

3.7 微生物学の基本操作

3.7.1 手指の消毒

操 作

LB 平板培地を一班につき一枚配布する。予めシャーレの裏の中央にマジックインキで線を引いておく。クリーンベンチ内でシャーレのフタを開け、寒天培地の上半分に消毒前の指を押しつける。

オスバン液で手指をよく洗う。オスバン液中でタワシでこするようにして洗い流した後、70%エチルアルコールで手指をリンスして風乾し、そのままクリーンベンチ内で寒天培地の下半分に指を押しつける。自分の指を押しつけた場所がわかるようにイニシャル等を書いておく。またシャーレには班番号を書いておく。30℃で培養する。

観察と設問

寒天培地上に生育した微生物のコロニーを観察しなさい。レモン色～黄色のコロニーがあれば、それはヒトの皮膚における常在菌で、しばしば食中毒や傷口の化膿の原因菌ともなる黄色ブドウ球菌の可能性がある。

3.7.2 空中落下細菌の採取と計数

操 作

LB 平板培地を一班につき一枚配布する。採取場所にシャーレを置き、5 分間フタを開け、培地を露出させる。班ごとに違う場所を選ぶ。できるだけ落下菌数の多そうな場所を選ぶ。空気の流れのある場所、栄養のある場所、工事現場等には比較的多い。また、シャーレを置いた位置とその環境なども記録する。孵卵器にて 37℃で 24～48 時間培養する。

観察と設問

培養後、コロニーを数え、シャーレ1枚当たり、5分間あたりの落下菌数を比較する。また何種類のコロニーがあるかも観察する。結果を班ごとに集計するので、他の班の結果も交えて考察すること。衛生試験法(日本薬学会;1973)の落下菌数(5分間)の判定基準はつぎのとおり。

A	快適または清浄階級	30 以下
B	目標階級	31～74
B	許容階級	75～150
C	許容最低限度	151～299
C	不適階級	300 以上

3.8 植菌操作および微生物からの核酸の調製

実験材料

培地	Bacto-peptone yeast extract NaCl
各種水溶液	TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 10% SDS 溶液 5 M NaCl 溶液 10% CTAB 溶液 (10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 0.7 M NaCl) 1 M MgCl ₂ 溶液 3 M CH ₃ COONa (NaOAc) 溶液 (pH 5.2)
有機溶媒	2-propanol chloroform/isoamyl alcohol (24:1)
酵素溶液	proteinase K 溶液 (20 mg/ml) DNase I 溶液 (10 mg/ml)
大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	
蒸留水	

操 作

200 ml のヒダ付きフラスコに Bacto-peptone 0.5 g, yeast extract 0.5 g, NaCl 0.25 g を入れ水 50 ml に溶かし、シリコ栓でふたをした後、加圧蒸気滅菌 (121°C, 20 min) する。滅菌後、培地に大腸菌を植菌 (この操作は安全キャビネット中で行う) し、37°C で一晚振とう培養する (120 往復/分)。

生育した菌を含む培養液 40 ml を遠心分離用チューブに移し 6,000 x g, 10 min 遠心分離を行い沈殿した菌を回収する (上清はもとのヒダ付きフラスコに捨てる)。菌体に TE 溶液を 9.5 ml 加え懸濁する。ここに 10% SDS 溶液 0.5 ml, proteinase K 溶液 50 μ l を加え 37 °C, 30 min 反応させる。反応後、5 M NaCl 1.8 ml と、65°C に予温しておいた 10% CTAB 溶液 1.5 ml を加え攪拌する。攪拌後、65°C で 20 min 加温する。溶液が冷める前に、chloroform/isoamyl alcohol を 13.3 ml 加え攪拌し、遠心分離 (6000 x g, 10 min, 室温) を行い、水層 (上層) を口の広いピペットで 3 ml ずつ 2 本のプラスチックチューブ (15 ml 容) に移す。移した水溶液に 2-propanol を 2 ml 加えよく観察しながら混合する。白い糸状の固まりが見えるのでこれをガラス棒ですくい上げ 2 本の別のマイクロチューブに移す。これが核酸 (DNA) である。ここにそれぞれ TE 溶液を 1 ml 加え溶かす。溶けるのに時間がかかるのでこのまま一晚放置する。

両方の試験管に 1 M MgCl₂ 5 μ l を加え攪拌し、さらに一方のみに DNaseI 溶液 50 μ l を加え 37°C, 10 min 反応を行う。3 M NaOAc 溶液 0.1 ml, 2-propanol 0.7 ml を加え様子を見る。

設 問

- (1) 各実験操作, 反応は何のために行ったのか, また, 実際その操作によりどのような現象が観察されたかを示せ.
- (2) 微生物の分類法を示し, 大腸菌はどのように分類されるかを示せ.
- (3) DNA の構造を示しその役割について述べよ.

