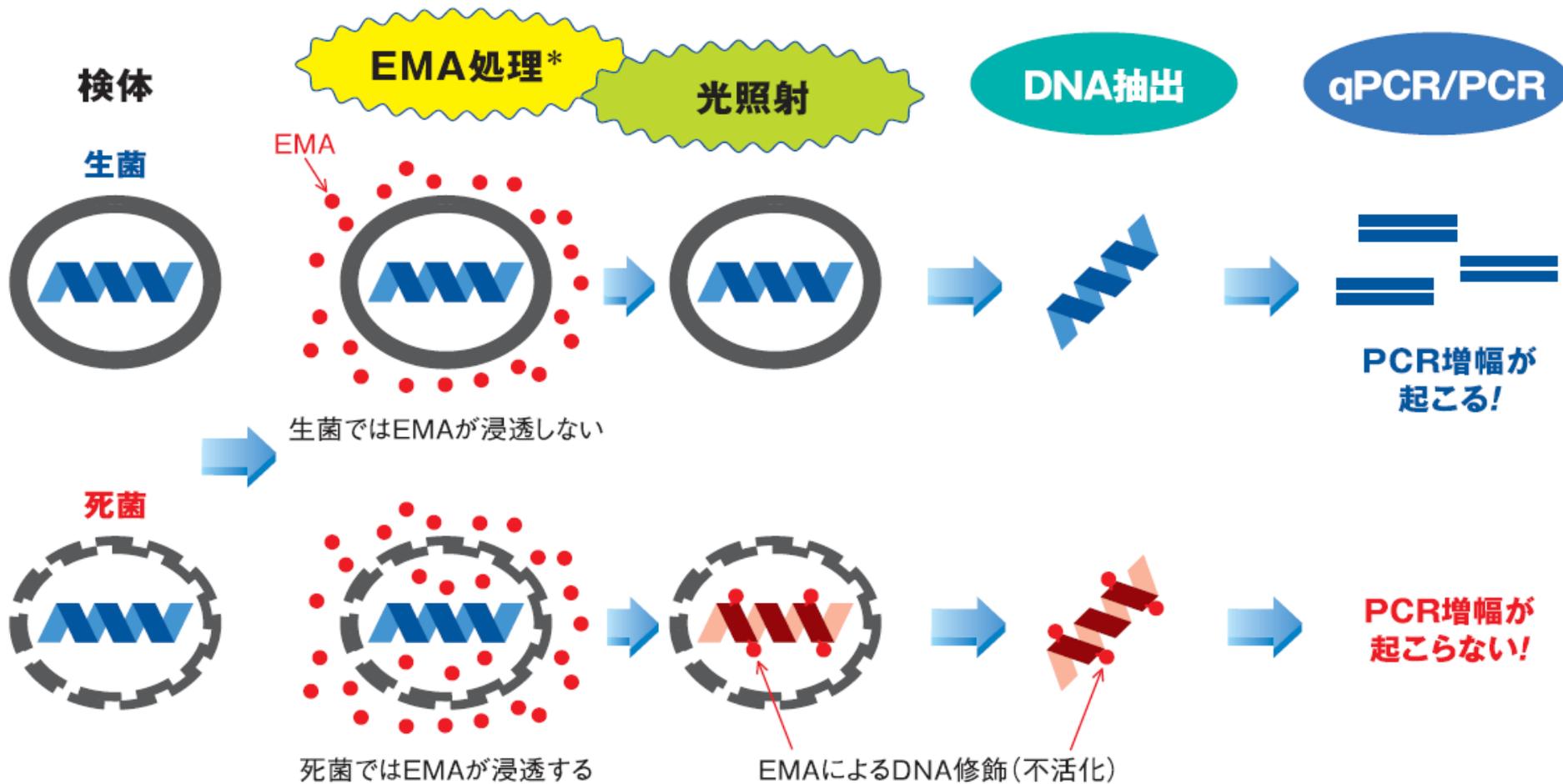
TakaRa

EMA-PCR法による 食品からの生菌迅速検出

タカラバイオ株式会社
ドラゴンジェノミクスセンター
田畑早苗, ○吉崎美和, 鳶田雅光

2012/10/25

EMA-PCR法の原理



Introduction

昨年度の報告より

- **サルモネラ生菌検出系の構築**
 - サルモネラ菌検出系に対して、EMA処理条件を最適化。
 - 液卵中に存在するサルモネラ菌を生菌選択的に検出できた。
- **増菌培養&EMA-qPCRによる生菌高感度検出**
 - 一晩の増菌培養により、少数の生菌(1~10個)を検出できた。
 - 死菌混在下でも、その影響を排除し正しい結果を得ることができた。

