

ISOPLANTの実験例

ISOPLANTによる結核菌DNAの簡易抽出

(財)結核予防会 結核研究所 細菌学科 高橋 光良

結核菌の染色体DNAにランダムに存在するIS6110をプローブとしたDNA fingerprinting法による分子疫学では0.5~2 μ gの結核菌DNAが必要となります。結核菌は細胞壁の周囲にコードファクターが存在するので酵素や試薬の感受性が低く培養条件を選び、さらに細胞壁に穴を開ける作用のあるサイクロセリン・エタンプトールを加えた方法を取り入れ、フェノール・クロロホルムを基本とした抽出法¹⁾によってDNAを精製していました。しかし、小川培地で分離された菌を再度液体培養後にDNAを精製するために約4週間を費やし、また古い乾燥状態の小川培地からはDNAが抽出されず分析不可能でした。

ISOPLANT²⁾の利点は古い乾燥状態の培地や初回小川培地から直接コロニーを採取して、スモールスケールで数 μ gのDNA抽出が可能であり、抽出時間も迅速で、制限酵素にも影響せずに33検体を分析するまで3日で完了する適切な抽出法です。また、組織や喀痰からの結核菌のDNA抽出も可能で、将来PCR法を基にしたArbitrary PCRやSpoligotyping法での分子疫学的手段として応用できます。大量にDNA抽出したい場合および*Mycobacterium avium* complex, *M. paratuberculosis*, *M. chelonae* sub. *abscessus*等の非結核性抗酸菌からDNAを取る場合は、4~5週間液体培養した菌を遠心集菌してからISOPLANTで精製すると4~60 μ gのDNAが取れます。重要事項としては、結核菌はエアロゾルによる飛沫感染により発病するので、取り扱いにはバイオハザード施設内で取り扱うことが必要となります。

【操作方法】

バイオハザード内でSolution 1の300 μ l中に1mmのディスクループに山盛りに集菌した結核菌を入れる(多めに取りたい場合は5週培養菌使用、また1mmのディスクループは滅菌水を1ループ付けると静電気による飛散が防止できる)

↓
ディスポベッセルで菌塊をホモジナイズし、37 $^{\circ}$ Cで3時間~over nightする

↓
Solution 2の150 μ lを加える

↓ Mix
52 $^{\circ}$ C、40分

↓
5000 rpmで1分間遠心後、Solution 3を150 μ lに加え攪拌後、氷上に15分間静置する

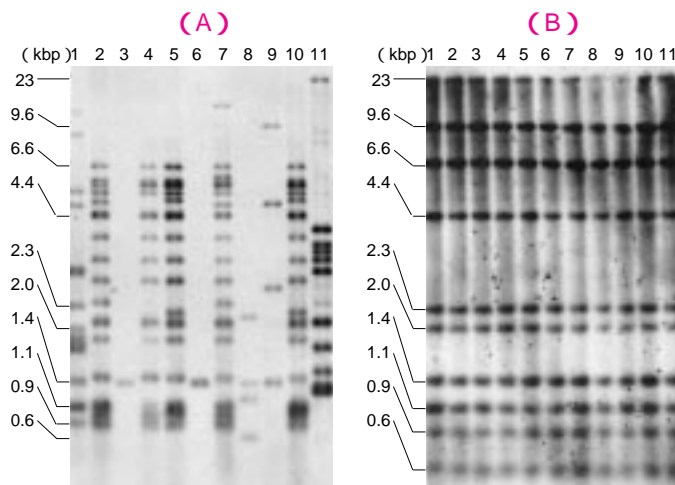
↓
12000 rpmで20分遠心後、上清を分取して2等量のエタノールを加えて混和する(ここまではバイオハザード内で行う)

↓
12000 rpmで10分遠心し、風乾後添付のTE buffer 100 μ lに溶かしてO.D.値を測定する

上清を分取した残渣は別のガラス瓶にプールして100 $^{\circ}$ Cで10分熱処理後廃棄し、チューブ類もオートクレーブ処理後廃棄する。

【参考文献】

- 1) 抗酸菌検査法 遺伝子技術による迅速診断(医歯薬出版株式会社)
- 2) Anil K. Jhingan: *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 3, 15-22 (1992)



(A) ISOPLANTによって抽出した結核菌のゲノムDNA 2 μ gを制限酵素Pvu II(Wako. コードNo.311-00281)で消化して0.8%アガロース電気泳動、サザンハイブリダイゼーション後、挿入断片(IS)6110をプローブにしてLumi-Phos 530(Wako. コードNo.537-24662)で検出した(レーン1~11)。

(B) 本法抽出DNAの酵素への影響を見るためにLambda DNA(Wako. コードNo.318-00414)の4ngを入れて制限酵素Hind III消化後、Lambda/Hind III(Wako. コードNo.316-00454)とX174/Hae III(Wako. コードNo.315-00664)を各4ng添加して電気泳動後、Lambda/Hind IIIとX174/Hae IIIのプローブで検出した。その結果、スター活性や酵素への影響も検出されなかった(レーン1~11)。

314-02731

ISOPLANT

100回分

29,000円

ISOPLANT(アイソプラント)は、植物、酵母、細菌から短時間でゲノムDNAを抽出するためのキットです。主成分である塩化ベンジルによって、細胞壁、細胞膜および核膜などが破壊され、界面活性剤の存在下で可溶化するため、特に植物の場合grindすることなくDNAを抽出することができます。従って多数のサンプルを処理する際にたいへん便利です。