3.9 PCR による遺伝子の増幅

3.9.1 ホスファターゼ遺伝子の増幅とその解析

装 置

PCR 装置

試 薬

10 x PCR 溶液 100 mM Tris-HCl (pH 8.3)
 500 mM KCl

25 mM MgCl₂ 溶液

dNTP 溶液 2.5 mM dATP
 2.5 mM dGTP
 2.5 mM dTTP
 2.5 mM dCTP

Primer 1 10 pmol/μl 5'-ttgtcacggccgagacttatag-3'
Primer 2 10 pmol/μl 5'-ttatttcagccccagagcggc-3'

Taq DNA Polymerase 2.5 U/μl
滅菌蒸留水

電気泳動用緩衝液 (1 x TAE) 40 mM Tris-acetate (pH 8.0), 1 mM EDTA

λ *Hind*III 溶液

0.8%アガロースゲル

泳動用色素 (ブロムフェノールブルー, グリセロール)

操 作

以下に示した組成の PCR 反応溶液を, 一番小さいチューブ (0.2 ml) に調製する. この際, 鋳型として用いる DNA は先日取った DNA 溶液の一部を滅菌蒸留水で 50 倍希釈して用いる. PCR 反応溶液を調製後, 軽く攪拌し微量遠心機にかけ溶液を底に落とす. 調製したサンプルのうち 35 μl を別のチューブに移して実験担当教官に渡す. 実験担当教官は以下の条件で PCR 反応を行う. 残り 15 μl はそのまま保存しておく.

PCR 反応溶液の組成:

鋳型 DNA 溶液	1 μ l
Primer 1	5 μ l
Primer 2	5 μ l
10 x PCR 溶液	5 μ l
dNTP 溶液	4 μ l
Taq DNA Polymerase	1 μ l
MgCl ₂ 溶液	3 μ l
滅菌蒸留水	26 μ l

PCR反応条件: (94℃, 15 秒; 60℃, 15 秒; 72℃, 30 秒) × 30 サイクル

泳動槽にアガロースゲルをセットする. 反応後の溶液およびPCR反応前に分取しておいた反応溶液を, 10 μ l ずつパラフィルム上にとり, それぞれ 2 μ l の泳動用色素と混合する. これらのサンプル各 10 μ l と λ HindIII 溶液 10 μ l を以下の順序でゲルのウェルに注意深く注ぐ. 注入後泳動層のフタを 閉め 100 V で 20 min 泳動する(注: 本操作では, 次項のサンプルもあわせて行う).

レーン1, λ HindIII

レーン2, PCR 反応後サンプル

レーン3, PCR 反応前サンプル

泳動後, ゲルを落とさないようにしながらトランスイルミネーター上に置き, ゲルの写真を撮影する. この際, 紫外線ランプをあまり見ないように注意する.

設 問

ゲル中の DNA の移動度と重合度は片対数プロットすると直線にのることが知られている. そこで, 各レーンに観測されるバンドの位置を確認し, λ HindIII の各バンド (23,130 bp, 9,416 bp, 6,557 bp, 4,361 bp, 2,322 bp, 2,027 bp, 564 bp, 125 bp) の移動度と片対数グラフを書いて比較することで, 今回 PCR で増幅した DNA の重合度を求めよ. なお, バンド幅が無視できないときにはウェルに近い方のへりで泳動距離を求める.

3.9.2 PCR 法を用いた微生物検出

PCR 法は、病原微生物の検出などにも用いられている。これは PCR により目的の細菌に特有な遺伝子の特異的に増幅できることに基づいている。これと全く同じ手法で、3つのサンプルの中から大腸菌を含むものがどれかを決定してもらう。この場合、目的遺伝子はホスファターゼ遺伝子とする。初めにサンプル、つまり、鋳型 DNA を除いた反応溶液を調製する。

PCR 反応溶液の組成：

Primer 1	7 μ l
Primer 2	7 μ l
10 x PCR 溶液	7 μ l
dNTP 溶液	5.6 μ l
Taq DNA Polymerase	1.4 μ l
MgCl ₂ 溶液	4.2 μ l
滅菌蒸留水	34.3 μ l

ピペットマンにより十分混合した後、本溶液を 19 μ l ずつ 3 本のチューブに分注する。それぞれのチューブに各サンプルを 1 μ l ずつ加えた後、軽く攪拌し微量遠心機にかけ溶液を底に落とす。PCR は前項と同条件で行う。

アガロース電気泳動は、前項のサンプルと同時に進行。反応後の溶液 10 μ l ずつをパラフィルム上にとり、2 μ l の泳動用色素と混合する。各サンプルを 10 μ l ずつ以下の順序でゲルのウェルに注意深く注ぐ。注入後泳動層のフタを閉め 100 V で 20 min 泳動する。

- レーン4, サンプル 1
- レーン5, サンプル 2
- レーン6, サンプル 3

設 問

サンプル 1～3 のうち、大腸菌を含んでいたものはどれか？ PCR の原理を図解しながら理由を説明せよ。その際、3.9.1 と 3.9.2 の実験条件の違いについても関連づけて考察すること(3.9.1 では、溶菌させた大腸菌より精製したゲノム DNA を鋳型として加えたのに対し、3.9.2 では大腸菌をそのまま反応溶液に加えた点に注意)。