

II-123

遺伝子工学を利用した細菌の菌数測定手法の開発について

日本大学大学院 学生員○成田 勝

日本大学工学部 正 員 中村 玄正

日本大学工学部 正 員 松本 順一郎

1. はじめに

窒素除去プロセスに関与する硝化細菌は、そのほとんどが独立栄養型の細菌であるため増殖速度が遅く菌の検出や同定、そして菌数測定には多くの時間が必要とされている。生物処理系における動態解明の観点から本研究においては、遺伝子工学を利用した細菌の菌数測定手法の開発について研究を進めるものである。すなわち細菌の検出方法として種特異的プライマーを用い、PCR法(polymerase chain reaction法)によって比較的増殖速度の早い従属栄養型の硝化細菌である *Arthrobacter globiformis* を検出し、*Arthrobacter globiformis* の種特異的プライマーを確認・判定することを目的として実験研究を進めているものである。

2. 実験方法

(1) 使用菌株

・*Arthrobacter globiformis* IF03062株(従属栄養の硝化細菌)・*Escherichia coli* HB101株

(2) 菌の培養

Arthrobacter globiformis は液体培地20mlを50ml三角フラスコに分注し、白金耳による植菌後、30℃で一晩振とう培養を行った。

Escherichia coli は1*LB液体培地20mlを50ml三角フラスコに分注し、白金耳による植菌後、37℃で一晩振とう培養を行った。

(3) 染色体の調製

培養後それぞれの培養液から1mlずつ1.5ml容エプンフラスコに分注し、それぞれの染色体DNAの調製を行った。

(4) PCR増幅

染色体DNAの調製後、PCR法でDNAを増幅させた。PCR増幅はプライマーとして1*プライマーを使用した場合と特異的プライマーを使用した場合でそれぞれ行った。

・PCRの反応液組成例

1) dd-H ₂ O	29.5 μ l
2) 10*Buffer	5
3) 25mM MgCl ₂	4
4) 1.25mM dNTPs	8
5) Primer 520F (20 μ mol/ μ l)	1
6) Primer 1400R (20 μ mol/ μ l)	1
7) 染色体 ($\approx$ 100ng/ μ l)	1
8) Taq DNA polymerase (5unit/ μ l)	0.5

50 μ l

・PCRの反応液組成例

1) dd-H ₂ O	29.5 μ l
2) 10*Buffer	5
3) 25mM MgCl ₂	4
4) 1.25mM dNTPs	8
5) Primer 特異的210F (20 μ mol/ μ l)	1
6) Primer 1400R (20 μ mol/ μ l)	1
7) 染色体 ($\approx$ 100ng/ μ l)	1
8) Taq DNA polymerase (5unit/ μ l)	0.5

50 μ l

図-1 PCRの反応液組成例(1*プライマー使用) 図-2 PCRの反応液組成例(特異的プライマー使用)

PCRの反応液組成例(ユニバーサルプライマー使用)を図-1に、PCRの反応液組成例(特異的プライマー使用)を図-2に、そしてPCR反応条件を図-3に示す。今回使用した特異的プライマー-210Fは、塩基数20merの長さでそのGC含量は35%、プライマーのアニーリング温度(T_m)は54℃である。しかし、及川ら⁽¹⁾はアニーリング温度65℃で行った場合が増幅効率もよく非特異的バンドが少なく良好な結果が得られたと報告しており、今回のアニーリング温度は図-3に示すように65℃で行った。PCRを行った後のアガロースゲル電気泳動の結果より特異的プライマーによる *Arthrobacter globiformis* の検出を確認し判定する。

・PCR反応条件
変性 94℃ 1min
アニーリング 65℃ 2min
伸長 72℃ 2min
↓
25cycles

図-3 PCR反応条件

3. 実験結果と考察

図-4にユニバーサルプライマーを使用した場合のPCR増幅後の結果を示す。 *Arthrobacter globiformis* と *Escherichia coli* の両方ともバンドが確認されPCRによる増幅が行われた。図-5に *Arthrobacter* 特異的プライマーを使用した場合のPCR増幅後の結果を示す。特異的プライマーを用いたため *Escherichia coli* は増幅されず *Arthrobacter globiformis* のみが増幅されバンドが確認されるはずであったが写真には写ってなかった。現段階においては検出できなかった原因を検討中である。また、(-)DNA コントロールは写っていないことからコンタミネーションはないものと推測される。

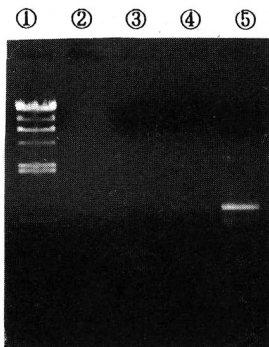


図-4 ユニバーサルプライマーを使用した場合のPCR増幅結果

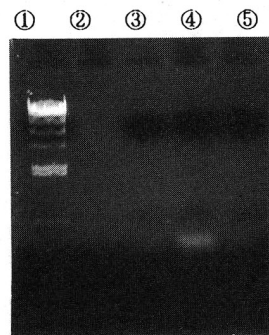


図-5 *Arthrobacter* 特異的プライマーを使用した場合のPCR増幅結果

① λ phage DNA/HindIII
② プライマー
③ DNAなし(-)コントロール
④ *Arthrobacter globiformis* IF03062株 520F-1400R
⑤ *Escherichia coli* HB101株 520F-1400R

① λ phage DNA/HindIII
② プライマー
③ DNAなし(-)コントロール
④ *Arthrobacter globiformis* IF03062株 特異的210F-1400R
⑤ *Escherichia coli* HB101株 特異的210F-1400R

4. おわりに

特異的プライマーを用いての *Arthrobacter globiformis* の検出はできなかった。今後の課題として検出できなかった原因を検討し実験をやり直してみるつもりである。

最後に本研究を進めるにあたり、東北学院大学工学部 大学院生の及川栄作氏に絶大なご協力を得ています。ここに謝意を表します。

<参考文献>

(1) 及川栄作, 大沼孝宏, 清水昭秀, 石橋良信(1994) 16SリボソームRNA塩基配列の比較によるかび臭産生藍藻類の分類, 水道協会誌, 63, PP56-63