

II-652

PCR法による微生物の定量的検出方法の検討と下水中の病原細菌検出への適用

東北学院大学大学院 学生員 ○木村 陽平
東北学院大学工学部 嶋崎 直人
東北学院大学工学部 正 員 遠藤 銀朗

1. はじめに

ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法)はDNA増幅効率が極めて大きいことによって環境中の微生物を高い感度で検出することを可能にすることが、これまでの研究によって明らかにされてきている。しかしこの方法は、単独では微生物細胞数を定量的に求めるのに利用することができない欠点を有している。発表者らはPCR法と最確数法(MPN法)を組み合わせたPCR-MPN法を採用することによって、試料中の細菌細胞数を定量的に検出する方法について検討を行なった。さらに、この方法を下水中の病原性細菌の検出に応用することについて、存在する可能性が示唆されている *Legionella pneumophila* (在郷軍人病病原菌)を対象として、その染色体DNAの抽出回収方法およびPCR法のためのプライマーDNAの設計等について検討を行なった。

2. 実験方法

1) 使用細菌: *Escherichia coli* HB 101 (PIMA 2), *Legionella pneumophila* ATCC 33153

2) 使用培地: 大腸菌の培養用 L 培地 (Tryptone $10.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, Yeast extract $5.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, Glucose $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, NaCl $5.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ をオートクレーブ滅菌後 Ampicillin $100 \mu \text{g/ml}$ を加えたもの)

*Legionella*の培養用 EPA-VC 培地 (proteosepepton No.3 $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, activated charcoal $0.15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, L-cysteine hydrochloride 40 mg/ml , ferric pyrophosphate 25 mg/ml , pH7.0 に調製後オートクレーブ滅菌し vancomycin $0.5 \mu \text{g/ml}$, cycloheximide $80 \mu \text{g/ml}$ を加えたもの)

3) DNA ポリメラーゼ: Promega 社製 Taq DNA Polymerase を用いた。

4) プライマー: PIMA 2 用プライマーとして lin A 遺伝子部分を増殖する Primer 1
NUMBER OF BASES: 20 BASE USED: A=7 T=6 G=4 C=3 5'>TTC GTC TGA CAG AAG
ATA TA<3' と Primer 2 NUMBER OF BASES: 20 BASES USED: A=8 T=4 G=5 C=3
5'>TAT GGA TGG AGA ACT CAA AC<3'

Legionella pneumophila 用として 16S rRNA 遺伝子部分を増殖する Primer 1
NUMBER OF BASES: 20 BASE USED: A=6 T=5 G=6 C=3 5'>ATG ATG CAG AGT GGA
CCA TT<3' と、Primer 2
NUMBER OF BASES: 20 BASE USED: A=5 T=7 G=5 C=3
5'>AAA TAG TTC GTG CAT GCG TT<3'

3. 実験方法

1) 細菌の培養方法 *E. coli* HB 101 (PIMA 2)においては試験官の L 培地 10ml に、あらかじめ実験に用いる菌体を純粋培養したものを -20°C グリセロールストックしておき、それを白金耳で植え一晚純粋培養を行なった。*Legionella pneumophila* においては *Legionella* 用 EPA-VC 平板培地に菌体を塗抹し、7日~10日 CO_2 4% 条件下で培養し、そのコロニーを *Legionella* 用 EPA-VC 培地で、 CO_2 4% 条件下で 10日~20日間培養を行なった。

2) プラスミド DNA 及び染色体 DNA の抽出方法は、図-1、図-2 によって行なった。

- (1) 培養液1.0 ml 4℃ 12000rpm、3分遠心、集菌、上清を十分に捨てる。
- (2) 菌体 Pellet を氷冷TEG 100 μ l にて再懸濁する。
- (3) 200 μ l の 0.2 N NaOH 1% SDS を加え、up side down により穏和に混和し、氷中に5分以上保存する。
- (4) 150 μ l の氷冷 5 M CH₃COOK を加え、Tube を逆にした状態で穏やかに vortex し、氷中に5分以上保存する。
- (5) 12000 rpm で5分遠心し、上清を別の Tube に取る。
- (6) 500 μ l の Phenol Chloroform を加え15秒間 vortex し、12000 rpm、4℃、2分遠心し下層を取り除く。
- (7) 1000 μ l の 100% Ethanol（室温）を加え、vortex し、2分室温に保存する。
- (8) 12000 rpm、4℃、10分遠心し、上清の Ethanol を捨てる。
- (9) 4℃の冷 100% Ethanol 1000 μ l を穏やかに加え、穏やかに捨てる。
- (10) Vacuum 下で乾燥させ、10 μ l の ddH₂O に溶解する。

