

II-493

DNAプローブを用いた特定微生物の検出方法に関する基礎的研究

東北学院大学 学生員○小関多賀美

同 正 員 遠藤銀朗

同 正 員 長谷川信夫

1. はじめに

環境浄化を目的とする各種生物学的処理プロセスにおける微生物の存在状態を知るための研究は、処理の効率や特性を把握しより合理的なプロセス開発を行なうために重要と考えられる。また水域生態系や土壌生態系などにおける物質循環や自浄作用を調査するうえでも、特定の機能を有する微生物の環境における動態を把握することは重要である。微生物の特定の機能はその微生物の遺伝子型によることが知られており、個々の微生物の特定の遺伝子の存在状態を知ることによって、プロセス内や生態系内での機能を推定することが可能と考えられる。また特定の微生物の存在量や動態を知るためにも、その微生物が持つ特定のDNAを特異的に測定することが役立つと考えられる。

本研究では対象とする微生物に特有の塩基配列を持つDNAを、DNA-DNAハイブリダイゼーション法の一方法であるコロニーハイブリダイゼーション法によって測定するための基礎的な検討をおこなった。

2. 実験材料および方法

2. 1 実験材料

(大腸菌) *E. coli* HB101, *E. coli* MV1184 (*E. coli* MV1184 と pIMA2は東大農芸化学矢野圭司研究室より(プラスミド) pBK322, pBK9, pIMA2 室より分譲いただいた。)

(DNAプローブ作成用試薬類) DNA Chemiprobe キット (Orgenics社製)

(ハイブリダイゼーション用試薬類) Denhardt溶液, S S C溶液, プリハイブリダイゼーション溶液, ハイブリダイゼーション溶液, ブロッキング溶液など

(発色試薬類) DNA Chemiprobeキット中の酵素標識抗体(2種)および同キット中の発色基質(2種)

(培地) Lプロス寒天平板(抗生物質を含むものと含まないものを用意)

(コロニープロットング用フィルター) Schleicher & Schuell社製BA85メンブランフィルター

2. 2 実験方法

(DNAプローブによる核酸の検出原理とDNAプローブの作成方法)

DNA Chemiprobe 法ではプローブとして用いるDNAのシトシンにスルホン基を結合させ、このスルホン化DNAに対して作成されたモノクロナール抗体を特異的に結合させる。次にアルカリフォスファターゼによって酵素標識された第二抗体を上記モノクロナール抗体を抗原として結合させる。この方法による検出では、ニトロセルロースメンブランフィルター上に固定した検出対象DNAとハイブリダイズした標識抗体化DNAプローブにアルカリフォスファターゼによって発色反応を生ずる基質を加えることによって発色させて行なう。DNAプローブを作成するには、プローブとなるDNAを熱変性させた後修飾反応液を用いてスルホン基をこのDNAに結合させる。

(コロニーハイブリダイゼーションの準備操作)

ペトリ皿中で寒天培地上に微生物コロニーを形成させた後、このコロニーをニトロセルロースメンブランフィルターにトランスファーさせて強アルカリ液で溶菌させるとともに溶出したDNAをアルカリ変性させる。その後中和液で中和しリゾチーム処理、プロテナーゼ処理などをおこない、80℃でベーキングしてDNAをメンブランフィルター上に固定する。

(ハイブリダイゼーション操作, 洗浄および発色検出)

上記メンブランフィルター, バックグラウンドを消去するためのキャリアDNA, ハイブリダイゼーション溶

液をヒートシールして作成したポリエチレンバックの中に入れ68℃で2～4時間反応させてブリハイブリダイゼーションを行なわせる。次にDNAプローブを含むハイブリダイゼーション溶液を入れ再度68℃で一夜反応させ、DNAプローブと微生物DNAとのハイブリダイゼーションを行なわせる。二倍濃度SSC-0.1%SDS溶液および1/10濃度SSC-0.1%SDS溶液で順次ハイブリダイゼーションの終わったメンブランフィルターを洗浄した後発色検出操作に入る。発色検出にはバックグランドを消すためのブロッキング溶液でメンブランフィルターを処理した後、検出原理で示した酵素標識抗体および発色基質を加え微生物DNAにハイブリダイズしたDNAプローブを発色させて検出する。

