

VII-270 組み合わせ特異プライマーを用いた PCR による標的細菌の選択的検出

日本大学大学院 学生員○熊谷 章
日本大学工学部 正 員 中村玄正

1. はじめに

窒素除去プロセス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、菌の検出や同定および菌数測定には長期間の培養日数を必要としている。ここで、本研究は、環境中の微生物を種特異的に検出する新しい方法として適用が検討されてきている PCR を用いた、即時的な有用細菌の検出、同定および定量方法を開発しようとするものである。そこで研究の第一歩として、PCR 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ことを目的としている。

前報¹⁾より、組み合わせ特異的プライマーを用いた nested PCR において、アニーリング温度を 68℃とすることにより選択的検出が可能であると報告した。しかし、検出する菌の量的なことに、68℃と高い温度が影響をおよぼすと思われる。そこで本研究では、アニーリング温度 65℃と 68℃について検出を比較検討した。

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。

- ・選択的検出対照細菌…*Arthrobacter globiformis* IFO3062
- ・区別すべき対照細菌…*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、専用の液体培地 10ml に植菌し、30℃(*E.coli*は 37℃)で一夜振とう培養を行った。*A.globiformis*はその培養液を用いて 10 倍希釈法によって 10^{-11} まで希釈した各希釈のものをサンプルとした。以下にサンプルの内容を示す。

サンプル①:*A.globiformis*を希釈したもの

サンプル②:対照細菌 4 種と *A.globiformis*を希釈したものと混合したもの

サンプル③:対照菌株 4 種を混合したもの

(3)染色体 DNA の調製…それぞれの混合培養液サンプルについて染色体 DNA の調製を行った。

(4)nested PCR 増幅…16SrRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定することによって選定した 2 つのプライマーと全原核生物にユニバーサルなフォワードプライマーを用いた。PCR 反応条件は、変性温度 94℃ 30sec→アニーリング温度 68℃ 30sec→伸長温度 72℃ 1min30sec 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* の検出の検討を行った。

3. 実験結果と考察

1)サンプル①のアニーリング温度 65℃による結果…希釈段階 $10^0 \sim 10^{-11}$ まですべて約 720b 付近に DNA が増幅されたことが確認できた。また、このことにより低濃度における染色体 DNA の調製は、うまく行われたということがいえた。

2)サンプル①のアニーリング温度 68℃による結果…希釈段階 $10^0 \sim 10^{-5}$ まで約 720b 付近に DNA が増幅されたことが確認できた。1)のことより染色体 DNA の調製はうまく行われているが、68℃という高温度が増幅結果に影響をおよぼしてしまったと考えられた。

3)サンプル②のアニーリング温度 68℃による結果…希釈段階 10^0 ではうすくではあるが、約 720b 付近に DNA が増幅された。その他の 10^{-3} 、 10^{-5} 、 10^{-7} 、 10^{-9} 、 10^{-11} では 720b 付近の DNA の増幅は認められなかった。ここでは、他の菌の DNA による、PCR 反応の阻害があることも考えられた。阻害のない反応とするため、PCR 増幅に用いる染色体 DNA 量を減らすと、目的とする細菌の染色体 DNA 濃度もうすくなるため 2)で

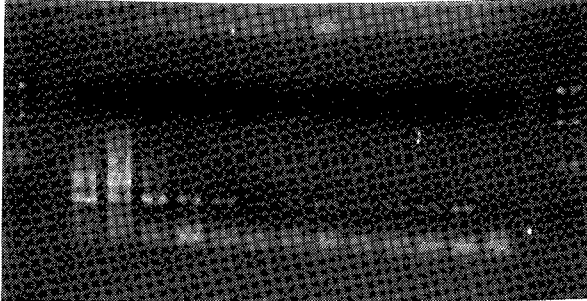
キーワード: アニーリング、プライマー、nested PCR

郡山市田村町徳定字中河原 1 日本大学工学部 衛生工学研究室 TEL 0249-56-8707 FAX 0249-56-8858

述べた DNA 量と温度の影響が生じたと思われた。また、サフ®③は DNA が検出されていないことより、非特異的 DNA へのアニーリングは、アニーリング温度を 68°C とすることで抑えることができると考えられる。

・サフ®①のアニーリング温度 65°C による結果

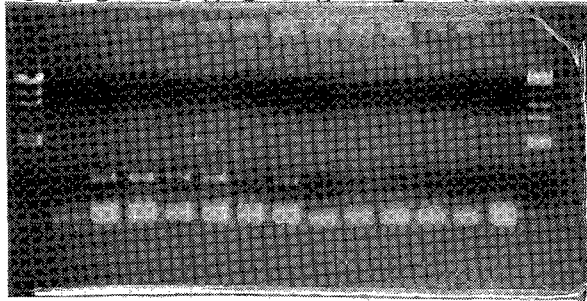
① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑯ ⑰



①: λ phageDNA/Hind III
②: プライマー
③~⑯: サフ® ① $10^0 \sim 10^{-11}$
⑮: (-) control (DNA なし)
⑯: プライマー
⑰: λ phageDNA/Hind III

・サフ®①のアニーリング温度 68°C による結果

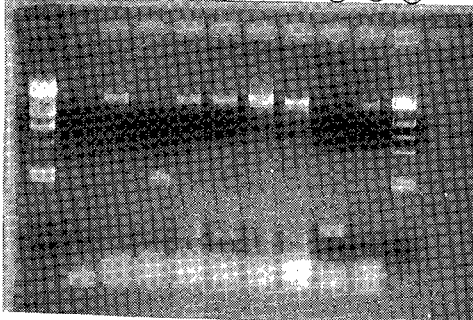
① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮



①: λ phageDNA/Hind III
②: (-) control (DNA なし)
③: ~⑮: サフ® ① $10^0 \sim 10^{-11}$
⑮: λ phageDNA/Hind III

・サフ®②のアニーリング温度 68°C による結果

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪



①: λ phageDNA/Hind III
②: (-) control (DNA なし)
③、④、⑤、⑥、⑦、⑧: サフ® ②の $10^0, 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-9}, 10^{-11}$
⑨: (+) control (*A. globiformis*)
⑩: サフ® ③
⑪: λ phageDNA/Hind III

4. おわりに

- (1) 選択的細菌の検出を行うためには、組み合わせ特異的プライマーを用いてアニーリング温度を 68°C とすることにより可能である。しかし、アニーリング温度 68°C とする場合、高温による影響があると考えられた。
- (2) アニーリング温度 68°C とするとき、低濃度の細菌を検出できないことがわかった。
- (3) アニーリング温度を低くした選択的な検出を行う場合には、特異的なフォワードプライマーを作成する必要があると思われる。

【参考文献】

- (1) 成田、中村: 土木学会第 51 回年次学術講演会講演概要集、pp.152-153、1996