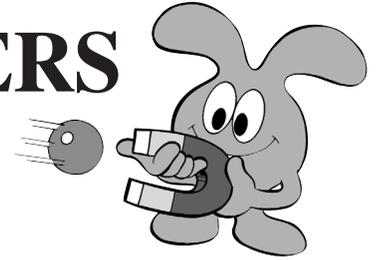


DYNABEADS LETTERS



Dynabeads® M-280 Streptavidinを用いた大腸菌群16S rRNA遺伝子のシーケンス

株式会社 紀文食品 研究開発室

飯田 一雄

1. はじめに

近年分子生物学的手法を用いて臨床検体中および食品サンプル中の細菌を迅速且つ正確に検出するというニーズが高まってきている。そのため、菌種特異的なDNAプローブやPCRプライマーが盛んに開発されてきており利用されている。これらのDNAプローブやPCRプライマー開発には前提となる塩基配列データが必要とされ、PCRと自動DNAシーケンサーを用いたダイレクトシーケンスは短時間で塩基配列が解析できるため、効率よくデータが得られるようになってきた。しかし、自動DNAシーケンサーを用いる場合2本鎖のPCR産物では1本鎖に比べバックグラウンドが高くなる傾向にありミスリーディングを生じることがある。そこで、Dynabeads M-280 Streptavidinを用いた1本鎖PCR産物の塩基配列について報告する。

2. 菌と材料

1)大腸菌群(食品微生物学的に分類されている菌)

Aeromonas hydrophila	Buttiauxella agrestis	Cedecea davisea
Cedecea lapagie	Citrobacter freundii	Citrobacter amalonaticus
Enterobacter cloacae	Enterobacter aerogenes	Enterobacter gergoviae
Enterobacter amnigenus	Enterobacter intermedium	Escherichia coli
Escherichia vulneris	Ewingella americana	Klebsiella pneumoniae
Klebsiella oxytoca	Klebsiella terrigena	Klebsiella ozaenae
Kluyvera ascorbate	Kluyvera cryocrecens	Leclercia adecarboxylata
Pantoea agglomerans	Rahnella aquatilis	Salmonella arizonae
Serratia marcescens	Serratia liquefaciens	Serratia plymuthica
Serratia rubidaea	Serratia odorifera	Serratia fonticola
Yersinia frederiksenii	Yersinia intermedia	

2)PCRプライマー(図1, プライマーセットの例を示す、塩基配列を解析したい領域に合わせ組み合わせている。相補鎖を解析したい場合はuniversal primerとBiotinをforwardとreverseに付けて1本鎖の鋳型を得るその他のプライマーは文献1参照)

3)VENT DNA polymerase(New England Biolabs.3'exonuclease+)

4)PCR buffer(Vent DNA polymerase に添付)

5)dNTP(TOYOBO NTP-101)

6)RNase(TAKARA 2150A)

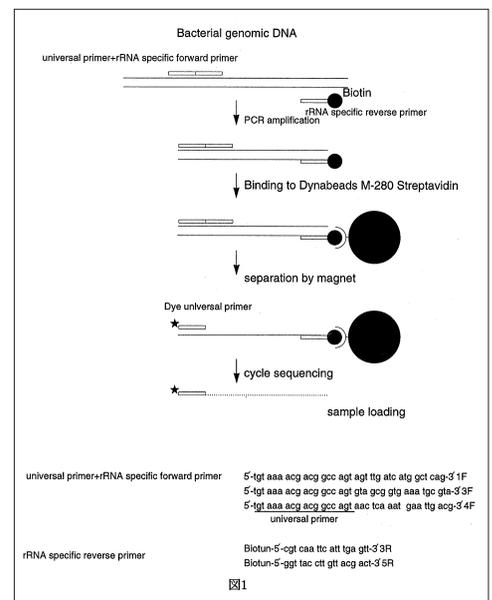
7)Dynabeads M-280 Streptavidin

8)B & W buffer

9)NaOH

10)滅菌水

11)自動DNAシーケンサー用 Dynabeads primerキット



3. 解析方法

- 1) 大腸菌群の生育したコロニーより1楊子相当の菌を拾い200 µlの滅菌水に懸濁する。
- 2) 5分間煮沸後上清を用い上記PCRプライマーとともに反応を行う。