今年度の検討課題

- **各種食材からの生菌検出法の確立**
- **短時間の増菌培養との組合せによる迅速検出**

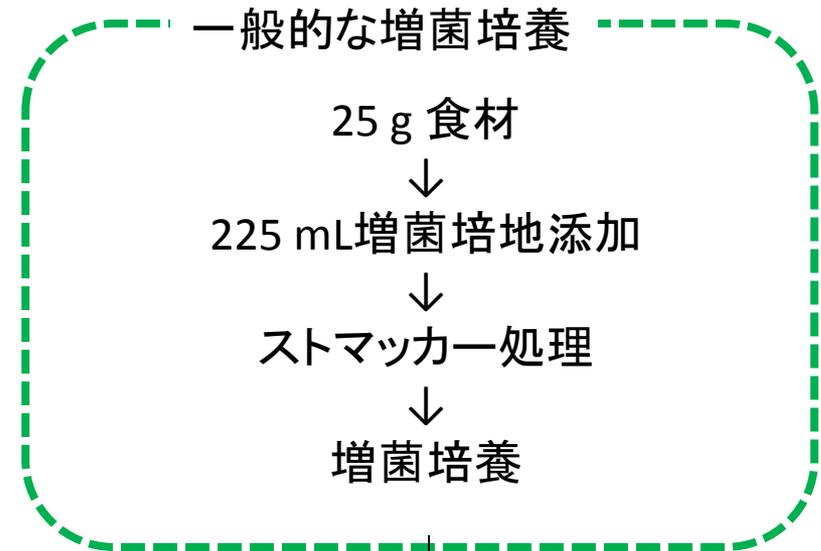
各種食材からの生菌検出法

① 希釈法

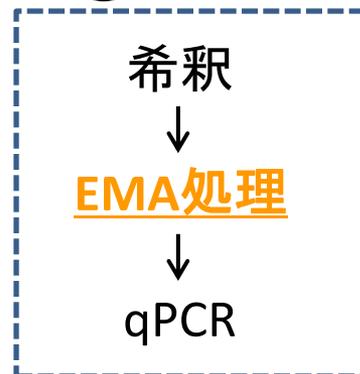
- EMA処理前に菌液を希釈
- DNA精製の必要がない**迅速な方法**
- ✓ PCR阻害の有無がポイント

② DNA精製法

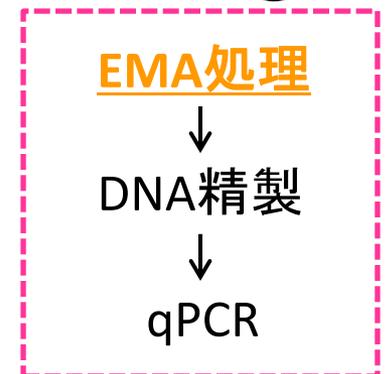
- EMA処理後にDNA精製を行う
- 菌液の原液を用いる**高感度な方法**
- ✓ EMA処理への影響の有無がポイント



