

B-48. 超音波破碎・希釈法による DNA 抽出のバイアスの評価

○高梨 正訓*・押木 守・小貫 元治・佐藤 弘泰・味埜 俊

東京大学大学院新領域創成科学研究科社会文化環境学系(〒277-8563 千葉県柏市柏の葉 5-1-5)

* E-mail: takanashi@mw.k.u-tokyo.ac.jp

1. 研究背景

活性汚泥中に存在する微生物を調べる目的で分子生物学的手法が利用される場面が増えている。多くの場合 PCR 反応を行うための鋳型 DNA の調製が分子生物学実験の最初のステップであるが、この作業は意外に面倒である。

近年、佐藤ら¹⁾は PCR の鋳型となる DNA を調製する手法として超音波破碎・希釈法を提案した。この手法は、活性汚泥混合液を超音波破碎および希釈するだけで、PCR 反応用の鋳型 DNA とするものである。この手法は先にあげた問題を軽減する手法として期待できるが、その適用範囲については検討の余地がある。

本研究はを様々な種類の細菌からの超音波破碎法での DNA 抽出効率を評価するとともに、数種の細菌の混合懸濁液を試料として用いて、超音波破碎・希釈法と市販の DNA 抽出キットとの比較を行った。

2. 実験方法

(1) 超音波破碎処理による DNA 回収率の評価

8 種類の細菌(*Delftia acidovorans* (NBRC14950), *Corynebacterium glutamicum* (NBRC12168), *Ochrobactrum anthropi* (NBRC15819), *Brevibacillus brevis* (NBRC100599), *Escherichia coli* (JCM1649), *Ralstonia eutropha* (JCM20644), *Bacillus subtilis* (JCM1465), *Staphylococcus epidermidis* (NBRC12993))を推奨条件で培養した。

これら細菌の系統学的分類については表 1 に示した。培養液 1ml を 15ml のプラスチックチューブへ分注し、ミリ Q 水で 10ml へメスアップした後、超音波破碎処理を行った。Advanced Digital Sonifier 250DA(Branson, Danbury, USA)を用い、マイクロホーンチップを用い 25W で 120 秒間超音波処理した。超音波破碎中 10 秒間隔で試料を採取した。採取した試料は酢酸セルロース製メンブレンフィルター(0.2μm 径, Advantec)で濾過し、濾液中の DNA 濃度を測定した。DNA 濃度の測定には Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit(Invitrogen, USA)を用いた。

表 1 各細菌の DNA 回収率

菌種	門	回収率[%]
<i>O. anthropi</i>	<i>α-proteobacteria</i>	59
<i>D. acidovorans</i>	<i>β-proteobacteria</i>	93
<i>R. eutropha</i>	同上	99
<i>E. coli</i>	<i>γ-proteobacteria</i>	76
<i>C. glutamicum</i>	<i>Actinobacteria</i>	< 10
<i>B. brevis</i>	<i>Firmicutes</i>	96
<i>B. subtilis</i>	同上	70
<i>S. epidermidis</i>	同上	< 10

(2) 細菌混合懸濁液を用いた DNA 抽出法の評価

D. acidovorans, *B. brevis*, *C. glutamicum*, *O. anthropi* を 16S rRNA 遺伝子のコピー数が 1:1:1:1 となるように混合し、超音波破碎・希釈法または FastDNA SPIN Kit for Soil(MP Biomedicals, France)法を用いて DNA を抽出した。超音波破碎処理は前述と同様の条件で行い、試料は 5ml、処理時間は 60 秒とした。超音波処理後の試料をミリ Q 水

で希釈したものを PCR へ供した。FastDNA SPIN Kit for Soil による DNA 抽出は製品添付のマニュアルに従って行った。

PCR は佐藤²⁾に従って行い、プライマーセットとして 357f-1100r(5'末端 FAM 標識)²⁾を用いた。PCR 産物を PCR Purification Kit(QIAGEN)で精製し、制限酵素処理(HpyCH4IV, BioLabs) (37℃, 3 時間, 10U) し、サイズマーカー (GeneScan™500 ROX Size Standard, Applied Biosystems)を添加し、ABI PRISM®310 Genetic analyzer (Applied Biosystems)を用いて T-RFLP 分析を行った。