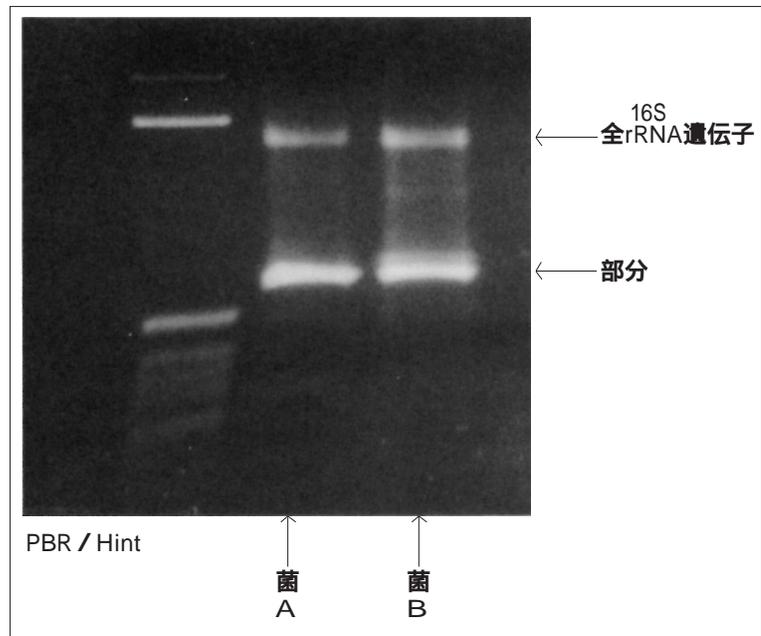
反応組成

菌の上清 36 µl
20 µM PCRプライマー forward 1 µl
reverse 1 µl
PCR buffer 5 µl
VENT DNA polymerase (2000U/ml) 1 µl
2.5mM dNTP 5 µl
RNase (10 µg/ml) 1 µl

PCRプログラム

9 4	1分	5 4	1分	7 2	1分	1 サイクル
9 4	30秒	5 4	30秒	7 2	1分	29 サイクル
7 2	2分					1 サイクル

- 3) 増幅の確認は電気泳動で行い、非特異的増幅がないことを確認し精製を行う。



- 4) PCRプライマーの片側の5'末端にbiotinを付けたPCR産物を電気泳動の残り分(約40 µl)準備する。
- 5) Dynabeads M-280 Streptavidin 20 µlをB & W buffer 100 µlで2回洗浄し40 µlのB & W bufferで懸濁する。
- 6) PCR産物とダイナビーズを室温で15分間保温、ときどき軽く攪拌する。
- 7) 40 µlのB & W bufferで2回洗浄する。上清を除く。
- 8) 10 µlの0.1N NaOHを加え室温で10分保温する。ときどき軽く攪拌する。
- 9) 分離操作
上清は棄てないで保管、沈澱に0.1N NaOH 50 µlを加え洗浄、B & W bufferを40 µl加え3回洗浄、TE buffer 30 µl(滅菌水30 µl)で洗浄、再びTE buffer 30 µl(滅菌水30 µl)に懸濁しマイナス20 で保管する。
- 10) ダイプライマーサイクルシーケンス
各DNAサンプルに対して自動DNAシーケンサー用dye primerキットで反応液を作製する。
私たちはアプライドバイオシステムズ社のキットを用いており、キットに用いるテンプレート濃度は30 µl分の6 µlを経験的に使用している。