①



②

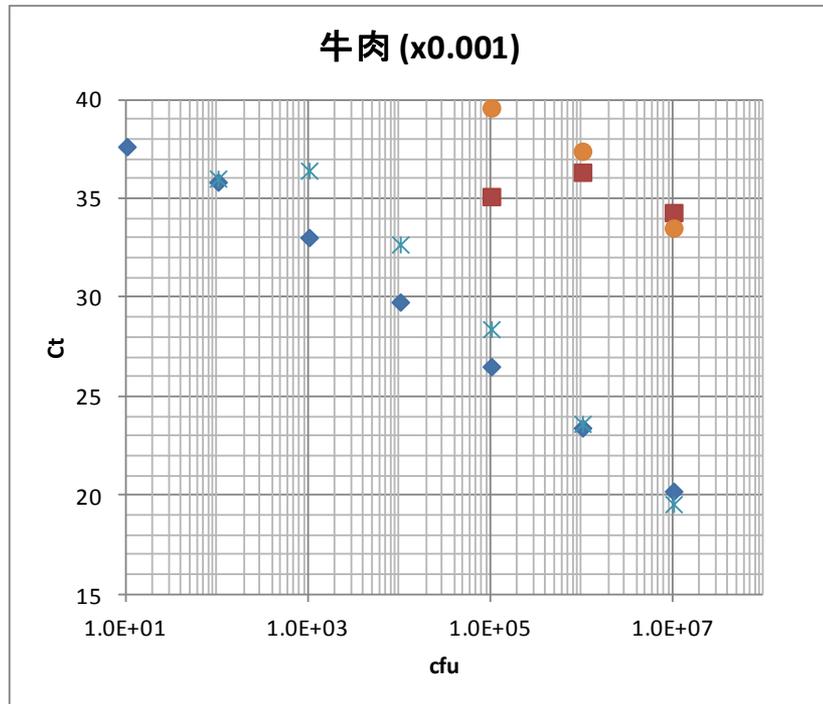


<各種食品への適合性を確認>

Control: 生理食塩水
Test: 各種食品懸濁液
※大腸菌(死菌)を使用

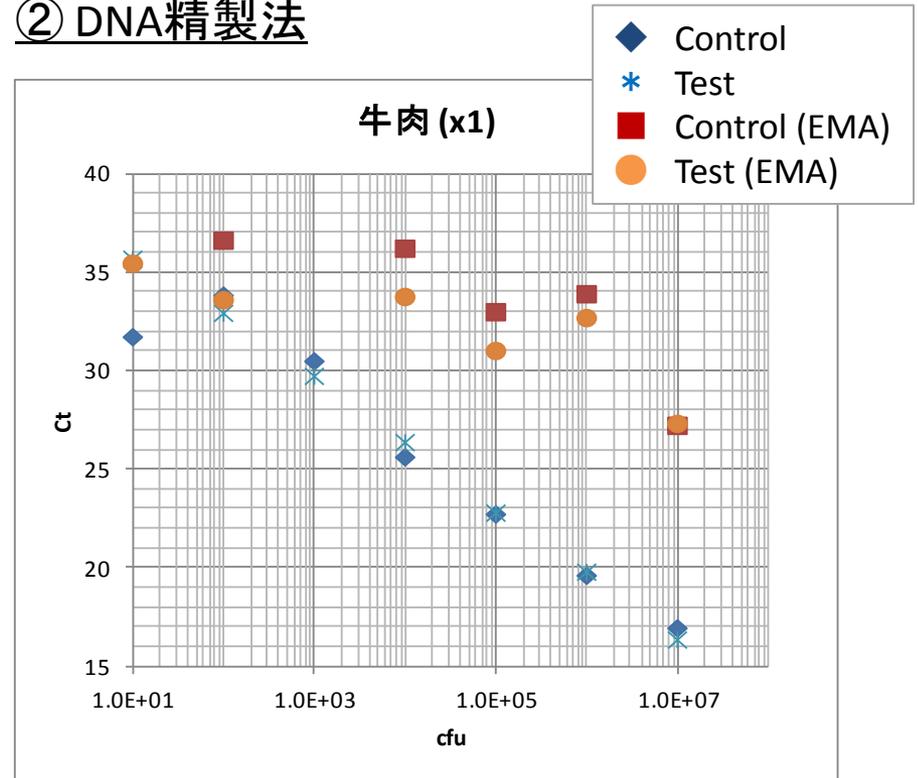
牛肉からの生菌検出法

① 希釈法



- 1/1000希釈するとほぼ良好に検出できた。
- 希釈法は、1/1000希釈により適用可能。

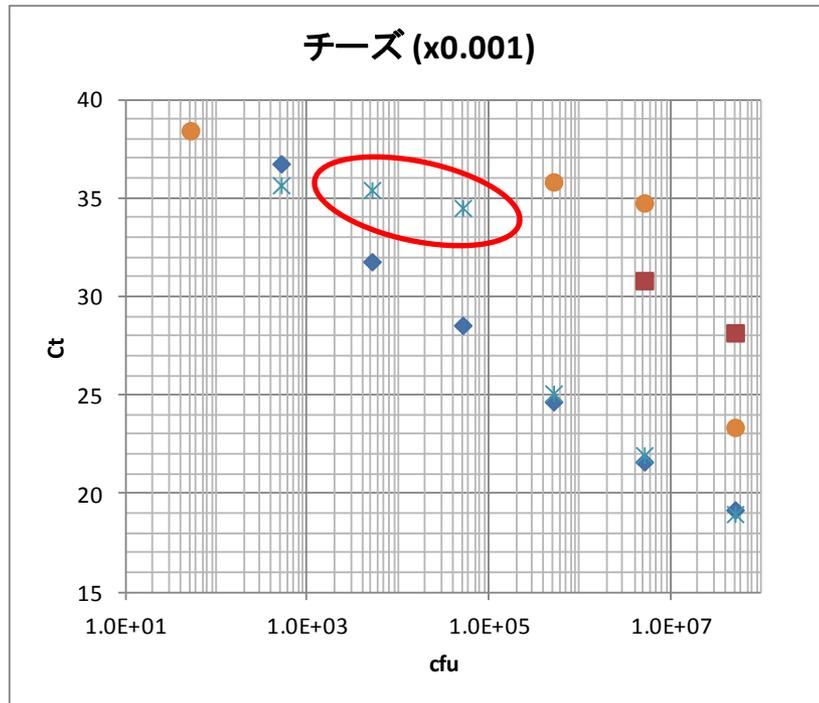
② DNA精製法



- 牛肉懸濁液によるEMA処理に対する影響は認められなかった。
- DNA精製法は、適用可能。

