

DYNABEADS LETTERS



Dynabeads® DNA DIRECT™ キットを用いた細菌の染色体DNA抽出への応用

長野県飯田食肉衛生検査所
吉田 徹也

1. 目的

細菌の染色体DNAを抽出・回収するためには、まず細菌の細胞壁の破壊を行った後、フェノールなどでDNAを抽出し、塩析およびエタノール沈澱でDNAの回収を行うのが一般的な方法といえる。グラム陽性菌と陰性菌の細胞壁を比較した場合、通常グラム陽性菌の方が強固で、それを破壊するためにはアクロモペプチダーゼなどの溶菌酵素を用いたり、超音波破碎といった物理的方法などを行う必要がある。ここでは、本来血液、骨髄細胞や培養細胞などの動物細胞の染色体DNAを回収するため開発されたDynabeads® DNA DIRECT™ キット (DDD) を応用し、細菌の染色体DNAをいかにして抽出するかを紹介する。

2. 原理

Dynabeads® DNA DIRECT™ は、細胞の染色体DNAと結合する物質がコートされた磁気ビーズであり、その磁気ビーズは、細胞溶解溶液 (DB溶解緩衝液) 中に浮遊している。これにより細胞の破壊とDynabeads® DNA DIRECT™ によるDNAの抽出を同時に行うことができる。そして、DDD によって抽出されたDNAの回収・精製は、磁石を用い磁気ビーズを回収することで非常に簡易にでき、これがDDDの大きな特徴ともいえる。

3. 材料および方法

DDD

今回使用したDDDキットの操作手順を図1に示した。最終的に回収したDNAは、40 μ lのTEバッファーに浮遊し、その一部をテンプレートDNAとして用いた。

被検菌株

- 1) 当食肉衛生検査所で豚の関節滑膜絨毛から分離した豚丹毒菌 (IEr-1株)
- 2) 長野県衛生公害研究所から分与されたVTEC (Vero細胞毒素産生性大腸菌、MVT-1株)
- 3) 長野県飯田保健所から分与された赤痢菌 (*S.sonnei* 相、Ss1株)

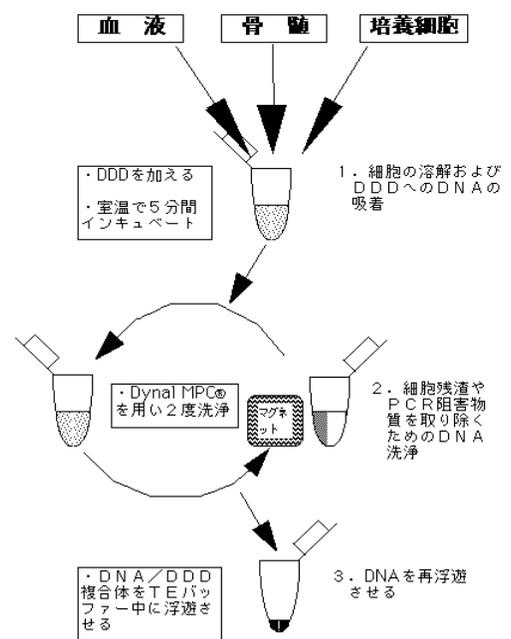


図1 DDDキットの操作手順

DDDによるDNA回収試験方法

1) DDD溶解緩衝液による溶菌時間の検討

1 μ lのディスポザブルエーゼでおおよそ1/3量を検体とし、DDDを用い溶菌時間以外マニュアルどおりDNAの回収を行った。溶菌時間は、5(マニュアル記載時間)、10、20、30および60分とした。

2) DDDの感度試験被検菌株をMcFarlandNo. 3程度に調整後、連続希釈した。その連続希釈液各々10 μ lをサンプルとして用い、DDDによりDNAの回収を行い、PCR反応のテンプレートDNAとした。

