

LED 光源を用いた PMA-PCR 法による生存可能な大腸菌の計数

八戸工業高等専門学校 専攻科 建設環境工学専攻 学生会員 〇類家 渉
八戸工業高等専門学校 建設環境工学科 非会員 大南 楓
非会員 田中 優希
正会員 矢口 淳一

1. はじめに

これまで病原菌やその代替指標の検出は培養によってきたため、生きてはいるが培養できない VBNC(Viable but non-culturable)状態の細菌は不活性とみなされ、河川や海域等の水環境からの感染リスクを過小に評価してきた可能性がある。近年、核酸染色試薬 PMA とリアルタイム PCR(Polymerase chain reaction)を組み合わせた PMA-PCR 法が開発され¹⁾、VBNC 状態を含めた生存可能な細菌のみを計数することが可能となった。サンプルの PMA 処理には従来ハロゲン光源が用いられていたが、サンプルの温度上昇などの問題点があった。そこで本研究では、ハロゲン光源の代わりに LED 光源を使用して PMA 処理を行い、リアルタイム PCR と組み合わせた場合の PMA-PCR 法の最適条件について検討し、LED 光源による PMA-PCR 法の効果を明らかにした。

2. 実験材料および方法

2.1 実験材料

理化学研究所系統施設から大腸菌 *Escherichia coli*(JCM 1649^T)を購入し実験に用いた。全菌数測定に用いる蛍光染色試薬として DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)(和光試薬)、生理的活性のある細菌と死滅した細菌を区別する試薬として核酸染色試薬 PMA(propidium monoazide)(Biotium 社)を使用した。

2.2 実験方法

2.2.1 実験の全体概要

本研究では、検出感度に対する増幅対象塩基長の影響を検討するため、遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係を求め、さらに無処理の大腸菌と熱処理した大腸菌の混合比率を変えて PMA-PCR 法の効果を検証する実験を行った。また最適な LED 光照射時間を決定するため LED 光照射時間実験を行った。

2.2.2 大腸菌の培養

大腸菌を LB 液体培地に植菌し、一晚 37°C で振とう培養した。さらに極少量の培養液を新しい LB 液体培地に添加して数時間培養しそれを実験に使用した。培養液の全菌数はポリカーボネイトフィルター(Advantec 製、孔径 0.2 μ m)にろ過捕集後、蛍光染色試薬 DAPI 溶液で染色し落射蛍光顕微鏡で計数した。大腸菌の不活化は熱処理(80°C, 15 分間)によって行い、LB 寒天培地で 20°C で 1 週間平板培養しコロニーが形成されないことを確認した。

2.2.3 PMA 処理

サンプルを 0.5 μ L の透明なマイクロチューブに準備し、PMA を最終濃度が 100 μ M となるように添加して暗室で 5 分間放置した。さらに同量の PMA を繰り返し添加して 5 分間放置した。その後 LED 光源(タカラバイオ株式会社、LED Crosslinker 12 EM200)を所定の時間照射した。

2.2.4 DNA 抽出

サンプルを 12000rpm で 1 分間遠心後、InstaGene Matrix(Bio-rad 社)を 200 μ L 添加し、Bio-rad 社のプロトコルに従って DNA を抽出した。

2.2.5 リアルタイム PCR

本実験では、大腸菌の選択的検出に使用される β -グルクロニターゼ酵素をコードする *uidA* 遺伝子をターゲットとし、リアルタイム PCR を MiniOpticonTM システム(Bio-rad 社)で行った。リアルタイム PCR 用試薬には、SsoAdvancedTM Universal Probes Supermix(Bio-rad 社)を使用した。プライマー、プローブについては、Frahm&Obst²⁾ が用いた増幅対象塩基長 83bp のプライマーセットに加え、塩基長 126bp、240bp のプライマーセットを Primer3Plus を使用して作成した。それぞれのプライマーセットのアニーリング温度については、MiniOpticonTM システムの温度グラジェント機能により最適な温度を決定した。

キーワード：大腸菌、DNA、PCR、propidium monoazide

連絡先：青森県八戸市大字田面木字上野平 16 番地 1, 八戸工業高等専門学校, 建設環境工学科, 水環境工学研究室

電話番号：0178-27-7305

3. 結果および考察

3.1 遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係

大腸菌培養液から DNA を抽出し、10 倍ずつ段階的に希釈した試料を用いてリアルタイム PCR を行い、大腸菌遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係を求め、図-1 に各塩基長の結果を示した。それぞれの直線の傾きから増幅効率(E)と%効率を求めると、83bp は E=2.069, %効率=106.9%、126bp は E=1.870, %効率=87.0%、240bp は E=1.720, %効率=72.0%という結果が得られた。83bp の塩基長の増幅効率が最も 100%に近い値となったが、他の塩基長と比較してリアルタイム PCR の蛍光強度が著しく低く、PCR サイクルによる DNA の増幅量が少なかった。また、遺伝子 copy 数 10^1 の大腸菌 DNA を検出することができなかった。240bp の DNA 断片は増幅効率が低く、検出限界も 83bp と同じだった。そのため、塩基長 126bp の DNA 断片が大腸菌の検出に適していると考えられる。