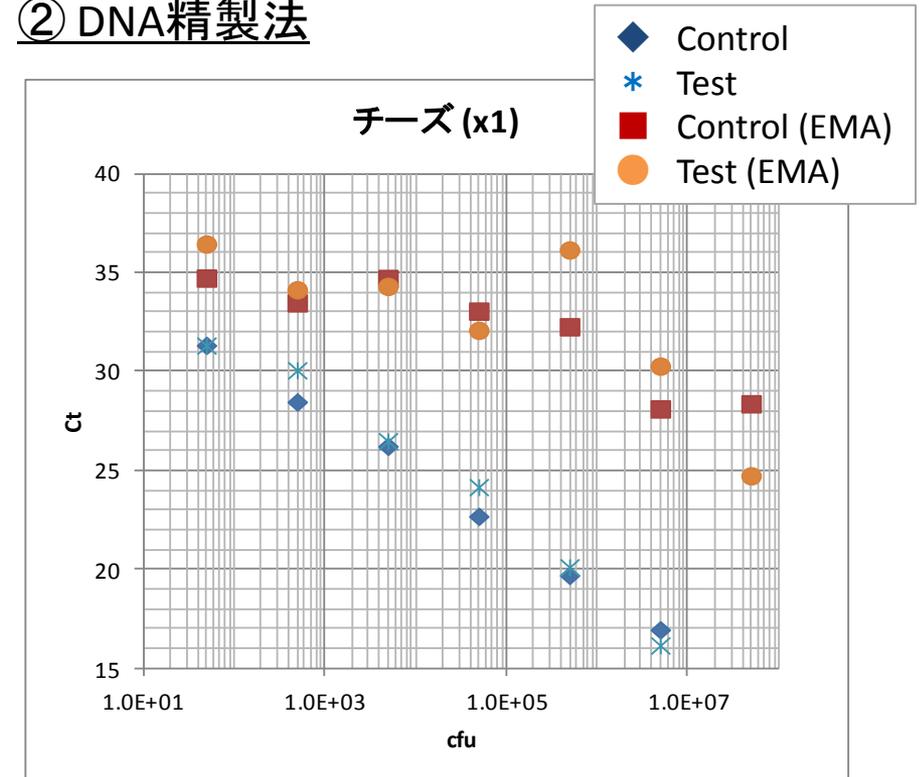
チーズからの生菌検出法

① 希釈法



- チーズは、PCR阻害作用が強いため、1/1000希釈しても検出の乱れが生じた。
- 希釈法は、適用できない。

② DNA精製法



- チーズ懸濁液によるEMA処理に対する影響は認められなかった。
- DNA精製法は、適用可能。

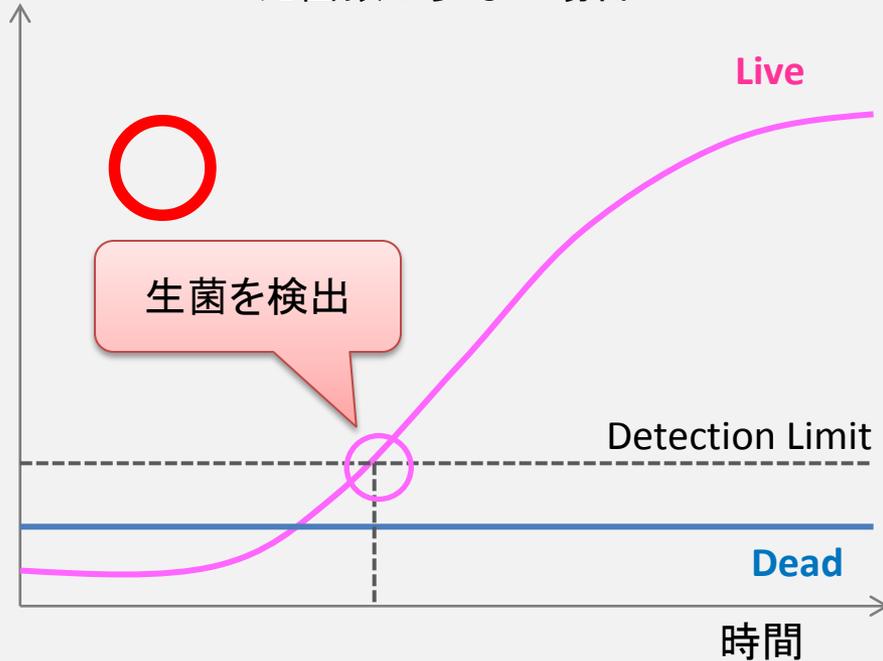
各種食材からの生菌検出法のまとめ

食品	① 希釈法	② DNA精製法
牛肉	1000倍以上に希釈	OK
鶏肉	100倍以上に希釈	OK
卵	100倍以上に希釈	OK
カイワレ大根	1000倍以上に希釈	OK
チーズ	不可	OK

