

II-548

従属栄養性硝化細菌の種特異的プライマーを用いたPCR法による16SrRNAの検出

日本大学大学院 学生員○成田 勝
日本大学工学部 正 員 中村玄正
日本大学工学部 正 員 松本順一郎

1. はじめに

高度処理としての窒素除去は硝化過程が律速となることが多い。窒素除去に関与する硝化細菌は、そのほとんどが独立栄養型の細菌であり、増殖速度が遅く菌の検出、同定、および菌数測定には4週間程度を要している。本研究においては遺伝子工学的手法を導入することによって即時的に処理に関与する有用細菌の同定や菌数測定方法を開発しようとするものである。すなわち、種特異的プライマーを用いて、PCR法(polymerase chain reaction法)により比較的増殖速度の早い従属栄養型の硝化細菌であるArthrobacter globiformisを検出し、種特異的プライマーを判定することを目的としている。

2. 実験方法

(1) 供試菌株

- Arthrobacter globiformis IF03062株
- Escherichia coli HB101株

(2) 菌の培養

Arthrobacter globiformisは液体培地20mlを50ml三角フラスコに分注し、白金耳による植菌後、30℃で一晩振とう培養を行った。

Escherichia coliは1xLB液体培地20mlを50ml三角フラスコに分注し、白金耳による植菌後、37℃で一晩振とう培養を行った。

(3) 染色体の調製

培養後それぞれの培養液から1mlずつ1.5ml容量のマイクロチューブに分注し、それぞれの染色体DNAの調製を行った。

(4) PCR増幅

染色体DNAは調製後、PCR法で増幅させた。PCR増幅は両プライマーともユニバーサルプライマー(520Fと1400R)を使用した場合と片方のみ特異的プライマー(特異的Fとユニバーサル1400R)で使用した場合についてそれぞれ行った。今回使用した特異的プライマーは、塩基数が20merの長さでそのGC含量は35%、プライマーのアニリング温度(Tm)は54℃である。PCR反応条件は変性温度94℃1min→アニリング温度65℃2min→伸長温度72℃2minを1サイクルとし25サイクルで行った。PCR増幅後のアガロースゲル電気泳動の結果から種特異的プライマーによるArthrobacter globiformisの検出を確認し、種特異的プライマーを判定する。

3. 実験結果と考察

(1) ユニバーサルプライマー使用によるPCR増幅結果

写真-1に両プライマーともユニバーサルプライマーを使用した場合のPCR増幅後の結果を示す。両細菌ともバンドが確認され、PCRによる増幅が行われたことが確認できた。

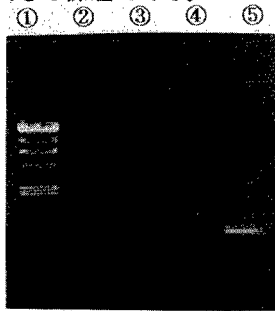
(2) 特異的プライマー使用によるPCR増幅結果

写真-2に片方をユニバーサルプライマー、もう片方を特異的プライマーで使用した場合のPCR増幅後の結果を示す。特異的プライマーを使用したためArthrobacter globiformisのみバンドが確認されるはずであるが電気泳動結果からは検証されなかった。検出されなかった原因として実際に取り扱った菌とデータベースに登録されているArthrobacter globiformisと株がちがうためであると考えられた。

(3) 新たな特異的プライマー(A17プライマー)使用によるPCR増幅結果

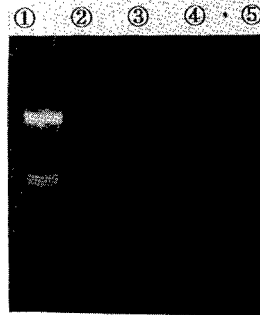
実際に使用したArthrobacter globiformisとE. coliとの塩基配列の比較から作成した新たな特異的プライマー(以下A17プライマー)を用いて再度実験を行った。このA17プライマーは塩基数が19merの長さでそのGC含量は53%、プライマーのアニリング温度(Tm)は58℃である。再実験の結果バンドが確認されたことから、続いてこのA17プライマーの種特異性を調べるため、対照の菌株としてEscherichia coli、Pseudomonas putida、Erwinia carotovoraからそれぞれの染色体の調製を行い、PCR増幅させ比較検討した。写真-3にPCR増幅後のアガロースゲル電気泳動結果を示す。今回のPCR増幅では、両方ユニバーサルプライマー(520Fと1400R)の場合と片方ユニバーサルプライマー、もう片方特異的プライマー(ユニバーサ

