

VII-75

16SrRNA標的DNAプローブのIn-situ Hybridization手法の検討

長岡工業高等専門学校 正 ○荒木 信夫、長岡市役所 田中 力
環境工学コンサルタント 戸田 岳史
長岡技術科学大学 正 大橋 晶良、正 原田 秀樹

1. はじめに

細胞染色技術の進展にともなう、自然界に存在する微生物のうちでコロニーを形成する能力を有するものがその20～30%に過ぎないことが明らかとなった。これは、これまでに広く用いられてきた寒天培地を用いる単離・菌数計測方法では検出できない菌種が多く存在しているを示している。より正確に系内の微生物の生態系を把握するに、抗原抗体染色法や遺伝子プローブ法のような微生物を種別に検出する新しい方法が注目されている。本研究の目的は、16SrRNA標的DNAプローブを用いて微生物を特異的に検出する方法において、もっとも簡便かつ効果的に細胞内のRNAにプローブをハイブリダイズ手法を開発することである。また、得られた顕微鏡観察結果から画像解析によって検出を目的とする微生物の試料全細胞に占める割合を評価する方法についても検討した。

2. 実験方法 2.1 プローブ、試料及び試薬

実験には*Methanobacterium*をGenusレベルで検出する2種の合成オリゴヌクレオチドDNAプローブを用いた。プローブの塩基配列は5'-CCTCAAGCCTAATAGTATCT-3'(Probe MB582)、5'-TACCGTCGTCCTCCTTCCTC-3'(Probe MB1174)¹⁾であり、その5'末端に蛍光標識であるテトラメチルローダミンを付加した。混合微生物試料はショ糖を主成分とした人工基質で培養したグラニューールをホモジナイズし、バラホルムアルデヒド（4%PHA、390mM PBS Buffer、30mM NaCl、NaPO₄ Buffer、pH7.2、4℃、24時間）で固定して用いた。

いずれの方法においても1mL(50ng)のプローブを9μLのHybridization Buffer（0.9M NaCl、20mM Tris-HCl pH7.2、1% SDS、0～20% ホルムアミド(5%変化)、20% ブロッキング阻害剤(Block Ace：雪印乳業))に溶解して用いた²⁾。ハイブリダイゼーション時間は2時間であり、温度は42℃(Probe MB582)及び52℃(Probe MB1174)である。ターゲットサイトへの非接合プローブの洗浄はWashing Solution（NaCl(Hyb Bufferに含まれるホルムアミド濃度によって調整)、0.05M NaPO₄、1% SDS）を用い、ハイブリダイゼーションと同じ温度条件で2～20分間行った。

2.1 In-situ Hybridization 手法

①スライドガラス法²⁾ 70℃のゼラチン溶液（0.075% ゼラチン、0.01% 硫酸カリウムクロム）に浸して空気乾燥させたスライドガラスを用いた。バラホルムアルデヒドで固定した微生物試料1μLをスライド表面に塗布し、空気乾燥、エタノール脱水を行った後にHybridization Buffer 9μLを試料上にスポットし、さらに1μLのプローブ溶液を加えてハイブリダイズした。洗浄はHybridization BufferをWashing Solutionで洗い流した後、さらにスライドガラス表面の試料上にWashing Solutionをスポットし、洗浄設定時間後に直ちに蒸留水ですすいだ。

②マイクロチューブ法 1.5mLのマイクロチューブに微生物試料3μL、Hybridization Buffer 9μL及びプローブ溶液2μLを加えてハイブリダイズを行った。洗浄はハイブリダイズを終了したマイクロチューブに1.0mLのWashing Solutionを加えた。洗浄終了後直ちにこの溶液をシリンジで回収し、フィルター（アイソポアメンブレン、0.20mm孔、Millipore）上に集菌し、蒸留水で洗浄、空気乾燥した。

③フィルター法 ②で用いたフィルターで微生物試料3μLを集菌し、フィルターをホルダーから取り出して空気乾燥、エタノール脱水を行った後に①法に準じて9μLのHybridization Bufferをフィルター上にスポットし、さらに1μLのプローブ溶液を加えてフィルター上でハイブリダイズした。洗浄はフィルターをWashing Solution中に浸して行った。また、集菌したフィルターの試料付着表面をゼラチンコーティングスライドに接着して微生物試料をスライド表面に移し、①法に準じてハイブリダイズ・洗浄する方法も試みた。

2.3 全菌染色

フィルター上の試料は明視野での観察ができないので、アクリジンオレンジ(AO)もしくはDAPIによる2重染色を行い、試料中の全微生物の観察を行った。スライドガラス及びフィルター表面のプローブをハイブリダイズし

た試料にAO Staining Solution（1000mg-AO/mL⁻³）またはDAPI Staining Solution（1000mg-DAPI/mL⁻³）をスポット（10mL）し、常温において暗所で5分間染色を行った。

