

II-575

水中のRNAファージのポリメラーゼチェインリアクション（PCR）法による検出

東大 工 都市 学生員 片山浩之

正員 神子直之

正員 大垣眞一郎

1 序

PCR法は既知の任意のDNA断片を *in vitro*（試験管内）で増幅する技法であり、生物の遺伝子を調べる際に酵素レベルもしくは化学レベルまで掘り下げて追求できるという点で興味深い。したがって今までより精密な議論を進められる可能性を秘めている。

現在の水質管理システムにおいては、微生物的安全性の管理指標は大腸菌群等の指標細菌に頼っている。いま、将来の水利用の多様化（再利用など）を考えれば、水質管理システムの高度化も望まれる。その一環としての「ウイルス的安全性」の確保が求められている。

水中ウイルスを評価するにあたり、病原性ウイルスをすべて測ることが理想だが、それは不可能に近い。そこで大腸菌ファージを指標とし、それを測定することによってウイルス的安全性を確保しようと試みている。

1985年に開発されたPCR法は簡便性を備え、今や広範な分野で応用されるに至っている。本研究ではこの技法をRNA大腸菌ファージQβの検出に適用することを試みた。

2 実験方法

供試したQβ高濃度液は、Lysate broth[1% poly pepton, 0.5% yeast extract, 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005% MnSO_4 , 0.15% glucose, 0.5% NaCl, all w/v]で大腸菌とQβを培養し0.45μmのフィルターで濾過したものを用いた。また、それを分子重量200万のUFでTM buffer[50mM Tris-HCl pH7.5, 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w/v]によって洗浄濃縮したものも用いた。ブラック法は、E. coli K12 F⁺(A/λ)を用いた二層平板培養法に従った大垣ら（1989）。PCR法は、Danteravanichら（1992）の方法（RT-PCR法）を採用した。その概略を表-1に示す。用いたプライマーの配列は、antisense 5'-ATTACAATTAGGCGCCAT-3', sense 5'-CCATCGATCAGCTTATCTGT-3'である。

ブラック法で濃度を求めた試料の希釈列にPCRを適用して検出限界を求め、PFU/tube（供試量3μl）で評価した。

図-1 電気泳動パターン

1 9 4 b p



DNAマーカー φ174 RF DNA-Hae III Digest
 0回希釈 (positive control)
 1回希釈
 2回希釈
 3回希釈
 4回希釈
 negative control

3 結果および考察

ブラック法で求めたLysate broth中のQ β 濃度は 1.6×10^{10} PFU/mlであった。PCR法による検出限界は、RT PCR標準法の場合0回希釈であった。次に、RT PCR法の条件の最適化をはかり、少しずつ条件を変えて実験した。

その結果を表-2に示す。RT PCR法において、TM bufferを用いた場合Q β は 10^4 PFUまで検出され、Lysate broth中のQ β よりも3桁ほどよくなった。RT緩衝液のMgSO₄濃度を10倍にしてQ β を検出することを試みたが、Q β は検出されなかった。Taq Polymeraseの量を2倍（1U/tube）にしたRT PCR法においては、Lysate broth中のQ β は 10^4 PFUまでよくなり、Taq Polymeraseの量を1U/tube、サイクル数を2倍の50回にしたRT PCR法においてはLysate broth中のQ β は 10^3 PFUまでは少なくとも検出された。その泳動パターンを図-1に示す。

4 おわりに

RT PCR法は、さまざまなステップの中でどの因子が効いてくるか未解明の部分があり、Q β の検出限界をよくするためには多角的なアプローチが必要である。現段階ではPCRを自然水中の調査には使えないが、今後の研究では検出限界を向上させることは可能である。

参考文献 大垣眞一郎、Awrapin Ketratanakul、橋本光雄 1989 浄化槽研究 vol.1, No1, pp19-24
S.Danteravanich, G.Endo, S.Ohgaki 1992 第28回衛生工学研究討論会講演集 pp83-85

表-1 PCR法によるQ β の検出方法
「実験のながれ」

Q β
| Q β 核酸（RNA）の抽出
↓ 直接加熱によるタンパク質の破壊
はだかのRNA
| Q β RNAの逆転写
↓ 逆転写酵素反応
cDNA
| DNAの増幅
| ポリメラーゼチェインリアクション
↓ （PCR）
amplified DNA
| DNAの集積
↓ 電気泳動法
specified DNA
| DNAの検出
| エチジウムブロマイド（Ethidium
↓ Bromide）による染色、紫外線照射
可視光
写真撮影

表-2 PCRの結果 （○は検出、×は非検出）

PFU/tube のオーダー	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
lysate broth	×	×	×	×	○
TM buffer	×	○	○	○	—
2倍 Taq(1u) lysate broth	×	○	○	○	○
2倍 Taq(1u) 2倍サイクル数 lysate broth	○	○	○	○	○