

## PB-69

## 生細菌群集構造解析のための実用的な環境試料保存方法

畑順子, 中村葵, 久田貴義, 西島美由紀  
株式会社テクノスルガ・ラボ

Key word: active bacterial community, RNA preservation, RT-PCR-DGGE

## 【目的】

近年、微生物群集解析手法の一つとしてRT-PCR-DGGEにより環境試料の生菌を対象とした評価技術も注目されている。しかし、採取した試料の保存法や保存期間が菌叢に及ぼす影響についての知見はほとんど見当たらない。本研究では、実用的なケースを想定し、保存方法・保存溶液・保存期間が菌叢に与える影響を検証した。

## 【方法】

土壌試料に乳酸菌を接種し、保存溶液添加（3種）および無添加に分け、各々を各温度（-20℃、4℃、25℃）で保存した。保存0、7、30日後の試料のRT-PCR-DGGEおよびPCR-DGGEを行った。各保存法・保存期間におけるRT-PCR-DGGE、PCR-DGGEの菌叢およびRNAの収率を比較し、これらの要素が菌叢へ及ぼす影響を総合的に評価した。

## 【結果および考察】

RT-PCR-DGGEでは、保存方法・保存期間により菌叢に顕著な違いが認められたのに対し、PCR-DGGEでは大きな変化は認められなかった。RT-PCR-DGGEでは、添加した乳酸菌がほとんどの条件で検出されたが、PCR-DGGEでは検出されなかった。このことから、RT-PCR-DGGEは、生細菌の検出法として有用であり、保存方法・保存期間は、菌叢に影響を及ぼすと考えられた。

Email: jhata@tecsrg.co.jp

## PB-70

## マイクロビーズアレイシステムを用いた海洋細菌の群集構造解析

多田雄哉<sup>1</sup>, 谷口亮人<sup>2</sup>, 浜崎恒二<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>東大海洋研, <sup>2</sup>広大院・生物圏科学

本研究では、ポストゲノム解析における遺伝子やタンパク質発現の網羅的解析に用いられているマイクロビーズアレイシステム（Luminex）を応用し、海洋細菌系統群の迅速モニタリングシステムを構築することを目的とした。ロゼオバクターグループ、β-プロテオバクテリア、γ-プロテオバクテリア、CFBグループに属する培養株からRNAを抽出し、蛍光標識を施したものをターゲットRNAとした。また、色が異なる5種類の蛍光ビーズに既報の16S rRNAをターゲットとした5種のプローブ（Non338:コントロール、GRb:ロゼオバクターグループ、Bet42a:β-プロテオバクテリア、Gam42a:γ-プロテオバクテリア、Cf319a:CFBグループ）を結合させた。これら5種類の蛍光ビーズを混合し、ターゲットRNAに対するハイブリダイゼーション実験を行った。培養株を用いた実験から、Luminexシステムによって4種の培養株のrRNAを特異的に検出することが可能であることがわかった。一般的に、マイクロアレイ技術では様々なクロスハイブリが問題となってくる。本実験では、特に一塩基違いのBet42a、Gam42aプローブのクロスハイブリが問題となるが、蛍光ビーズを混合していることによる競合効果によって緩和されることがわかった。また、プレートRNA量と検出された蛍光強度は強い相関を示した（ $R=0.99$ ）ことから、蛍光強度からRNA量の定量が可能であることがわかった。

Key word: high-throughput, beads-array system  
yatada@ori.u-tokyo.ac.jp