

II—108

特定のパクリアル16S-rRNA検出のためのオリゴマーDNAプローブを用いた
DNA-RNAハイブリダイゼーション

東北学院大学工学部 学生員 ○信夫 芳広
同 大学院 学生員 及川 栄作
同 工学部 生会員 遠藤 銀朗

1. 研究目的

水系の富栄養化の原因物質の1つである窒素の除去に関与している硝化細菌の生態を調査し富栄養化現象やその回復のメカニズムを解明することは、従来の方法では、この細菌が独立栄養細菌で増殖が極めて遅いなどの理由によって困難とされて来た。本研究ではこのような硝化細菌の生態を調査するために種特異的なDNAプローブの開発を行い、このプローブを使用した*in situ* ハイブリタイゼーション法によって排水処理プロセスや湖沼その他に存在する硝化細菌を培養することなく、菌数の計数し、同定する方法を確立することを目的とした。

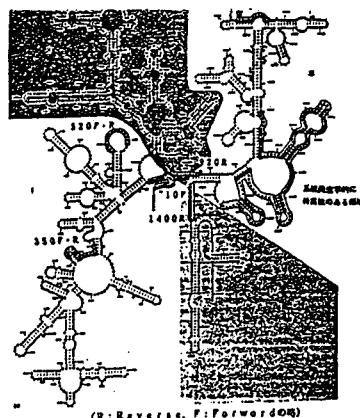
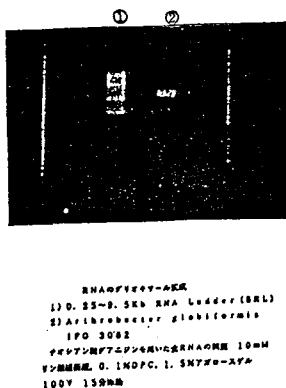
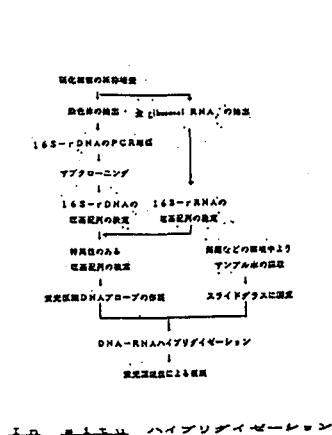
2. 研究方法

従属栄養の硝化細菌 *Arthrobacter globiformis* IFO3062株の染色体を抽出し、16S-rRNAの種特異性の特に強いといわれている領域である大腸菌の部位で1100~1400部位のユニバーサルプライマーを用いて遺伝子増幅法PCR (polymerase chain reaction) 法によって増幅した。増幅断片の末端をT4 DNA polymeraseを用いてプライマーの閉鎖末端とした後にT4 polynucleotid kinaseを用いてプライマーの5'末端をリン酸化した。これを大腸菌用のplasmidベクターを用いてサブクロニングした。得られた形質転換体のinsertを確認した上でplasmidを調整し塩化セシウム密度勾配超遠心精製した後に α -³⁵Sでプライマーを標識してdideoxy法によって塩基配列の決定をした。塩基配列の決定をした *A. globiformis* とすでにデータベースに登録されている他の真性細菌の16S-rRNAの塩基配列を比較し、2カ所にこの菌に特異性のある部位を見つけ出しこれにアルスロバクタープローブA1, A2と名付けた。ともに5'末端にアミノリンクを結合した19merのオリゴヌクレオチドをDNA合成機 (abi) で合成した。

作製したオリゴDNAプローブA1の種特異性を *Escherichia coli* HB 101, *Pseudomonas putida*, *Erwinia carotovora*からの全RNAを超音波細胞破碎機で細胞を破碎した後にチオシアン酸グアニジンを用いた方法で抽出した。それぞれのバクテリアRNAをグリオキサル変性しナイロンメンブラン上にスロットブロッター (BRL) を使用して300ng, 600ng, 900ngスポットし、乾かした後UV照射、80°C30分bakingしてメンブランにRNAをバウンドさせた。メンブランとハイブリダイゼーション緩衝液を入れ37°C、56°C、65°C30分プレハイブリダイゼーションした。液を捨て新しい同じ緩衝液で5'末端にTdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) を用いてジグキシゲンin-11-dUTP (ペーリンガーマンハイム) 標識したDNAプローブA1を加えて一晚同じ温度でハイブリダイゼーションした。ポジティブコントロールとして16S-rRNA全生物ユニバーサルな520Rアンチセンス鎖プライマー、ネガティブコントロールとは同様にユニバーサル520Fセンス鎖プライマーを用いた。発色操作をして遺伝子を検出した。

3. 實驗結果

- a) . 520Fプライマーではすべての細菌の遺伝子が検出されなかった。
b) . 520Rプライマーではすべての細菌の遺伝子が検出された。
c) . A. globiformis 種特異的オリゴDNAプローブ (A1) を用いた結果、37℃の条件ではほかのバクテリアにも遺伝子が検出された。
d) . 以上の結果よりA1は温度条件によってはA. globiformisのみを検出するin situ ハイブリダイゼーション用のプローブとして適用することが可能となることが明らかとなった。



大腸菌 16 S rRNA の 2 次構造と PCV に用いたユニバーサル プライマーの位置

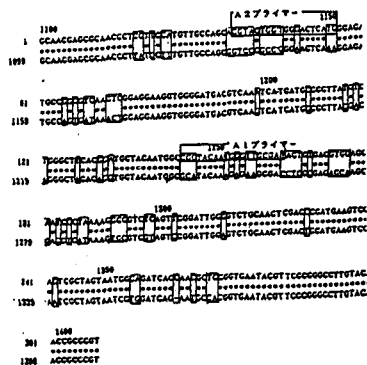
37℃37℃56℃65℃



- | | |
|------------------------------------|--------|
| 1) <i>Escherichia coli</i> | 300 ng |
| 2) <i>Pseudomonas putida</i> | |
| 3) <i>Erwinia carotovora</i> | |
| 4) <i>Arthrobacter globiformis</i> | 600 ng |
| 1) <i>E. coli</i> | |
| 2) <i>P. putida</i> | |
| 3) <i>E. carotovora</i> | |
| 4) <i>A. globiformis</i> | 900 ng |
| 1) <i>E. coli</i> | |
| 2) <i>P. putida</i> | |
| 3) <i>E. carotovora</i> | |
| 4) <i>A. globiformis</i> | |

Universal 520F primer
Universal 520R primer
A. globiformis specific primer (AI)

Slot Blot Hybridization



トシホシガキ [P. 362 巻 (上巻) と P. 361 (下巻) の 155: 36A 1079~1400
 巻 (P. 361) の巻末部列の比較、並びに 155 アライマーの巻末
 total 369 ba. 巻末性 375