

VII-76

PCR法による従属栄養硝化細菌の特異的検出

日本大学研究生 学生員○成田 勝  
日本大学工学部 正 員 中村玄正

1. はじめに

下・廃水の高度処理としての生物学的窒素除去は硝化工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、その大部分が独立栄養細菌であり増殖速度が遅く、菌の検出、同定およびMPN法における菌数測定では4週間程度と長期間の培養日数を要している。本研究は遺伝子工学的手法を導入することにより即時的に有用細菌の検出、同定および定量方法を開発しようとするものである。すなわち、研究の第一歩として、PCR法(Polymerase Chain Reaction 法)を用いて、従属栄養硝化細菌であるA. globiformisを特異的に検出させる方法を開発することを目的としている。

前報<sup>1)</sup>において、PCR増幅に用いたA17プライマーは、E. coliとE. carotovoraを検出せず、P. putidaのDNAも検出すると報告した。その後、P. putidaを検出させないために作成したA27プライマーを用いてPCR増幅させ検討した結果、P. putidaは検出せず、E. coliとE. carotovoraが検出された。本研究では、このA17プライマーとA27プライマーを用いて2回PCR増幅を行う方法でA. globiformisの特異的検出を試みた。

2. 実験方法

(1) 供試菌株…供試菌株は、以下の5つの菌を用いた。

- 従属栄養硝化細菌…Arthrobacter globiformis IF03062
- 特異的検出を検討するための対照菌株…Erwinia carotovora 1068、Escherichia coli HB101、Pseudomonas putida PRS2000、Pseudomonas putida subsp.

(2) 細菌の純粋培養…それぞれの細菌は、それぞれの寒天培地上に生えたコロニーを白金耳でかきとり専用の液体培地10mlに植菌し、30℃(E. coliは37℃)で一晩振とう培養を行った。一夜培養液は2回行うPCR増幅による特異的検出を検討するため、培養液200μlづつを1.5ml容マイクロチューブにいろいろな場合で混合させ分注した。以下に、混合したマイクロチューブの内容を示す。

マイクロチューブ①:A. globiformisの一夜培養液のみ200μl。……………合計200μl

マイクロチューブ②:A. globiformis、E. carotovora、E. coli、P. putida PRS2000、P. putida subsp. の一夜培養液をそれぞれ200μl。……………合計1ml

マイクロチューブ③:E. carotovora、E. coli、P. putida PRS2000、P. putida subsp.

の一夜培養液をそれぞれ200μl。……………合計800μl

マイクロチューブ④:E. carotovora、E. coliの一夜培養液をそれぞれ200μl。……………合計400μl

マイクロチューブ⑤:P. putida PRS2000、P. putida subsp. の一夜培養液をそれぞれ200μl。…合計400μl  
以下、マイクロチューブ①をN1、マイクロチューブ②をN2、マイクロチューブ③をN3、マイクロチューブ④をN4、マイクロチューブ⑤をN5とする。

(3) 染色体DNAの調製…それぞれの混合培養液マイクロチューブN1～N5の染色体DNAの調製を行った。

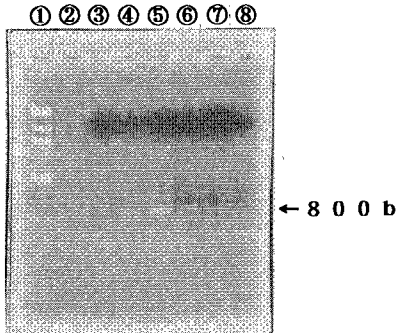
(4) PCR増幅…A17プライマーとA27プライマーを用いて、2回PCR増幅を行ってA. globiformisの特異的検出を検討した。1stPCR増幅では、+コントロールとしてユニバーサルプライマーを2種使用した場合と、ユニバーサルプライマーとA27プライマーを使用した場合について行った。鋳型DNAは、N1～N5のマイクロチューブを1μlづつ使用した。2ndPCR増幅では、+コントロールとしてユニバーサルプライマーを2種使用した場合と、ユニバーサルプライマーとA17プライマーを使用した場合について行った。鋳型DNAは、1stPCR産物を1μlづつ使用した。PCR反応液の調製は全容量を100μlとし、PCR反応条件は、変性温度94℃1min→アニーリング温度65℃2min→伸長温度72℃2minを1サイクルとして25サイクルで行った。PCR増幅後の電気泳動結果から、A. globiformisの特異的検出を検討した。