3. 結果および考察

(1) 超音波破碎処理による DNA 回収率の評価

8 種類の細菌に超音波破碎処理を行い、試料中の DNA 濃度を測定した。図 1 に、*D.acidovorans*に超音波破碎処理を行った際の DNA 濃度の変動を示した。超音波処理を続けるに従って、DNA 濃度が増加し、約 80 秒で一定となった。同様の挙動が他の細菌においても得られた。

図 1 から、単位時間当たりの DNA 濃度の増加量を計算し、図 2 のように図示した。DNA 濃度の増加量は時間の経過とともに小さくなり、約 80 秒で DNA 濃度の増加はゼロとなった。本研究では、この時点で全 DNA が抽出されたと見なした。

そして、60 秒の超音波破碎処理によって回収できた DNA 量(台形 $T_0T_{60}BA$)が全 DNA 量(三角 $T_0T'A$)に占める割合を DNA 回収率と定義し、算出を行った。

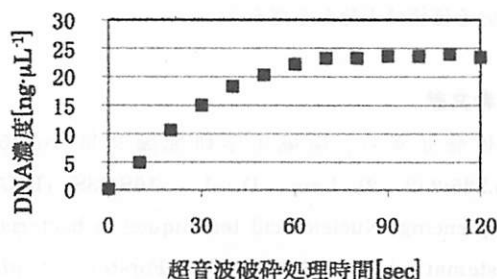


図 1 超音波破碎処理における DNA 濃度

試料: *D. acidovorans*

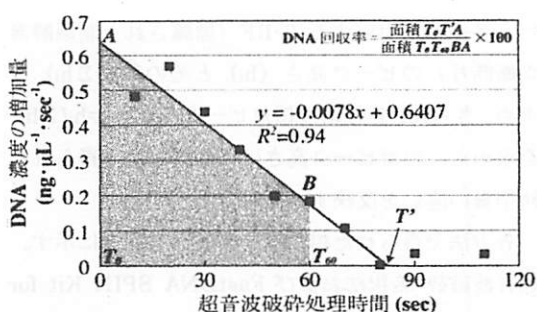


図 2 超音波破碎処理における DNA 濃度増加量

試料: *D. acidovorans*

DNA 回収率を表 1 に示した。概ね全ての細菌から 6 割以上の DNA 回収率が得られたが、*C. glutamicum*, *S.epidermidis* の回収率は 1 割以下だった。

様々な種類の細菌から超音波破碎処理で DNA を抽出できることを確かめるため、8 種類の細菌を用いた検討を行った。一般的に *Actinobacteria* や *Firmicutes* といったグラム陽性細菌は細胞壁が強く、物理的処理によって DNA を抽出することが困難とされている。しかし、表 1 を見るとグラム陰性細菌だけでなく、グラム陽性細菌である *O. anthropi*, *B. brevis* から 6 割, 9 割程度 DNA を抽出することができた。

一方、グラム陽性細菌である *C. glutamicum*, *S.epidermidis* については回収率が顕著に低かった。これは超音波破碎処理で DNA を抽出することが困難な細菌が存在することを示している。このような細菌が活性汚泥中にどの程度存在するか明らかではないが、都市下水処理場の活性汚泥内におけるグラム陽性細菌の存在割合は 5% 以下であったことが報告されている³⁾。超音波破碎処理によって DNA を抽出することが困難な *C. glutamicum*, *S.epidermidis* などのグラム陽性細菌は活性汚泥中でそれほど多く存在していないのかもしれない。

(2) 細菌混合懸濁液を用いた DNA 抽出法の評価

4 種類の細菌を混合した試料から、超音波破碎・希釈法または FastDNA SPIN Kit for Soil 法によって DNA を抽出し、PCR および T-RFLP 解析を行っ

た。各細菌に対応する T-RF (標識された制限酵素切断断片) のピーク高さ (h_i) とその和 (Σh_i) を求め、さらに、各細菌の相対ピーク高さ ($r_i = h_i / \Sigma h_i$) を求めた。相対ピーク高さは、各細菌から得られた鋳型量の違いを反映するはずである。

