

1-01

原油から直接抽出されるDNAの解析：真正細菌16S rRNA遺伝子の塩基配列のプロファイリングと近縁種の解析

山根國男¹, 中山 剛¹, 野村暢彦¹, 中島敏明¹, 内山裕夫¹, 北岡本光¹

¹食総研, ²筑波大院生命環境

Key words: Petroleum crude oil, DNA sequence, 16S rRNA gene

【目的】石油は我々の生活を支えるエネルギー源として非常に重要である。しかし資源としての原油は有限であり、その枯渇は人類に対して脅威となりうる。原油の起源や生成過程は明らかではないが、一般的には中生代に繁栄した生物が起源と推定されている。「微生物が原油生成にどのように関わったか？」を明らかにすることによって、その生成メカニズムを知る上での重要な手掛かりを得ることができるかもしれないと考えている。中東から輸入した原油や日本産原油からDNAを直接抽出・精製し、16S rRNA 遺伝子をPCRで増幅させた後、塩基配列を決定し、生物種を推定した。産地が地理的に全く異なる原油に由来するDNA配列を比較し、らん藻類を含む推定微生物の多様性と相同性を解析しようとしている。【方法】原油から直接DNAを抽出するために、50% 2,2,4-Trimethylpentane(Isooctane)で得られる沈澱物をから市販のDNA抽出キットで調製した。約1.4 kbのDNA断片をPCRで増幅させ、ライブラリーを作って解析した。【結果および考察】比重の異なる中東産原油3種類(Arabian extra-light, Arabian medium, Qatar land light)と日本産原油1種類(Sarukawa)について16S rDNAの配列を解析した結果、いずれも約15種類の真正細菌が推定された。*Gammaproteobacteria*と*Actinobacteria*が多く、多様性に富んでいた。しかし*Acinetobacter*, *Propionibacteria*, *Sphingobium*, 未知バクテリア(AKAU3700)が共通して検出された。またArabian medium原油からはらん藻が1種類検出された。一方原油なしで抽出したDNAでは*Agrobacterium*が非常に多く、それ以外には*Propionibacterium*, *Mycobacterium*および未知バクテリアが検出された。そのため共通して検出される*Propionibacteria*の一部はコンタミによると推定された。これらの原油をn-Octaneで希釈後、2種類の培地に広げたが、全く細菌の生育はみられず、細菌が生存している可能性は不明である。E-mail: yamanek@affrc.go.jp

1-02

Two-Dimensional DNA Gel Electrophoresis Mapping for Assessing Bacteria Diversity at Environmental Sites

Liu Guhua¹, Takashi Amemiya², Kiminori Itoh¹

¹Grad Sch Eng. Yokohama Natl. Univ, ²Grad Sch. Env & Info Sci. Yokohama Natl. Univ

Keywords: two-dimensional, DNA, electrophoresis, diversity

Soil bacteria analysis using molecular biological methods has been an important approach to assess soil environment. Here, high-resolution genomic DNA mapping based on two-dimensional DNA gel electrophoresis (2-DGE) combined with rank-abundance plots was used to assess bacteria diversity at different environmental sites.

DNA was extracted using the bead-beater method, and purified with PVPP and Sepharose4B. Touchdown PCR was then performed using universal primers for 16S rDNA gene. After the DNA fragments were separated by size on a highly cross-linked polyacrylamide gel, the sample lane (s) was cut into a strip, transferred to the top of a denaturing gel, and parallel DGGE was performed to separate the DNA fragments by melting characteristics. The gels were then stained with SYBR Green I, and photographed to generate spots of DNA fragments. Rank-abundance curves were obtained by plotting the relative intensity of each spot on Y-axis and spot rank on X-axis (the most intense spot was given rank 1, the second intense one was rank 2 and so on).

The results of 2-DGE mapping showed the difference of spot distribution including the number and position among samples. Some spots became strong, while the total number of spots decreased in the polluted samples. Moreover, the rank-abundance plots showed that there was high bacteria diversity in the non-polluted samples, while the diversity in the polluted samples was low.

This technique will be useful for not only accessing bacteria diversity and monitoring soil environmental quality.

E-mail: lgh079@hotmail.com