3. 実験結果と考察

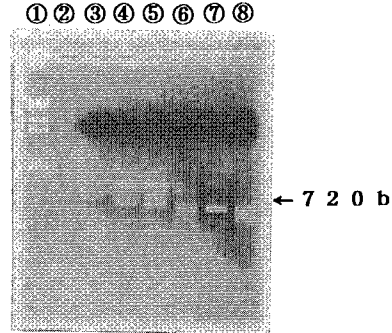
- A27プライマー使用による1stPCR増幅結果…1stPCR増幅では、A27プライマー(P. putidaを検出しないプライマー)を用いたため、写真-1より、マイクロチューブN5は検出されなかった。また、マイクロチューブN1～N4は、約800bp付近にDNAバンドが検出された。
- A17プライマー使用による2ndPCR増幅結果…2ndPCR増幅では、A17プライマー(E. carotovoraとE. coliを検出しないプライマー)を用いたため、マイクロチューブN3とN4は検出されないはずであった。しかし、写真-2より、マイクロチューブN3～N4はDNAバンドが検出されてしまった。また、マイクロチューブN5のDNAバンドはスミアの状態となった。これらは非特異的DNAバンドであり、これらのDNAを検出させないためにアニーリング温度を上げる等のPCR反応条件を変える必要があると考えられた。
- アニーリング温度68℃におけるPCR増幅結果…非特異的DNAバンドを検出させないため、アニーリング温度を68℃で再度PCR増幅を行うこととした。写真-4より、マイクロチューブN1とN2に約720bp付近にDNAバンドを確認することができた。また、マイクロチューブN3～N5にはDNAバンドは検出されなかった。アニーリング温度を

68℃にしたことで良好な結果が得られた。

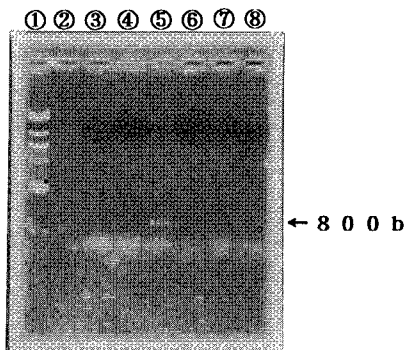
よって、*A. globiformis*の特異的検出を行うためには、A17プライマーとA27プライマーを用いて2回PCR増幅を行い、PCR反応条件としてアニリング温度を68℃とすることで可能と考えられる。



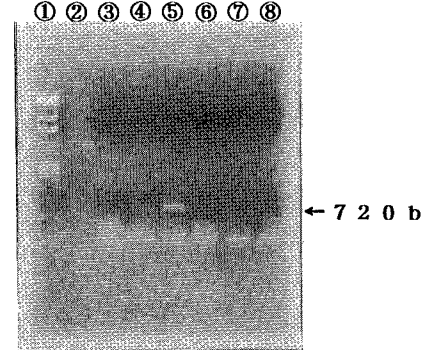
①: λ phageDNA/HindIII  
②: Blank  
③: DNAなし (-) コントロール 520F-A2R  
④: N1 520F-A2R  
⑤: N2 520F-A2R  
⑥: N3 520F-A2R  
⑦: N4 520F-A2R  
⑧: N5 520F-A2R  
写真-1 1stPCR増幅結果 (アニリング温度65℃)



①: λ phageDNA/HindIII  
②: Blank  
③: DNAなし (-) コントロール 520F-A1R  
④: N1 520F-A1R  
⑤: N2 520F-A1R  
⑥: N3 520F-A1R  
⑦: N4 520F-A1R  
⑧: N5 520F-A1R  
写真-2 2ndPCR増幅結果 (アニリング温度65℃)



①: λ phageDNA/HindIII  
②: Blank  
③: DNAなし (-) コントロール 520F-A2R  
④: N1 520F-A2R  
⑤: N2 520F-A2R  
⑥: N3 520F-A2R  
⑦: N4 520F-A2R  
⑧: N5 520F-A2R  
写真-3 1stPCR増幅結果 (アニリング温度68℃)



①: λ phageDNA/HindIII  
②: Blank  
③: DNAなし (-) コントロール 520F-A1R  
④: N1 520F-A1R  
⑤: N2 520F-A1R  
⑥: N3 520F-A1R  
⑦: N4 520F-A1R  
⑧: N5 520F-A1R  
写真-4 2ndPCR増幅結果 (アニリング温度68℃)

#### 4. おわりに

- (1) アニリング温度65℃でのPCR増幅では、写真-2の2ndPCR増幅結果から、非特異的DNAバンドが見られたため、アニリング温度を上げる等のPCR反応条件を変える必要があると考えられた。
- (2) アニリング温度68℃でのPCR増幅では、写真-4の2ndPCR増幅結果から、サンプルN1とN2に約720bp付近にDNAバンドを確認することができた。よって、*A. globiformis*の特異的検出を行うためには、A17プライマーとA27プライマーを用いて2回PCR増幅を行い、PCR反応条件としてアニリング温度を68℃とすることで可能と考えられた。

本研究は、松本順一郎博士(元日本大学教授、東北大学名誉教授)との共同研究である。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) 成田、中村、松本：土木学会第50回年次学術講演会講演概要集、pp.1096-1097、1995