各方法で得られた相対ピーク高さを図3に示す。超音波破碎・希釈法および FastDNA SPIN Kit for Soil で、4種の細菌全てを検出することができた(断片長は、*C. glutamicum* 87b, *O. anthropi* 525b, *D. acidovorans* 566b, *B. brevis* 425b)。なおいずれの方法でも、*C. glutamicum* と *O. anthropi* の相対ピーク高さは10%前後、*D. acidovorans* と *B. brevis* の相対ピーク高さが30%~50%であった。

なお、これら細菌は16S rRNA 遺伝子のコピー数が1:1:1:1となるように混合したのであるが、いずれのDNA抽出法でも相対ピーク高さの比は1:1:1:1からは離れてしまった。その原因は三つ考えられる。即ち(a)ピーク高さの比が必ずしも鋳型量を反映しないこと(電気泳動の特性として小さな断片ほどシャープで高いピークとなる)、(b)それぞれの細菌の持つ16SrRNA 遺伝子のコピー数が、実際とデータベース上で見つかるものでは異なっていた可能性、そして、(c)各DNA抽出法の抽出特性の違いである。

C. glutamicum および *O. anthropi* の相対ピーク高さが他の二種よりも小さくなった原因について考える。*C. glutamicum* については断片長が他より短い。また、*O. anthropi* の断片長は、*D. acidovorans* よりやや短く *B. brevis* よりやや長い、ほぼ同程度の断片長である。(a)を考慮すると、*C. glutamicum* の相対ピーク高さは他よりも大きく、また、*O. anthropi* の相対ピーク高さは残り二種と同程度になると予想できる。しかし、*C. glutamicum* と *O. anthropi* の相対ピーク高さは他の二種よりも小さくなった。表1に示した超音波破碎処理でのDNA回収率試験の結果では、他の二種では回収率90%以上であるのに対して、*O. anthropi* は59%、*C. glutamicum* は10%未満であった。このことから、超音波破碎・希釈法については、DNAの抽出効率が低いことが、これらの二種の相対ピーク高さが他

の二種よりも小さくなることにつながったと考えられる。また、FastDNA SPIN Kit for Soil 法でも超音波破碎・希釈法とほぼ同様の結果であったことから、いずれの方法も *C. glutamicum* および *O. anthropi* のDNA抽出の効率はほぼ同程度、あるいは、*O. anthropi* については超音波破碎・希釈法の方がむしろよいのではないかと考えられる。

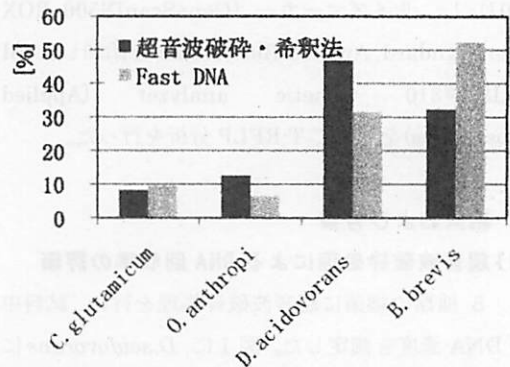


図3 各DNA抽出法での相対ピーク高さの比較

4. まとめ

超音波破碎・希釈法では一部の細菌種についてはDNAの抽出効率が低くなるものの、FastDNA SPIN Kit for Soil 法と比べて明らかに劣る点は今回の検討では見つからなかった。超音波破碎・希釈法ではPCRの鋳型DNAを数分で調製することで、従来PCRの鋳型を調製するために費やされていた時間および労力を大きく削減することができる。超音波破碎・希釈法を従来のDNA抽出法の代わりに用いる価値は十分あるだろう。

参考文献

- 1) 佐藤弘泰ら, 環境工学研究論文集 vol.45: pp.225-232.
- 2) Lane, D. J, 16S/23S rRNA Sequencing, Nucleic acid techniques in bacterial systematics, pp.115-175.
- 3) S. Forster. et al., Appl. Environ. Microbiol., vol.68(10): pp.4772-4779