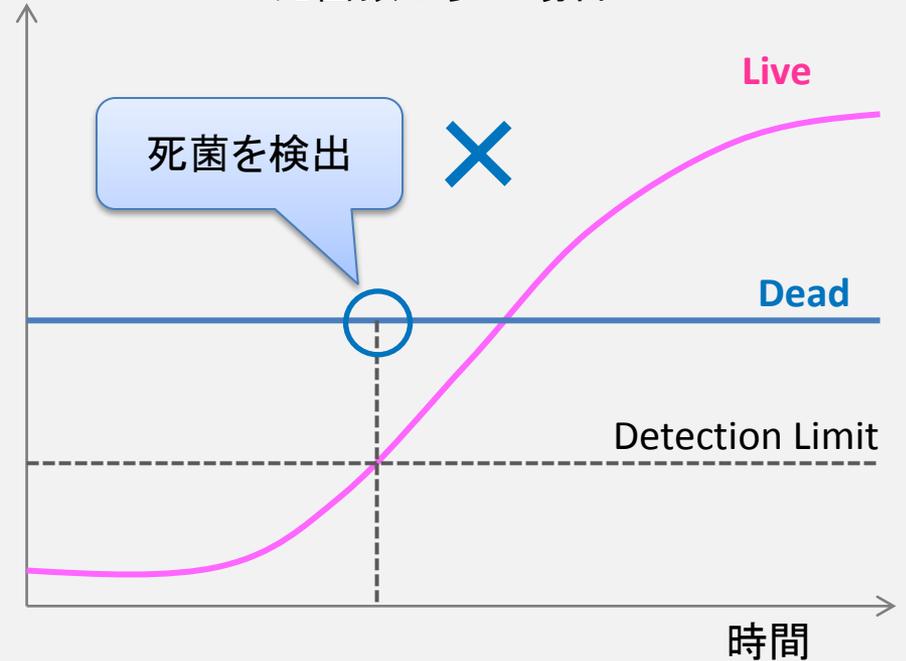
※食品を懸濁する培地の種類によっても適用の可否は異なる。

増菌培養 & qPCR法による生菌検出

＜死菌数が少ない場合＞



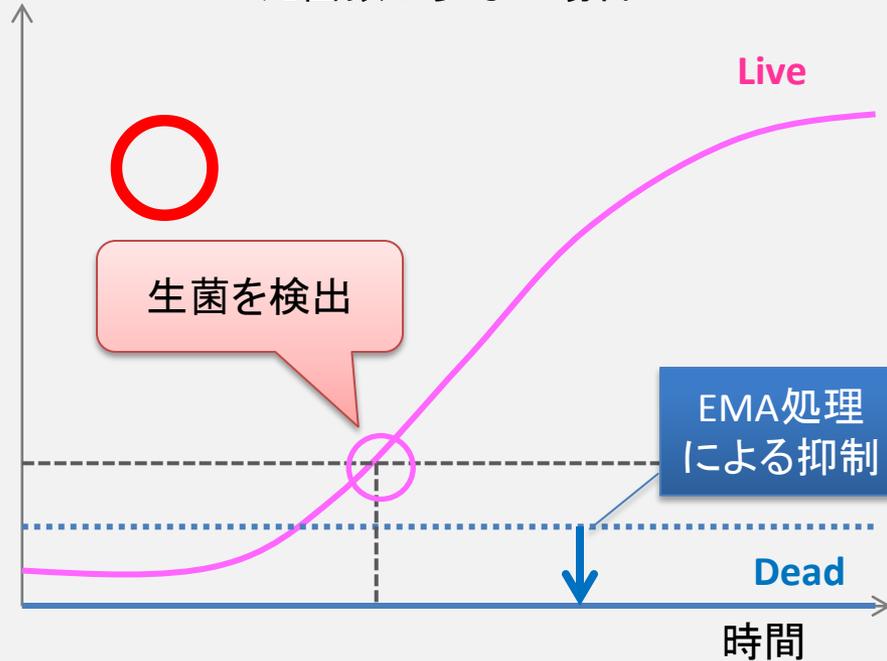
＜死菌数が多い場合＞



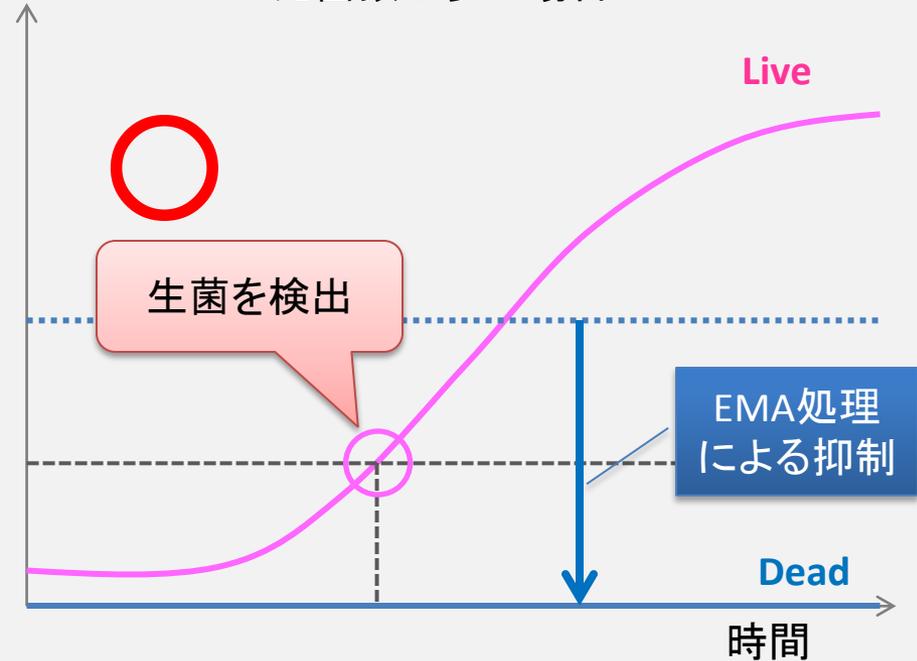
- 多数の死菌が混在する場合、生菌の増殖を検出できない可能性がある。

増菌培養 & EMA-qPCR法による生菌検出

＜死菌数が少ない場合＞