図1 プラスミド DNA の抽出方法

- (1) 100 ml 培養液を 4℃ 6000 rpm 10分遠心し集菌する。
- (2) 室温で融解し 2 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM EDTA に懸濁し 50 ml 1.5 ml 容量のマイクロチューブに移す。
- (3) 400 μ l の 10 mg/ml Lysozyme 0.25 mM Tris-HCl (pH 8.0) を加えてよく混合し、氷中 45 分放置する。
- (4) 400 μ l の STE P 液を加えてよく混合し、50℃で60分放置する。
- (5) 2.4 ml の TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA) を加えてよく混合する。
- (6) 5 ml の 70% 酒精を加えて手で攪拌し、室温 3000 rpm 5分遠心し上清を別のチューブに移す。
- (7) 4 ml のエタノールを加えてよく混合する。4℃ 15000 rpm 15分遠心する。
- (8) 沈澱を 300 μ l の TE に溶かし、5 ml 1.5 ml 容量のマイクロチューブに移し、100 μ l の TE でチューブをすすぎ加える。
- (9) 8 μ l の (10 mg/ml) DNase free RNase を加えてよく混合し 37℃ 10分インキュベートする。
- (10) 400 μ l の 70% 酒精を加えてよく混合し、室温 15000 rpm 3分遠心し上清を別のチューブに移す。
- (11) 40 μ l の CH₃COONa (pH 5.2) と 880 μ l のエタノールを加えてよく混合し 4℃ 15000 rpm 15分遠心する。
- (12) 上清を捨て、400 μ l の -20℃ 80% エタノールを加え up side down し、4℃ 15000 rpm 3分遠心する。上清を捨てこの操作をもう一度繰り返す。
- (13) 沈澱を 50~100 μ l の TE に溶解する。

図2 染色体 DNA の抽出方法

3) PCR の反応条件 DNA の変性、94℃、30秒、標的とする DNA の末端に相補的で特異的な 20 塩基程度の 2 つのプライマーのアニーリング、50℃、1分、耐熱性の酵素 Taq DNA Polymerase による鎖延長反応、72℃、1分、これを 1 サイクルとして増幅器を用いて 25 サイクル 行なった。希釈された低濃度細菌の高感度検出には PCR を 2 回繰り返すダブル PCR 法を採用した。

4. 実験結果及び *Legionella pneumophila* の検出用 DNA プライマーの検討結果

E. coli HB 101 (PIMA 2) を PCR-MPN 法と、全細菌法 (AODC) を用いて定量的な検出を行ない、この 2 つの定量結果の比較を行なった。これによって得られた結果を図-3 に示す。これによると PCR-MPN 法による結果と全細菌法による結果がほぼ等しいことから、PCR-MPN 法による微生物の定量検出は信頼性の高いものと思われる。

Legionella pneumophila ATCC 33153 の検出用 DNA プライマーは PCR によって増幅できることから、この検出用 DNA プライマーを用いて PCR による微生物の定量検出は可能と思われる。

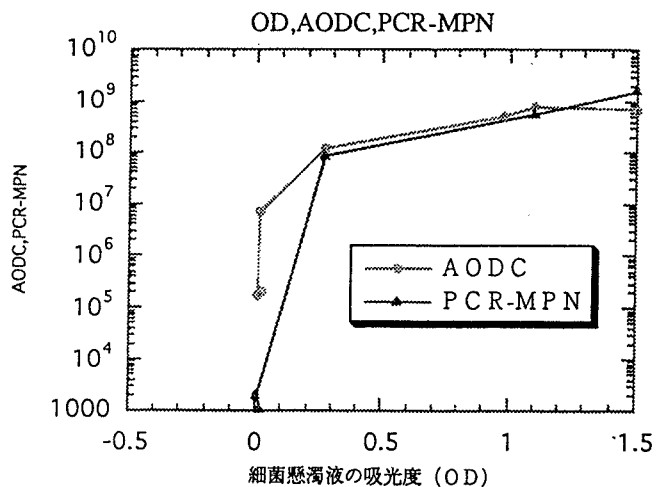


図-3 OD と AODC 及び PCR-MPN との比較