2.4 顕微鏡観察および画像解析

プローブ及びAO・DAPIで染色した微生物試料は落射蛍光顕微鏡（Olympus BH-2）とそれぞれの染料に対応したフィルターセットを用いて観察した。顕微鏡同一視野において、励起波長を変えてプローブおよびAOまたはDAPI視野を写真撮影し、その写真をスキャナーを用いてコンピュータに取り込み、画像解析により全細胞に占める*Methanobacterium*の割合(ここでは存在率とする)を、蛍光細胞の個数および蛍光細胞面積の比から算出した。

$$\text{存在率(\%)} = \frac{\text{標的微生物細胞}}{\text{全微生物細胞}} = \frac{\text{プローブによる蛍光細胞個数}}{\text{AOorDAPIによる蛍光細胞個数}} \div \frac{\text{プローブによる蛍光細胞画像面積}}{\text{AOorDAPIによる蛍光細胞画像面積}}$$

3. 実験結果と考察

表-1に各ハイブリダイゼーション法の結果を示す。スライドガラスを用いた方法は微生物試料の濃度調整と細胞の分散処理を行う適切に行う必要があった。一方、チューブを用いた方法は最も簡単な操作でハイブリダイズ・洗浄を行うことができるが、試料中に無機塩の結晶が多く含んでいるとフィルターに捕捉され蛍光顕微鏡観察時に障害となった。フィルターで集菌後にハイブリダイズする方法は無機塩の結晶は除去できるものの、操作中に多くの細胞がフィルター表面から脱離した。

Table-1 Comparison of In-situ Hybridization Results for Oligonucleotide Probes

方 法	検 討 結 果
①スライド	○ 微生物試料をスポットした周辺に細胞が凝集し、その部分でプローブの非特異的結合が発生する。明視野での観察が可能
②チューブ → フィルター	○ 最も簡便に行うことができフィルターのバックグラウンド蛍光も低い。
③フィルター	× フィルター上に集菌した細胞がハイブリダイズ・洗浄の過程で剥離する
③フィルター → スライド	△ フィルターに集菌した細胞を全てスライドガラス表面に移せない

図-1はスライド法におけるホモジナイズしたグラニューールの明視野観察結果である。図-2は同一視野の蛍光顕微鏡観察結果である。明視野では多くの細胞が確認できるが、蛍光観察では小さなフロックを形成した*Methanobacterium*だけがローダミン特有の蛍光を発し特異的に検出されている。MBはF420の蛍光からも確認できた。

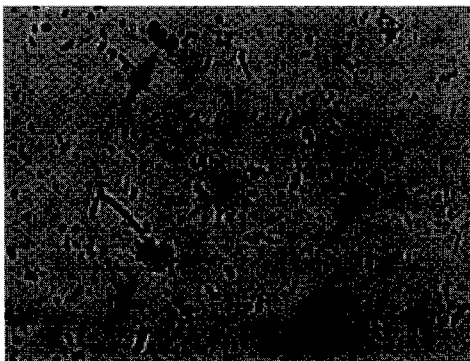


Fig-1 Bright-field micrograph of homogenized granule (× 200)

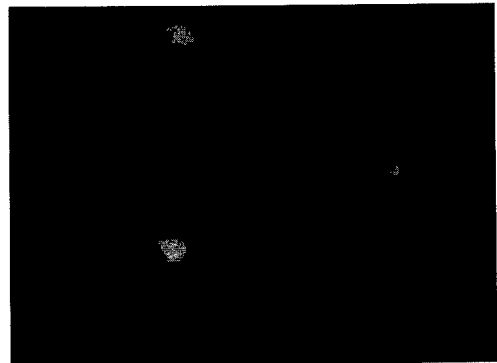


Fig-2 Fluorescence-field micrograph of *Methanobacterium* hybridized with rhodamine labeled oligonucleotide probes.(ex:530nm)

スライド法を用いた3枚ペアの明視野及び蛍光顕微鏡写真からグラニューール細胞中の*Methanobacterium*の存在率を求めた。写真からカウントした細胞個数をもとに求めた存在率は8.4%（全計測個数638）であるのに対し、画像解析により細胞面積の比から求めた存在率は3枚の写真で大きく異なり、3.6～10.3%(平均6.3%)であった。画像から存在率を求める方法は俊速に行えるが、無機塩の結晶が強い蛍光を発すること、微生物種によって細胞の大きさが異なること、視野での糸状菌の有無で細胞面積が大きく変化すること等が障害であることが判明した。

- 参考文献 1) Raskin.L *et al*, *App.l Environ. Microbiol.*, **60**(4), 1232-1240 (1994).
2) Amann.R.I (1995) *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6. 1-15, Kluwer Academic Publishers.