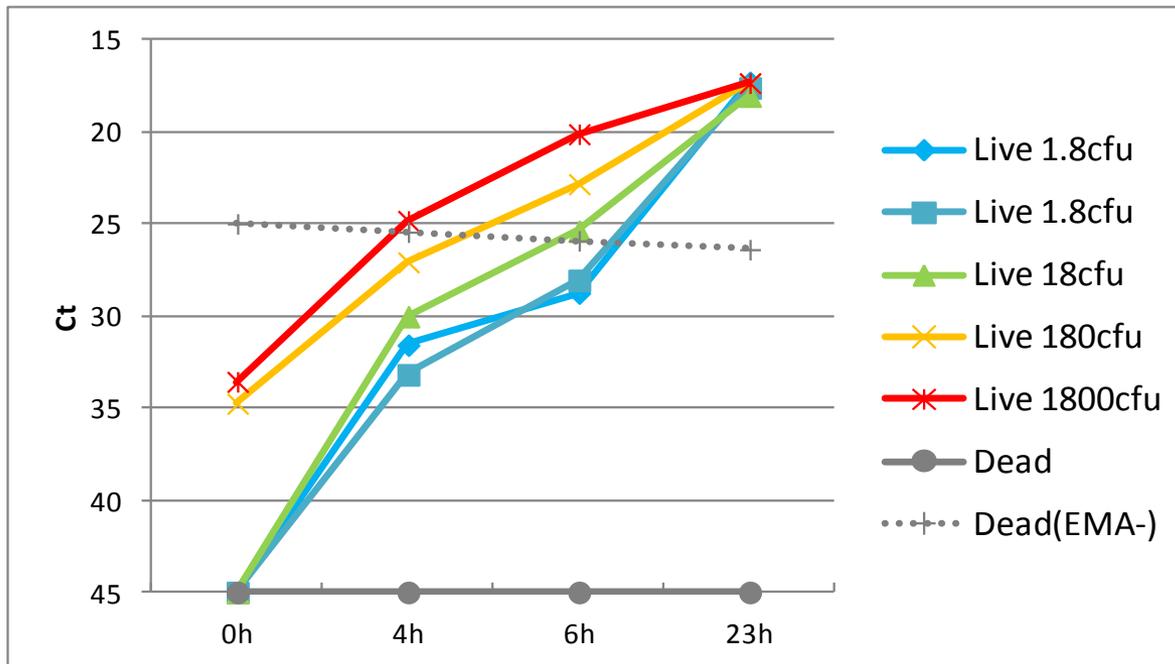


＜死菌数が多い場合＞



- EMA処理を組み合わせることにより、多数の死菌が混在する場合にも、**死菌の影響を排除して、より短時間で確実な生菌検出**が可能になると期待される。

増菌培養 & EMA-qPCR法による サルモネラ生菌の迅速検出



- 1.8～18 cfu/mlの生菌は、4 hから検出できた。
- 180～1800 cfu/mlの生菌は、0 hから検出できた。
- EMA処理により、 1.8×10^6 cfu/mlの死菌の影響を排除し、生菌を特異的に検出できた。