3. 実験結果

写真1にプラスミドpBK9を有する大腸菌のコロニーを示した。写真2には写真1のコロニーをメンブランフィルターにトランスファーさせた後に各種処理をおこなってDNAを固定させ、プラスミドpBR322と相補する16merのオリゴヌクレオチドをDNAプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションし発色させた結果を示した。pBK9はプラスミドpUC4Kから制限酵素EcoRIで切り出したカナマイシン耐性遺伝子を、プラスミドpBR322の同じEcoRI切断サイトに挿入して作成したプラスミドであり、pBR322とハイブリダイズするDNAプローブはEcoRI切断サイト以外の塩基配列を有する限pBK9ともハイブリダイズする。得られた結果は、写真1に示された殆ど全てのコロニーがDNAプローブとハイブリダイズし発色しており、殆どの微生物(*E. coli* HB101)がpBK9を有することを示している。

一方プラスミドpIMA2を有する大腸菌(寒天平板培のコロニーを写真3に示した)を用いて、pIMA2の塩基配列とは一塩基だけ異なる20merの塩基よりなるDNAプローブによってコロニーハイブリダイゼーションを行なった場合には、写真4に示したように全く発色反応を示さなかったことからこのDNAプローブのハイブリダイゼーション特異性は極めてよく、十分な選択性をもって特定の微生物の識別定量に利用できることが知られた。また、対象実験として行なった完全に一致する相補塩基鎖のDNAプローブを用いた場合には、pIMA2を持つ殆どの大腸菌のコロニーが発色反応を示し検出可能であった。

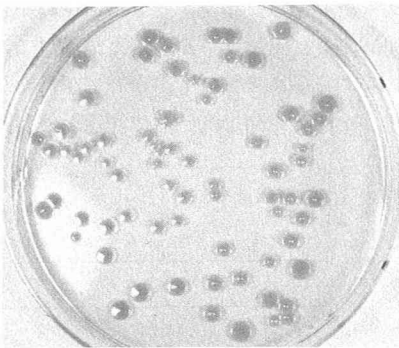


写真1 大腸菌HB101/pBK9のコロニー

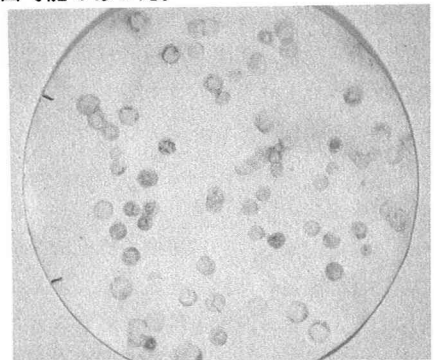


写真2 コロニーハイブリダイゼーションの結果

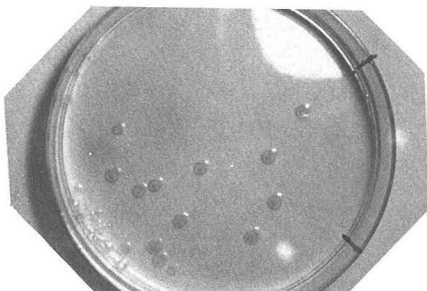


写真3 大腸菌MV1184/pIMA2のコロニー

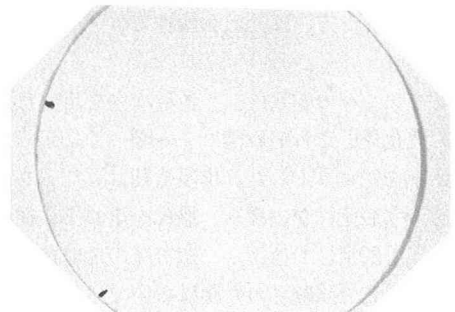


写真4 コロニーハイブリダイゼーションの結果