また、菌量の測定は連続希釈液10 μ lを適当な寒天平板培地に塗抹し行った。

DDDによるDNA回収の評価試験方法

DDDによるDNAの回収の有無は、PCR法を用い評価を行った。すなわち、DDDを用い回収したDNAをテンプレートDNAとし、以下に示す条件等でPCR反応を行い、予想されるPCR産物が増幅されたかどうかをアガロースゲル電気泳動法で確認した。Taqポリメラーゼを含むPCR試薬およびサーマルサイクラーは、宝酒造のTakara TaqおよびTakara PCR Thermal Cycler(TP-2000)を用いた。今回のPCR反応は、すべて25 μ l系で行った。

1) 豚丹毒菌のPCR法

PCR法で用いた諸条件およびプライマーは、上田ら¹⁾および Makinoら²⁾が報告した方法に準じた。DDDを用い回収したDNAを1回のPCR反応に、テンプレートDNAとして2.5 μ l使用した。

2) VTECおよび赤痢菌のPCR法

PCR法で用いた諸条件および混合プライマー(ECヌクレオチドミックス、日本商事株)は、伊藤ら³⁾が報告した方法に準じた。

DDDを用い回収したDNAを1回のPCR反応に、テンプレートDNAとして5 μ l使用した。

4. 成績

DB溶解緩衝液による溶菌時間の検討

1) 豚丹毒菌(IEr-1株)

溶菌時間が5分の時はPCR反応による増幅DNAが認められなかったが、10~60分では同様のバンドが得られた(図2)。

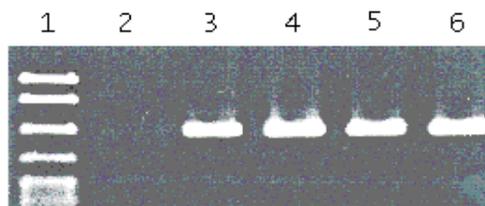


図2. IEr-1株を用いた溶菌時間の比較
Lane 1, サイズマーカー(pBR322/Mspl);
Lane 2-5, 溶菌時間5, 10, 20, 30および60分

2) VTEC(MVT-1株)

溶菌時間が20ないし30分の時PCR反応による増幅DNAが最も良く認められ、5分では弱いバンドが認められた。10および60分では全く増幅DNAは認められなかった(図3)。

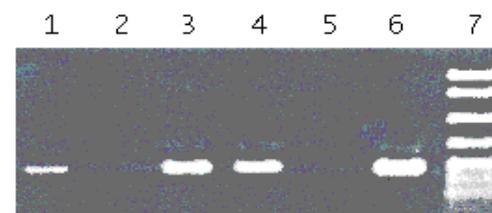


図3. MVT-1株を用いた溶菌時間の検討
Lane 1-5, 溶菌時間5, 10, 20, 30および60分; Lane 6, 陽性コントロール; Lane 7, サイズマーカー(pBR322/Mspl)

3) 赤痢菌(Ss1株)

赤痢菌の場合は、再現性に乏しく全くPCR反応によるDNAの増幅が認められないこともあった。

DDDの感度試験

1) 豚丹毒(IEr-1株)

溶菌時間を10、20および30分に設定し、検出感度試験を行った。溶菌時間10分の場合の結果を図4に示した。検出感度の限界は、 10^2 cfuオーダー(1回のPCR反応に用いたテンプレートDNA中)であった。データは示していないが溶菌時間20および30分の場合も同様の結果であった。

2) VTEC (MVT-1株)

