

II-146

活性汚泥中の芳香族化合物分解菌検出への DNA-DNAコロニーハイブリダイゼーション法の適用 (第2報) -検出感度の検討-

大阪大学工学部 (正員) 池 道彦, (正員) 藤田 正憲, (学生員) 森 一博

1. はじめに

前報では、カテコール分解遺伝子を含むDNA断片をテンプレートとして作成したpheBプローブが高い特異性を持ち、特定の分解菌および分解遺伝子を導入した組換え体の検出に有効であることが示された。DNAプローブ法による検出では、特異性の問題に加えて、検出感度がいかに高いかが重要な問題である。特に、活性汚泥のような多様な細菌を含む試料中から目的菌を検出する場合には、プローブ自身の感度とともに、バックグラウンドとなる細菌の妨害などについても検討し、簡便な操作で高感度の検出が行える至適方法を確立しておく必要がある。ここでは、コロニーハイブリダイゼーション法による検出の感度に影響を及ぼす各種要因について検討し、本法の実用性について考察した。

2. 実験材料および方法

○DNAプローブ、プロットング、ハイブリダイゼーション、および検出: DNAプローブには前報で作成したpheBプローブを用いた。プロットング、ハイブリダイゼーション、および検出は前報の方法に一部修正を加えて行った。

○使用菌株および活性汚泥: 検出の対象として染色体上にpheB遺伝子を持つ *P. putida* BH株を、また検出感度の評価に *E. coli* C600 (pBH100) 株および *E. coli* C600 (pBH500) 株を使用した。バックグラウンドの影響の評価に用いた活性汚泥は、肉エキスとペプトンを主成分とする合成下水にFill and Draw方式で長期間馴養されていたものを用いた。

○培地: 菌株の培養にはCGY培地(カシトン5g, グリセリン5g, 酵母エキス1g/ℓ)を使用した。組換え体の培養には適宜抗生物質を添加した。また、活性汚泥および菌株のプレーティングには、2%の濃度で寒天を加えて固化した平板培地を用いた。

3. 実験成績および考察

(1) プローブの検出感度: まず、フィルターにプロットする菌体量を変化させることによって、プローブ自身の検出限界を評価した。*P. putida* BH株、および組換え体 *E. coli* C600 (pBH100) 株、*E. coli* C600 (pBH500) 株の培養液を段階希釈(OD_{600} を3, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01の各濃度に調整)し、その50 μ ℓをフィルターに吸着させてハイブリダイゼーションを行った結果を写真-1に示した。

BH株では希釈培養液の OD_{600} が0.05以上で、組換え体では0.01以上で呈色反応が認められた。これは、別途行った生菌数測定の結果から、BH株で 5×10^6 個、組換え体で 1×10^5 個以上の細胞が、スポットとしてフィルター上に固定されれば、pheB遺伝子保持株の検出が可能であることを示している。即ち、本プローブは、極微小なコロニーがフィルターに付着すれば検出が可能な、高い感度を持つことが示された。

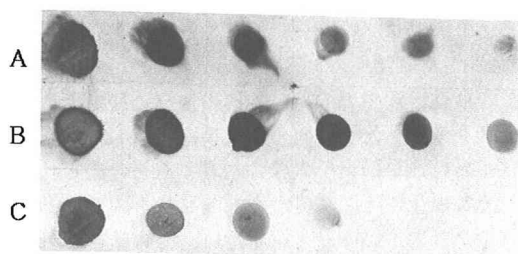


写真-1 プローブの検出感度の検討

A: *E. coli* C600 (pBH100), B: *E. coli* C600 (pBH500)
C: *P. putida* BH 各々50 μ ℓをプロットしたもの。
左から OD_{600} = 3, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01

(2) 平板上のコロニー数および大きさの影響: 前報では菌株をフィルター上にレプリカし、培養したコロニーに対して検出を行った。しかし、本法を活性汚泥中での目的菌検出に適用するには、コロニーを平板から直接フィルターに転写する方が実用的である。この場合、平板上に形成される目的菌のコロニーの数および大きさが検出に影響を及ぼすものと考えられる。そこで、1枚の平板上のBH株のコロニーの数および大きさを変化させ、平板にフィルターを押し付けて転写したものについてハイブリダイゼーションを行った。ここで、コロニーの大きさは、培地の栄養濃度を変えることにより変化させた(例えば10倍に希釈したCGY培地およびCGY培地を用いることで、それぞれ直径2mmおよび5mmのコロニーを得た)。この結果、その大きさに関わらず、全てのBH株コロニーから呈色反応が示されたが、コロニーが小さいほど明確な呈色が認められ、検出感度が高くなることが示唆された。一方、平板上のコロニー数が50個以上となると、各コロニーによる呈色のスポットが接近しすぎて、相互を明確に区別できないため、計数が不正確になる傾向が認められた。

(3) 活性汚泥細菌をバックグラウンドとした検出: 活性汚泥中で他の細菌と混在するBH株を検出する際、バックグラウンドとなる菌による妨害の影響を評価し、実際の検出限界を決定しておく必要がある。ここでは、活性汚泥のフロックを超音波処理によって破砕した試料と、BH株の培養液を混合してプレーティングし、25℃で約1週間培養して得られた平板上のコロニーをフィルターに転写したものについて、ハイブリダイゼーションを行った。まず、CGY培地に、BH株および活性汚泥細菌のコロニーがそれぞれ、約10個および 10^4 個形成された平板に対して検出を試みた。この場合、プレーティング時にフィルター上に多量のデブリス(溶菌によって生じた残留物)が付着し表面を覆ったため、プローブが目的DNAとうまく結合せず、呈色反応はスポットとして検出されなかった。また、呈色した物質が一部デブリスに結合し、バックグラウンドが高くなった(写真-2(左))。そこで、BH株の検出感度を上げ、またバックグラウンド菌によって生じるデブリスの量を減らすために、10倍希釈したCGY培地にて同様の検出を行った。また、できる限りデブリスを除去するために、プレハイブリダイゼーションを2回行い、ペーパータオルでフィルター表面を拭く修正を加えた。この結果を写真-2(右)に示した。写真から明らかに、BH株のコロニーは明確なスポットとして検出された。従って、培地の栄養濃度を下げるとは、BH株のコロニーを小さくし、その検出感度を上げるためだけでなく、バックグラウンド菌による妨害を低下させるためにも有効であることが示された。さらに 10^5 個のバックグラウンドコロニーに対してBH株の検出を試みたが、この場合にはバックグラウンドの呈色が強くなる傾向が認められ、十分な検出は行えなかった。従って、活性汚泥細菌をバックグラウンドとした検出は、平板上のBH株のコロニー数が50個以下、活性汚泥細菌のコロニー数が 10^4 個以下では可能であるが、それ以上の場合にはさらに改良を加える必要があると考えられる。

写真-2 活性汚泥細菌をバックグラウンドとした検出

左: CGY 培地での検出
右: 1/10CGY 培地での検出

