

DNA フィンガープリント法による大腸菌汚染源の追跡

八戸高専 正会員 ○ 矢口 淳一 阿 部 悟
小倉 優大 月居 和也
坪田 謙太

1. はじめに

八戸市近郊の蕪島海水浴場や仙台市の水源となっている宮城県の七ヶ宿ダムなど、わが国の水環境においては現在でも糞便に由来する大腸菌（群）による汚染が問題となっている。糞便汚染の原因を解明するためには、糞便性細菌の汚染源を追跡できる手法の開発が強く望まれる。従来、汚染源の追求は周辺水域の大腸菌（群）分布状況等からなされてきたが、大腸菌濃度自体の変動も大きく汚染源の解明に至らないことが多かった。最近アメリカでは糞便性細菌の遺伝子を解析することによって汚染源を追跡する手法が開発され、遺伝子レベルの研究によって大腸菌汚染の原因が解明された事例も報告されている。現在 PCR 法は細菌の遺伝子解析に広く用いられている。なかでも、rep-PCR 法は DNA 中の繰り返し配列を利用した手法で、繰り返し配列の位置によって生じた DNA 断片をアガロース電気泳動で分離することによって同一菌種間の遺伝子構造の解析・比較が可能である。本研究では rep-PCR 法と電気泳動によって得られた DNA フィンガープリント結果を系統解析し、糞便性汚染の指標である大腸菌の汚染追跡手法に適用可能かどうか、蕪島海水浴場およびその周辺から分離された大腸菌を用いて検討した。

2. 実験材料および方法

(1) 実験材料

2006 年から 2007 年にかけて岡山¹⁾によって八戸市蕪島海水浴場およびその周辺から分離培養された糞便性大腸菌群のうち、API20E (BioNumerics 社) 試験で大腸菌と同定された細菌を使用した。これらの大腸菌は、-20℃で凍結保存されている。

(2) 実験方法

図-1 に実験方法の全体概要を示した。まず凍結保存された大腸菌を復元して培養し、菌体内から DNA を抽出した。大腸菌の DNA に rep-PCR 法を適用し、DNA 断片を増幅した後、アガロース電気泳動を行って DNA フィンガープリントを得た。

- ①大腸菌の復元培養 マッコンキー寒天培地（(株) 栄研）を用いて、凍結融解した大腸菌培養液を 20℃で 1 週間以上培養した。増殖した大腸菌をマッコンキー寒天培地に再度画線培養し、20℃で 1 日培養した後、極少量の菌体を 100 μl の超純水に添加した。菌液は-20℃で凍結保存し、rep-PCR 反応を行う直前に凍結融解させることで DNA を抽出した。
- ②rep-PCR 反応 大腸菌の繰り返し配列領域をコードするプライマー(5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3')を用いて Rademaker ら²⁾の方法に従って行った。前熱変性、95℃, 5 分;熱変性、(94℃, 3 秒) + (92℃, 30 秒); アニーリング、40℃, 1 分; 伸張反応、65℃, 8 分を 30 サイクル; 最終伸張反応を 65℃, 8 分行った。
- ③アガロース電気泳動 rep-PCR 反応によって得られた DNA 断片を 0.5×TAE Buffer を用い、1%のアガロースゲルで泳動装置 Sub Cell Model 96(Bio Rad 社)を使用して 4~5 時間電気泳動を行った。電気泳動終了後、アガロースをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下、デジタルカメラを用いて画像データを取り込んだ。電気泳動パターンは、遺伝子解析用ソフト BioNumerics(BioNumerics 社)を用いて解析し、系統樹を作成した。

3. 結果と考察

(1) 大腸菌の復元

蕪島やその周辺海域、ウミネコの糞便等から分離され、凍結、保存された大腸菌を復元して実験に供した。復元培地には、大腸菌の分離に使用した選択培地であるマッコンキー寒天培地を使用した。しかし実験した大腸菌の復

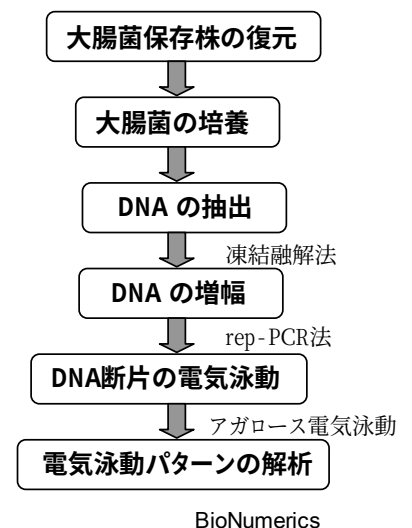


図1 実験方法の概要

