

Ⅱ-98

PCR法による試験管内 DNA増幅と環境放出遺伝子 組換え微生物のモニタリングへの応用

東北学院大学工学部 学正員 ○小関 多賀美

同上 斉藤 秀

同上 正 員 遠藤 銀朗

1. 研究の目的

環境浄化や配水処理を目的として、遺伝子組換え微生物の活用が種々検討されている。しかし、環境生態系におけるこれらの微生物の挙動を十分に知ることが前提となるため、まず生態系におけるこれらの組換え微生物のモニタリング方法の確立が必要とされている。本研究においては、組換え生物の遺伝子そのものを追跡することによって挙動をモニタリングすることを目的として、感度を高めつつ検出する方法として、試験管内DNA増幅法であるPCR法（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法）の適用について検討した。また検出方法としてDNAプローブによる各種ハイブリダイゼーション法について検討し、PCR法とDNAプローブ法との組み合わせによる高感度検出方法の確立を目的とした。

2. 研究材料・装置および方法

《研究材料および装置》

- ・PCR法：①Taq DNA ポリメラーゼ（シータス社製—宝酒造販売）②大腸菌MV1184, HB101/pIMA2 およびプラスミドpIMA2 ③pIMA2 用プライマー-DNA ④dNTPs（宝酒造製）

PCR反応を行なわせるための温度可変インキュベーターとして、DNA Thermal Cycler (PERKIN ELMER CETUS 社製) を用いた。

- ・ハイブリダイゼーション法：①大腸菌MV1184, HB101/pIMA2 ②DNAプローブ（プラスミドpIMA2 のlin A の282bp 部分をPCR法により増幅後、化学発光試薬によって標識したもの。）③マイクロゾム（下水汚泥をLB培地によって無機的に約七ヶ月半連続培養したもの。）④ハイブリダイゼーション用試薬（BRL 社製他）および、装置一式。

《研究方法》

γ-BHC分解遺伝子lin A を組み込んだプラスミドpIMA2 を用いてPCR法によってlin A 部分を特異的に増幅させる。PCR増幅用のプライマーとしてはlin A の内部に特異的にアニールする、20merのプラス鎖側およびマイナス鎖側の二種類のものをDNA合成機によって作成し用いた。検出用に用いたDNAプローブは、非ラジオアイソトープのものとしては現在最も高感度と考えられる化学発光ラベル法によって作成したものをを用い、X線フィルムを感光させて検出する方法を採用した。PCR法と核酸プローブ法との組合せとして、PCR法—ドットプロットハイブリダイゼーション法について検討し、環境放出組換え微生物のモニタリングの検討としては、モデル環境生態系であるマイクロゾム（模擬水圏生態系）に導入したプラスミドpIMA2 保有微生物を、同上のDNAプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーション法によって検出し、挙動を追跡した。

3. 研究結果

(1) プラスミド pIMA2 を PCR 法によってサイクル数を 5、10、15、20、25 回と変えて、増幅させたものを 8、4、2、1 μ l ずつメンブレンフィルター上にプロットし、ドットブロットハイブリダイゼーション法により検出した結果、PCR 法のサイクル数や、プロット量の違いにより検出反応の強さが異なることがわかった。(写真-1)

(2) プラスミド pIMA2 を保有する大腸菌 HB101 及び、大腸菌 MV1184 を各々 1、3、5、7、9、11、13 乗に希釈し、これにより抽出したプラスミド pIMA2 を PCR 法により増幅させた結果、HB101 及び、MV1184 に保有されるプラスミド pIMA2 の増幅目的遺伝子部分 (282 bp) のみが、増幅したことが分かる。

(写真-2)

(3) プラスミド pIMA2 を保有する大腸菌 MV1184 をマイクロゾム中へ 9 対 1 の割合で混合したものを、L 寒天培地上のメンブレンフィルター上へ撒き、生えてきた菌に対してコロニーハイブリダイゼーション法を行なった結果、ハイブリダイゼーション後の洗浄を緩くしたものは、目的とするプラスミド pIMA2 の検出が行なわれたことが分かる。一方、洗いを強く行なったものは、メンブレンフィルター上の DNA が全部洗い流され検出できなかったものと考えられる。(写真-3)

4. 結論

1. PCR 法では、検出目的 DNA の初期の量が極めて少ない場合においても、適切な回数、増幅を行なうことにより検出可能とすることができる。

2. コロニーハイブリダイゼーション法では、マイクロゾムからの特定微生物 DNA の検出が可能である。

3. 結果の 1 と 2 を組合せることにより特定の遺伝子の高感度な検出が可能であり、組換え微生物の野外での挙動をモニタリングすることに利用できると考えられる。

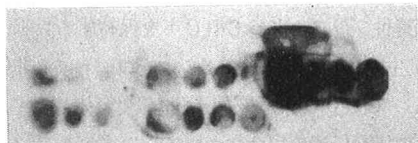


写真-1 γ-BHC 分解遺伝子の PCR 法ドットブロット
ハイブリダイゼーション法による検出結果

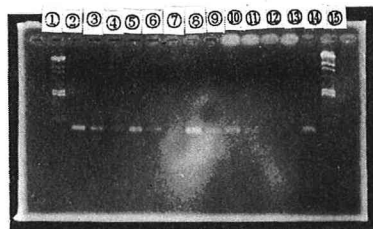


写真-2 抽出プラスミド DNA の PCR 法 (2 回 = 50 サイクル) 増幅して検出した結果
(8、4、2、1)

・ サイクル数 5 回	・ サイクル数 15 回	・ サイクル数 25 回
① pBR322 ($\times 100$)	② "	③ "
④ λ-DNA ($\times 100$)	⑤ "	⑥ "
⑦ PUC4K ($\times 100$)	⑧ "	⑨ "

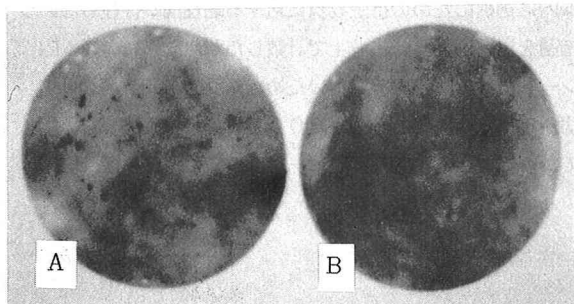


写真-3 コロニーハイブリダイゼーション法による標的微生物の特異的検出結果
(A: ハイブリ後ゆるく洗浄, B: ハイブリ後極度に洗浄)

① λ-DNA / Hind III		
② HB101 / pIMA2	10^{-1}	
⑦ "	10^{-13}	
⑨ MV1184 / pIMA2	10^{-1}	
⑫ "	10^{-13}	
⑬ pBR322 ($\times 100$)		
⑭ pIMA2 ($\times 100$)		
⑮ λ-DNA / Hind III		