

C104

環境試料中の特定遺伝子の検出手法

(静大工)○(学)村埜 京一・(正)松田 智*

1. 緒言

土壌、生ゴミ処理残渣などの環境試料中には雑多な化学物質や微生物群が混在している。その中で機能している遺伝子を検出する方法として、mRNA を回収して逆転写し、得られた cDNA を PCR 増殖する手法(Reverse Transcription-PCR)の利用が考えられる。しかし、雑多な不純物を含む系への適用例の報告はまだない。本研究の目的は、環境試料に対する RT-PCR の適用可能性を検討し、環境試料中の特定遺伝子を検出することである。本研究では環境試料の一環として当研究室で開発した生ゴミ処理装置に RT-PCR を適用することを目指した。今回は生ゴミ処理内残渣中の微生物群に適用する前段階として行った環境試料のモデル系における実験結果を報告する。

2. 研究概要

本研究では、遺伝子組換え大腸菌を腐葉土などの菌床に投入したモデル系において特定遺伝子が検出できるか検討した。RT-PCR を用いた研究例の多くが純粋培養系であり、当研究室においても純粋培養系では良好な結果が得られている。しかし、純粋培養系で用いられている手法をそのまま環境系に適用することは困しい。土壌、特に腐葉土には微生物の代謝産物である腐植酸が多く含まれており、腐植酸は多くの酵素反応を阻害することが知られている。モデル系において従来の RT-PCR では特定遺伝子を検出できなかったことから、腐植酸が実験結果に影響する可能性が示唆された。そこで、RNA 抽出時に腐植酸の混入を防ぐことで、RT-PCR を効果的に行えるのではないかと考えた。実験操作の手順を Fig.1 に示す。

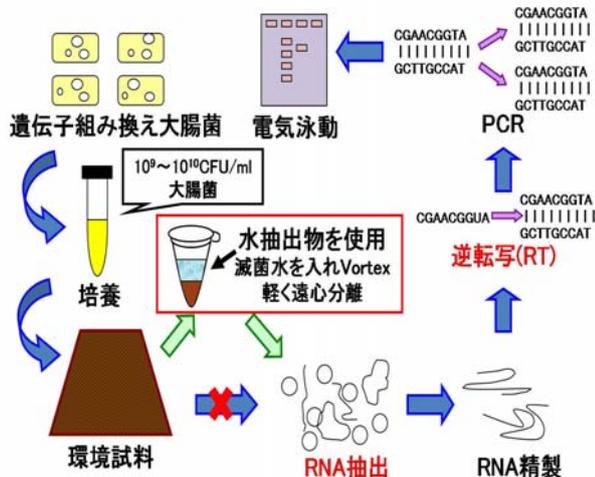


Fig.1 環境試料に適応した RT-PCR の手順

3. 実験

3.1 モデル系における菌体回収操作の有効性

モデル系の土壌に滅菌水を加え、菌体を上澄み液として予め回収する(水抽出)。上澄み液の RNA 抽出により問題が解決できないか実験を行った。

3.2 モデル系における特定遺伝子の検出感度

菌体回収操作を行った場合、どの程度の菌体密度まで特定遺伝子を検出できるか検討した。操作条件は Table1 の通りである。

Table1 操作条件

サンプル	①	②	③	④	⑤
菌体密度	N	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³

N : Negative Control

4. 結果と考察

モデル系における菌体回収操作の有効性の実験結果を Fig.2 に示す。従来法では RNA 抽出物が茶色に濁っていたが、水抽出法の活用により濁りを低減できた。また菌体も十分に回収でき、特定遺伝子の検出が可能になった。次にモデル系における特定遺伝子の検出感度の検証結果を Fig.3 に示す。サンプル④の菌体密度 10⁻² まで特定遺伝子を検出できた。しかし、現段階ではまだ再現性が悪く、菌体密度が高くないと検出できないので、阻害要因の解明と対策に呈しての研究を進めたい。



Fig.2 モデル系からの特定遺伝子検出

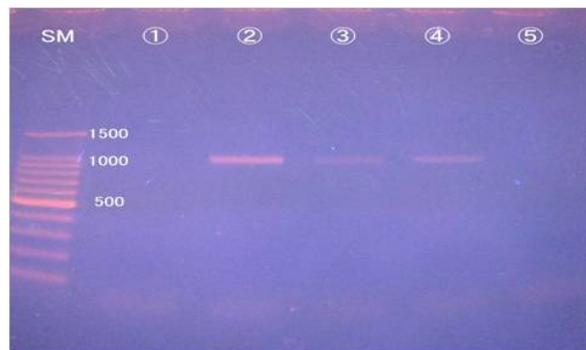


Fig.3 モデル系における特定遺伝子の検出感度

* tcsmats@ipc.shizuoka.ac.jp