3.2 LED 光照射時間

熱処理した大腸菌を PMA 処理し、LED 光を照射して DNA と PMA の結合に必要な照射時間を検討した。図-2 にそれぞれの照射時間における閾値サイクル数を示した。照射時間が増加するにつれ、増幅が検出される閾値サイクル数が増大して、15 分で最大となった。20 分の照射時間でも、ほとんど閾値サイクル数は変化しなかったため、最適な LED 光照射時間は 15 分間と考えられる。以降の実験では照射時間を 15 分間とした。

3.3 検証実験

無処理大腸菌濃度を一定にして、熱処理した大腸菌との混合比率を変化させたサンプルを作成し、LED 光照射による PMA-PCR 法の検出感度について検討した。図-3 に検証実験の結果を示した。3 つの塩基長の DNA 断片いずれについても、無処理大腸菌に対して熱処理した大腸菌を 10 倍混合した場合(1/10 倍)までは無処理大腸菌のみの場合(1/0 倍)とほぼ同等の値を示し、比率 1/100 倍から値が低下し始めている。従って、無処理大腸菌濃度の 10 倍まで熱処理した大腸菌が存在しても PMA の効果があることがわかった。

4. まとめ

大腸菌 *uidA* 遺伝子について、3 種類のプライマーセットの遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係を検討した結果、増幅対象塩基長 126bp のプライマーセットが検出に最も適していた。LED 光源を用いた場合、PMA-

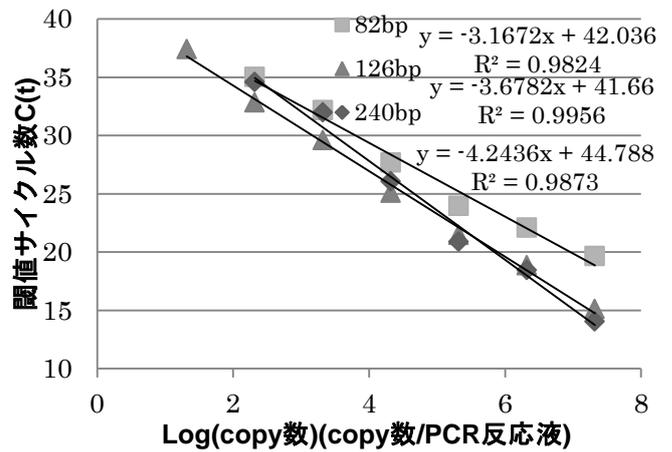


図-1 遺伝子コピー数と閾値サイクル数の関係

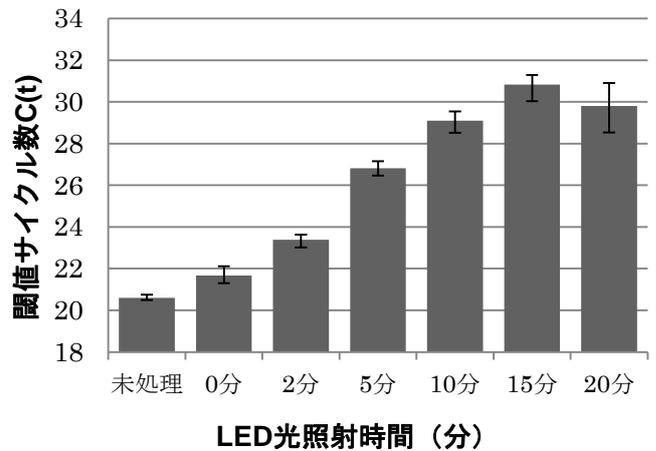


図-2 LED 光照射時間と閾値サイクル数の関係

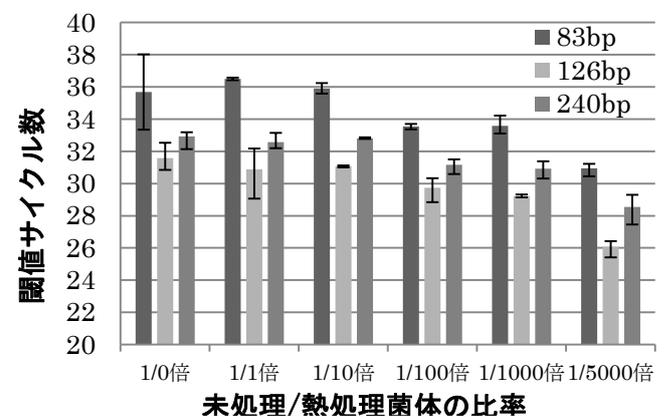


図-3 検証実験結果

PCR 法の最適な LED 光照射時間を検討した結果、照射時間 15 分間が最適であった。この条件を用いて PMA-PCR 法の検出感度を検討し、無処理大腸菌濃度の 10 倍まで熱処理した大腸菌が存在しても PMA の効果があることがわかった。

参考文献

- 1)横町尚亨,矢口淳一(2011)土木学会論文集 G(環境), Vol67,pp.643-650
- 2) Frahm,E. and Obst,U.(2003) *Jurnal of Microbiological Methods*, Vol.52,pp.123-131