11) mineralオイルを1滴加える。

12) PCR反応プログラム

95	1分				1サイクル	
95	30秒	55	30秒	70	1分	15サイクル
95	30秒	70	30秒			15サイクル

13) ダイプライマー反応後mineralオイルに注意し各反応液をミックスし30 µlにする。

14) サンプル濃縮のためエタノール沈澱を行い洗浄する。

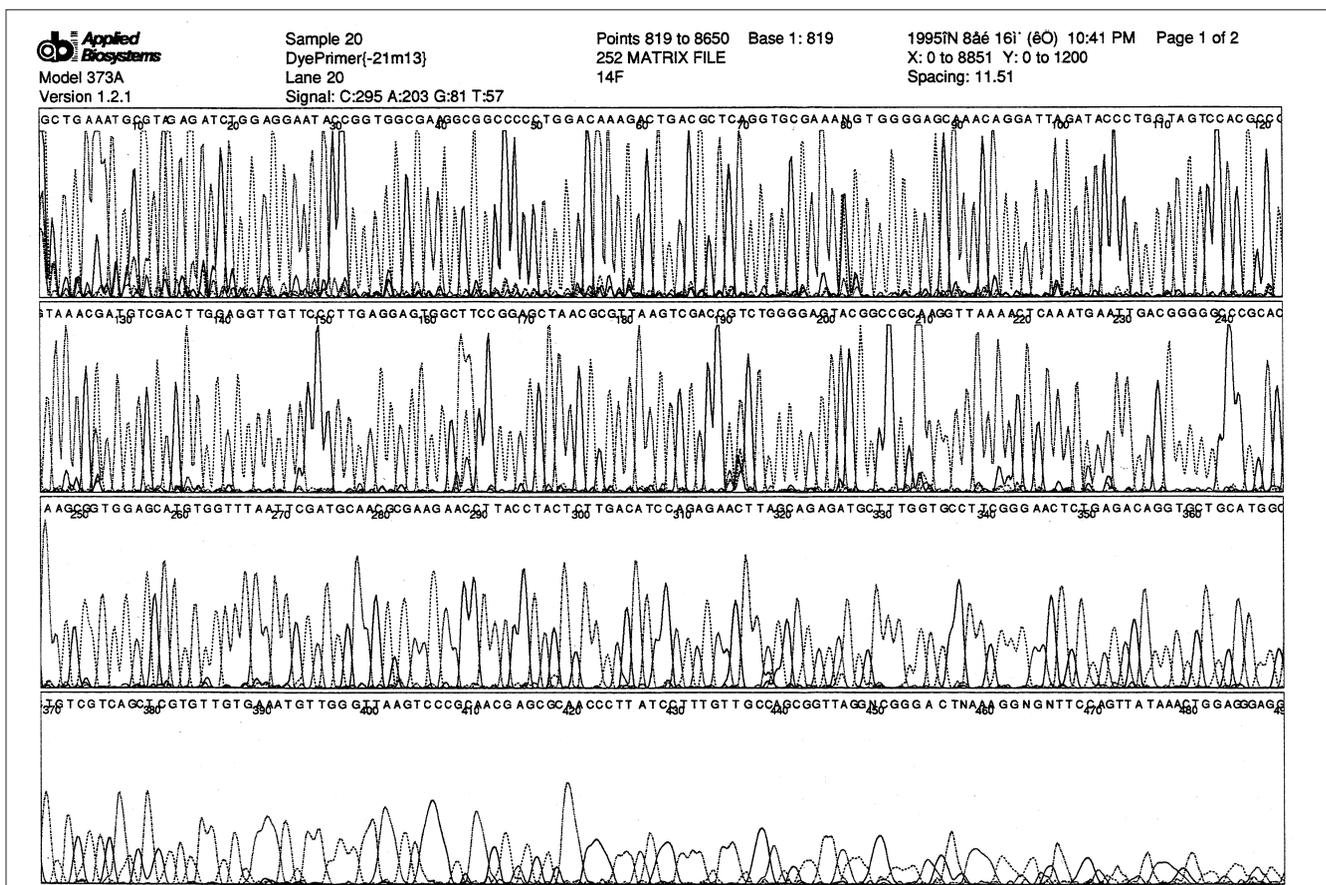
15) 3分弱ドライアップする。

16) ドライアップサンプルに脱イオンフォルムアミド / 50mM EDTA (5:1)を4または6 µlで懸濁し, 95 2分間熱変性を行い, 氷中保管する。
サンプルアプライ。

4. 結果

約600塩基のサンプルに対してテンプレートの高次構造が影響されなければ350塩基以上の解析が可能であった。16S rRNA遺伝子のフラグメントでは高次構造の影響が出やすくサンプルによってはストップピークが多くなることがあるがプライマーの変更等で大部分解消できた。

Dye Terminator法で解析する場合、Dye Primer 法に比較して伸長は低いことと蛍光強度が低下するため不確定塩基として認識されやすい。よって、より解析回数を増やさなければならず効率が悪かった。そこでDye Primer 法で解析できるようにPCR primerを2つ並べることによりシーケンス解析に標準なDye Primer 法キットが利用できるようにした。



参考文献 (上記の方法を併用し解析を行ったサルモネラ特異的のプロープによる検出について)

- 1) Iida, K., Abe, A., Matui, H., Danbara, H., Wakayama, S and Kawahara, K.: Rapid and sensitive method for detection of Salmonella strains using a combination of polymerase chain reaction and reverse dot-blot hybridization FEMS microbiology letter., 114: 167 ~ 172, 1993
- 2) 飯田一雄、檀原宏文: 非放射性DNAプローブを用いるサルモネラの検出法。感染症—遺伝子診断と分子疫学、日本臨床 特別号、P373 ~ 377、日本臨床社、大阪、1992.
- 3) 飯田一雄: 臨床DNA診断法、P1023 ~ 1024、金原出版、1995.

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) 3593-3211 [代] FAX(03) 3593-3216