※ 23 h培養液からは、希釈法でも検出可能だった。

【方法】

食材懸濁液

- ✓ 10%卵黄懸濁液 4ml

サルモネラ接種菌数

- ✓ 生菌 $1.8 \times 10^0 \sim 10^3$ cfu/ml
- ✓ 死菌 1.8×10^6 cfu/ml

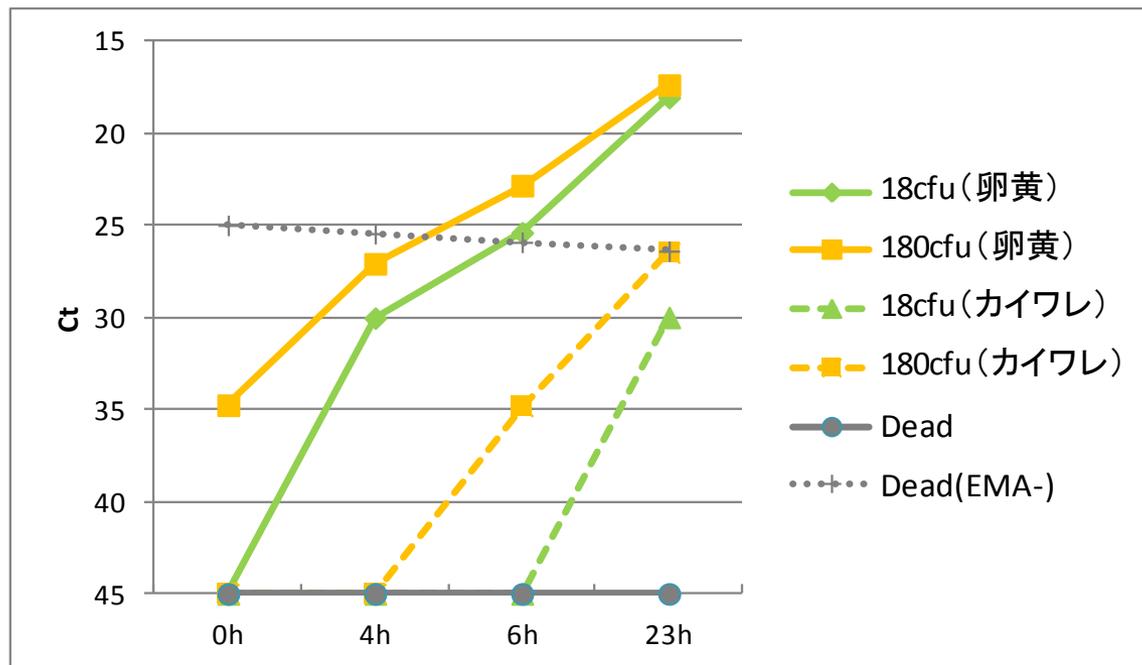
増菌培養

- ✓ 37°C、23h

EMA-qPCR (DNA精製法)

- ✓ 増菌培養液200μlをpellet downし、40μlの生理食塩水に再懸濁。
- ✓ EMA処理: Viable *Salmonella* Selection Kit for PCR使用
- ✓ DNA精製: NucleoSpin Tissue XS使用
- ✓ qPCR: CycleavePCR *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0使用

食材による増菌率の比較



- カイワレ大根懸濁液では卵黄より増菌率が低かった。
 - 高感度なDNA精製法が適する。
 - 一晩培養した場合でもEMA処理を行う必要がある。
(混在する死菌の影響を排除するため。)