溶菌時間を20分に設定し、検出感度試験を実施した(図5)。検出感度の限界は 10^4 cfuオーダー(1回のPCR反応に用いたテンプレートDNA中)であった。

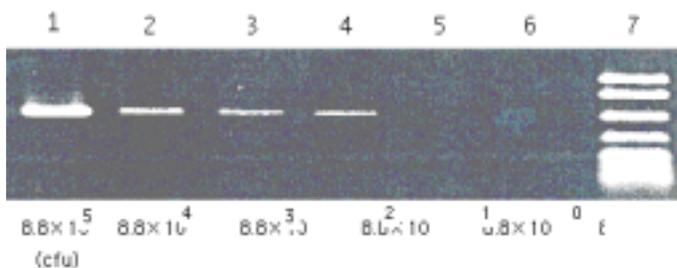


図4. IEr-1株を用いた検出感度試験
Lane 1 - 6, 溶菌時間10分の場合の感度試験結果で、下欄はPCR1回あたりの被検菌量(理論値)を示す; Lane 7, サイズマーカー(pBR322/MspI)

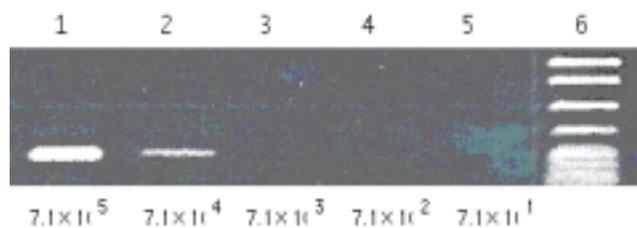


図5. MVT-1株を用いた検出感度試験
Lane 1 - 5, 溶菌時間20分の場合の感度試験結果で、下欄はPCR1回あたりの被検菌量(理論値)を示す; Lane 6, サイズマーカー(pBR322/MspI)

5. 考 察

今回、DDDを用い細菌のDNAを抽出・回収可能かを、豚丹毒菌、VTECおよび赤痢菌を被検菌とし行ったところ、以下のことが示唆された。

- 1) DB溶解緩衝液による溶菌時間は、豚丹毒菌では10~60分、VTECでは20~30分の時にPCR反応による増幅DNAが認められたことから、マニュアルでは5分以上とされているが、20ないし30分間が望ましい。
- 2) 検出感度試験の結果から、DDDを用いPCR反应用テンプレートDNAを調整する場合、実用的には 10^5 ないし 10^6 cfu程度の菌量が必要と考えられた。なお、豚丹毒菌の方がVTECよりも検出感度が高いのは、豚丹毒菌同定用のプライマーが16SリボゾームRNA遺伝子をターゲットとして設計されていたことが、一つの要因と推察された。
- 3) 赤痢菌の場合、DDDによるDNAの回収が非常に不安定であったことは、本キットが染色体DNAの回収のみを目的として開発されたことに起因するのかもしれない。つまり、今回赤痢菌の同定用として使用したプライマーは、プラスミド上のinvE遺伝子をターゲットとしていたことから、なにかの要因でプラスミドが回収されたりされなかったり起きたのではないかと考えられた。

以上のことを、まとめるとDDDは細菌の染色体DNAについても、動物細胞同様に、溶菌時間を20分程度に長くすることで回収可能であると思われた。PCR反応における検出感度の点では、実用的には 10^5 ないし 10^6 cfu程度の菌量が必要であると示唆されたことから、分離菌株や増菌培養液を用いれば十分検査に応用可能であると考えられた。さらに、DDDは、他の多くのDNA抽出・回収方法のようにフェノールなどの毒性溶媒、取扱の面倒な酵素や微量高速遠心機などの機器も使用しないこと、操作はすべて室温で行うこと、迅速および簡便性などからも、一般の検査室で利用可能だと思われた。

参考文献

- 1) 上田竜生 ほか : 平成6年度長崎県獣医学雑誌, 第6号 : 33-35 (1994).
- 2) Makino, S. et al : J. Clin. Microbiol., 32, 1526-1531 (1994).
- 3) 伊藤健一郎ほか : 臨床と微生物, Vol.19 : 161-165 (1992).

発行元

 **日本タイナル**
株式会社

お問合せは

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL(03)5593-3211(代) FAX(03)5593-3216