

VII-296 DNA抽出を含まない直接 hot-start PCR法 による *Cryptosporidium parvum* オーシストの簡易検出に関する研究

東北学院大学大学院工学研究科 学生員○斎藤 公利
東北学院大学大学院工学研究科 学生員 石神 清隆
東北学院大学工学部 佐々木 こずえ
東北学院大学工学部 正会員 遠藤 銀朗

1. はじめに

地球環境はもとより、身近な環境（大気、土壌、河川、湖沼、海域等）の広範囲に亘って様々な環境問題が生じてきている一方、おのおのの分野で資源のリサイクル利用の動きが見られる。水道事業も例外ではなく、下水処理水等を再利用する施設などが多くなってきた。水道機関は、市民生活の安全に直接的に関わってくるものであり、もし、これらの環境水が汚染され、感染症などを引き起こす病原性微生物が混入していた場合、伝染症の集団発生を招く可能性が生じてくる。そのため、これらの水環境の衛生と安全性の確保を最重要視しなければならない。

そこで、前記に述べたことを未然に防ぐためには水質衛生の確保が重要と考え、中でも下水に注目し、*Cryptosporidium parvum* の濃度を把握することを目的とする研究を行った。本発表では基礎的な実験段階として、hot-start PCR法を用いて、*C. parvum* の検出法簡略化を試みたので報告する。また、従来の検出法であるDNA抽出によるPCR法との比較も行い評価した。

2. 実験方法

2-1 供試オーシスト

ホルマリン未固定のオーシストを希釈して実験を試みた。実験の際の濃度は、 6.5×10^4 oocyst/ μ l に希釈して検出を試みた。

2-2 従来法によるオーシストDNAの抽出とPCR条件

(1) DNA抽出法

1.5ml エッペンドルフチューブに1ml の試料を注入し、4℃、8000rpmで5分間遠心する。上清を捨て、SEP液（プロテナーゼK（20mg/ml）、0.15M NaCl、0.1M EDTA）を500 μ l 加え2～3回up side downさせ、65℃で2時間インキュベートする。インキュベート後に、500 μ l のLysis buffer（0.1M NaCl - 0.1M Tris - Hcl、10% SDS）を加え軽くボルテックスする。-80℃で2分間凍結させ、その後65℃で5分間インキュベート。更にこれを5回繰り返す（凍結融解法）。等量のフェノールクロロホルムを加えup side downで混合し、室温、12000rpmで5分間遠心分離。上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、等量の100%イソプロパノールを加え-20℃で1時間インキュベート。インキュベート後によく混合し、室温、15000rpmで15分間遠心分離。上清を捨て、ペレットを100%エタノール、70%エタノール、100%エタノールの順でリンスし、リンスが終了後、真空遠心乾燥させる。100 μ l のDD-H₂Oを加え精製する。

(2) PCR

PCR組成液及びPCR条件を以下のように示す。

① PCR組成液

DD-H ₂ O	77.5 μ l
10×PCR Buffer	10 μ l
dNTPs	8 μ l
Primer 1	1 μ l
Primer 2	1 μ l
試料	2 μ l
Taq DNA	0.5 μ l

PCR条件

変性	94.5℃	1 min
アーニング	54℃	30 sec
伸長	72℃	30 sec
		40サイクル
	4℃	

キーワード：*Cryptosporidium parvum*、Hot-start PCR法、nestedPCR

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央1丁目13-1 東北学院大学工学部土木工学科 環境生物工学研究室
TEL 022-368-1115 (ex.294) FAX 022-368-7070

② PCR組成液		PCR条件	
DD-H ₂ O	77.5 μ l	変性	94℃ 2 min
10×PCR Buffer	10 μ l		1サイクル
dNTPs	8 μ l	変性	94℃ 30 sec
Primer 3	1 μ l	アーニング	54℃ 30 sec
Primer 4	1 μ l	伸長	72℃ 30 sec
1回目のPCR反応	2 μ l		40サイクル
Taq DNA	0.5 μ l		4℃

2-3 直接hot-start PCR法によるオーシストの検出

従来法とは違いDNA抽出操作を省略し、nested PCRするためにhot-start PCRを以下のように行い、短期間で簡略化を目的とした検出方法を開発した。

(a) DD-H ₂ O	77.5 μ l	(b) Primer 1	1 μ l
10×PCR Buffer	10 μ l	Primer 2	1 μ l
dNTPs	8 μ l	Taq DNA	0.5 μ l
試料	2 μ l		

上記に記した(a)を97℃25分、35℃1分の過程を経た段階で(b)を加え、その後は2-1①のPCR条件、②のPCR組成液、PCR条件と同様にPCRを行う。

3. 実験結果及び考察



Fig.1

3-1 従来法

従来法による検出では、Fig.1を見るようにPCR増幅されたそれぞれバンドを確認することができなかった。考えられる理由としては、DNA抽出際の操作的な問題と抽出段階でのDNAのロスがあげられる。いずれにせよ、DNA抽出操作を含むPCR法では、高度の抽出技術が必要とし極微量のオーシストのDNA抽出をロスなく行うことは容易でなく、実験結果が実験者の熟練度によって左右されることが考えられる。

3-2 直接 Hot-start PCR法

本研究で開発したhot-start PCR法による検出は、Fig.1に示すように、所定のサイズのDNAのバンドが確認された。標的とするバンドは283bpであり、PCR増幅されたこのDNAを確認することができたため、*C. parvum*の存在を示唆するものと考えられる。

4. おわりに

下水からの*C. Parvum* 検出、殺虫を最終目的とする研究として、今回の研究は第1段階の基礎的なものにすぎない。今後は、今回の実験結果を踏まえてより、サザンハイブリダイゼーション法等によって確認することを試みたい。

5. 謝辞

オーシストを分与して頂いた、麻布大学環境保健学部健康環境科水環境研究室平田強教授に厚く感謝致します。