4520Fと特異的A1R)を使用した場合で行った。両方ユニバーサルプライマーを用いたものは全ての菌が増幅されバンドが確認された。片方を特異的プライマーで使用的場合はArthrobacter globiformisのみが増幅されバンドが確認されるはずであったが、Pseudomonas putidaも増幅された。よって新たに使用した特異的A1プライマーは、Escherichia coliとErwinia carotovoraは分離できることが確認できたものの、Arthrobacter globiformisの種特異的プライマーとはいえないことがわかった。今後、Arthrobacter globiformisの塩基配列を決定し、種特異的部分を見つけプライマーを作成することが大きな課題である。



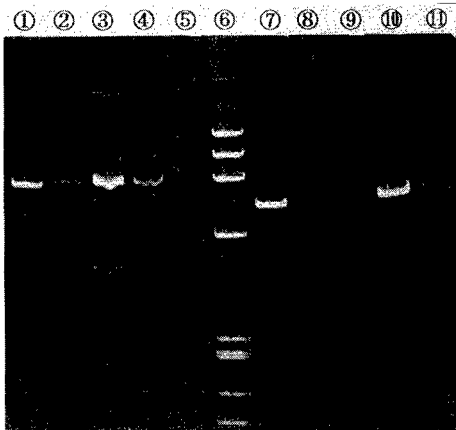
- ① λ phage DNA/Hind III
- ② ブランク
- ③ DNAなし(-)コントロール
- ④ A. globiformis IF03062株 520F-1400R
- ⑤ E. coli HB101株 520F-1400R

写真-1 ユニバーサルプライマーを使用した場合のPCR増幅結果



- ① λ phage DNA/Hind III
- ② ブランク
- ③ DNAなし(-)コントロール
- ④ A. globiformis IF03062株 特異的210F-1400R
- ⑤ E. coli HB101株 特異的210F-1400R

写真-2 Arthrobacter特異的プライマーを使用した場合のPCR増幅結果



- ① P. putida 1068株 520F-1400R
- ② E. coli HB101株 520F-1400R
- ③ E. carotovora 520F-1400R
- ④ A. globiformis IF03062株 520F-1400R
- ⑤ DNAなし(-)コントロール 520F-1400R
- ⑥ φ x 174/Hae III
- ⑦ P. putida 1068株 520F-特異的A1R
- ⑧ E. coli HB101株 520F-特異的A1R
- ⑨ E. carotovora 520F-特異的A1R
- ⑩ A. globiformis IF03062株 520F-特異的A1R
- ⑪ DNAなし(-)コントロール 520F-特異的A1R

写真-3 PCR増幅後のポリアクリルアミドゲル電気泳動結果

4. おわりに

特異的プライマーを用いてのArthrobacter globiformisのみの検出はできなかった。しかしながら、A1プライマーはEscherichia coliとErwinia carotovoraを分離できることがわかった。今後の課題としてはArthrobacter globiformisの塩基配列を決定し、種特異的部分を見つけプライマーを作成することである。本研究を進めるにあたり、東北学院大学工学部 石橋良信先生、遠藤銀朗先生、前澤工業(現在) 及川栄作氏に絶大なるご協力を得ている。また、本研究は一部「厚生省の厚生科学研究費補助金」を受けて実施した。ここに謝意を表する。

《参考文献》

- 1) 及川栄作、大沼孝宏、清水昭秀、石橋良信: (1994) 16SリボソームRNA塩基配列の比較によるかび臭産生藍藻類の分類、水道協会誌、63、PP56-63