【方法】

食材懸濁液

- ✓ 10%卵黄懸濁液 4ml
- ✓ 10%カイワレ大根懸濁液 4ml

サルモネラ接種菌数

- ✓ 生菌18, 180 cfu/ml

増菌培養

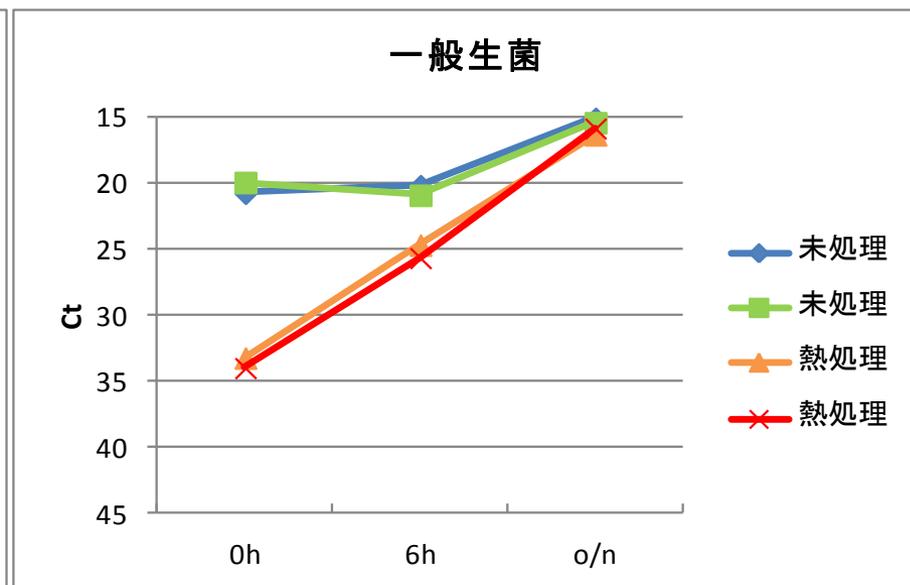
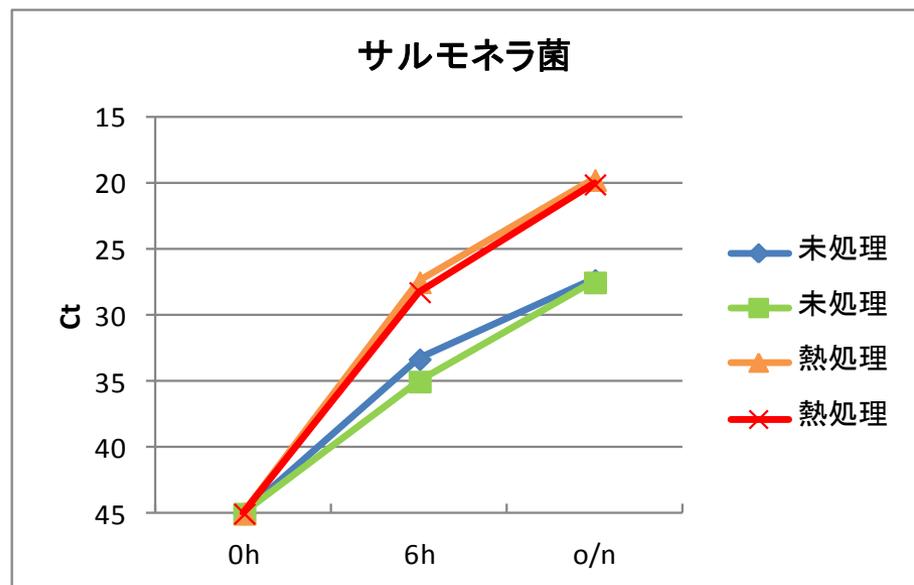
- ✓ 37°C、23h

EMA-qPCR (DNA精製法)

- ✓ 増菌培養液200μlをpellet downし、40μlの生理食塩水に再懸濁。
- ✓ EMA処理: Viable *Salmonella* Selection Kit for PCR使用
- ✓ DNA精製: NucleoSpin Tissue XS使用
- ✓ qPCR: CycleavePCR *Salmonella* Detection Kit Ver.2.0使用

(参考) 雑菌との競合による増菌率の低下

- ◆ カイワレ大根の懸濁液で増菌率が低いのは共存する雑菌との競合が原因との仮説を立て、95℃、5分の熱処理を行ったカイワレ大根懸濁液を用いた確認実験を行った。



- 未処理に比べ、熱処理を行った場合の方が、増菌率が高くなった。
- 熱処理により雑菌が減少し、増菌率が向上したと推測される。
- EMA-qPCR法により一般生菌数を測定した結果、熱処理により生菌数が減少していることが示唆された。(なお、測定された菌数には、接種したサルモネラ菌も含まれる。)

まとめ

- **各種食材からの生菌検出法**
 - 希釈法は、多くの食材に適用可能だが、チーズはPCR阻害作用が強く不適合であった。
 - DNA精製法は、検討したすべての食材に適用可能であった。
- **短時間の増菌培養との組合せによる迅速検出**
 - 死菌が混在している場合にも、EMA処理により死菌の影響を排除し、少数の生菌を迅速に検出できた。
 - 雑菌等の影響で対象菌種の増菌率が低い場合、一晚培養しても菌数が少ない可能性があるため、EMA処理が有効と考えられた。