

*Photobacterium damsela* 様々な海産魚の病原体(ブリの類結節症原因菌は *ssp. piscicida*)

区分	手法名 (文献)	プライマー		反応温度条件	増幅産物 bp	備考	推奨度
		名称	配列 (5'-3')				
PCR	(Osorio et al., 2000)	Car 1	GCTTGAAGAGATTTCGAGT	95°C4分→(95°C60秒、60°C60秒、72°C40秒)x30 サイクル→72°C5分	267	<i>ssp. damsela</i> と <i>piscicida</i> を区別せず検出する。使用酵素はTaq polymerase (Perkin Elmer), プライマー終濃度は1.6 μM, 増幅領域16S rDNA。アニーリング温度を65°Cにすることで特異性が増す (Osorio et al., 1999)。	—
		Car 2	CACCTCGCGGTCTTGCTG				
	(Osorio et al., 2000)	76a	CCGACTCAACTACAGATCACCCAGTC	95°C10分→(95°C30秒、67°C30秒、72°C60秒)x50 サイクル→72°C10分	297	原報ではこの2セットのプライマーはMultiplex PCRとして使用している。使用酵素はHot-Rescue DNA polymerase (Diatheva), プライマー終濃度は0.08 μM (76a, 76b)と1 μM(Ure5, Ure3), 増幅領域はそれぞれ Pbp1Aおよび urease gene.。	—
		76b	GTGCGGCCTAAATTTTCGACGA				
	(Osorio et al., 2001)	Ure 5	TCCGGAATAGGTAAAGCGGG	95°C10分→(95°C30秒、67°C30秒、72°C60秒)x50 サイクル→72°C11分	448	76a/76b は <i>ssp. piscicida</i> と <i>damsela</i> の両方を検出。Ure5/Ure3 は <i>ssp. damsela</i> のみを検出。	—
		Ure 3	CTTGAATATCCATCTCATCTGC				
リアルタイムPCR	(Carraro et al., 2017)	Ph_Pisc.A F	TGCTGGTGGTGTATTCTGGG	50°C2分→95°C2分→(95°C10秒、60°C60秒)x45 サイクル	130	<i>ssp. damsela</i> と <i>piscicida</i> を区別せず検出する。使用酵素はPlatinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, California)。bamB 遺伝子を増幅。	—
		Ph_Pisc.A R	GTCAACTAGACGATCAATTTTCAGTT				
	(Carraro et al., 2017)	Ph_Pisc.B F	TGCTGGTGGTGTATTCTGGG	50°C2分→95°C2分→(95°C10秒、60°C60秒)x45 サイクル	148	<i>ssp. damsela</i> と <i>piscicida</i> を区別せず検出する。使用酵素はPlatinumSYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, California)。bamB 遺伝子を増幅。融解温度の違いで両亜種を区別できる。	—
		Ph_Pisc.B R	AACAGGTGTCGCATCAACGT				

文献

Carraro, R., et al (2017): Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish tissues. J. Fish Diseases DOI: 10.1111/jfd.12703

Osorio, C. R., et al (1999): 16s rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. Appl Environ Microbiol, 65, 2942-2946.

Osorio, C., Toranzo, A., Romalde, J., & Barja, J. (2000). Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. Diseases of Aquatic Organisms, 40, 177-183.