

## 細菌DNA分離におけるビーズ法の応用

藤本 秀士<sup>1)</sup>, 中上 佳子<sup>1)</sup>, 小島夫美子<sup>1,2)</sup>

### Optimal Bacterial DNA Isolation Method Using Bead-Beating Technique.

Shuji Fujimoto, Yoshiko Nakagami, Fumiko Kojima

#### Abstract

Extraction of nucleic acids from Gram-positive bacteria is normally hampered by a thick and resistant cell wall. This paper presents procedures based on mechanical cell breakage to extract DNA from *Staphylococcus aureus*. The proposed system for DNA extraction involves bead-beating treatment and the GES method. These two steps allow a consistent extraction from the bacterium resistant to the GES method alone. Yield and quality of DNA obtained with the proposed method were higher than those obtained with the GES method alone. This protocol can be extended to clinical specimens.

Key word: bacterial DNA isolation 細菌 DNA 分離, bead-beating method ビーズ法,  
*Staphylococcus aureus* 黄色ブドウ球菌.

#### はじめに

今日、臨床微生物学領域においても、感染症の遺伝子検査・診断が重要な役割を担っている。これは、分子生物学的方法をもとにして、目的とする微生物に特異的な核酸 (DNA あるいは RNA) の塩基配列を検出・解析して診断する方法であり、その用途は幅広く主に次の二つに大別される。一つは、培養によらずに検体中の微生物を直接同定する手段としての利用で、検査の迅速化、検出感度の向上、培養が困難もしくは危険な微生物の検出に貢献している。様々な臨床検体、例えば、血液・血漿<sup>1) 2)</sup>、脳脊髄液<sup>3) 4)</sup> やその他の検体<sup>4) 5)</sup> からの細菌 DNA の検出が報告されている。もう一つは、既に分離培養された微生物に対して、その分類、型別や病原因子の検出、疫学解

析への応用である<sup>6) 7)</sup>。病原細菌の遺伝子検査において、その第一段階は臨床検体に含まれる細菌からの核酸抽出である。得られた核酸を鋳型として様々なプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction: PCR) で目的遺伝子を増幅したり、種々のプローブを用いたハイブリダイゼーションなどの技術によって微量な核酸を増幅・検出する。

このような分子生物学的アプローチにとって厄介なのが、グラム陽性菌からの核酸抽出である。細菌の核酸の抽出には、菌体をこわして細胞質内の核酸を溶出し、除タンパクなどで不要なものを取り除かねばならない。グラム陽性菌は、ペプチドグリカンが主体の厚い細胞壁に覆われており菌体をこわすのが容易でない。一般的には、各

1) 九州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

2) 大阪大学大学院医学系研究科 医療技術科学 生体情報科学専攻

菌種に最適なペプチドグリカン切断酵素を用いて、例えば黄色ブドウ球菌ではリゾスタフィンで、37℃、数時間処理してから、標準的な抽出方法を行わねばならない。しかし、臨床検体では、含まれる細菌の種類が未知の場合がほとんどであり、より簡便で、短時間で済み、全ての菌種に対応できる方法が望まれる。

今回、我々は、標準的な細菌 DNA の抽出法の前段階にビーズ法 (bead-beating method) を取り入れてみた。ビーズ法はチューブの中に試料とビーズを入れて振動させ、ビーズが試料におつかることによって物理的に破碎する方法である。近年、植物からのタンパク抽出<sup>8)</sup>や酵母<sup>9)</sup>、臓器組織<sup>10)</sup>からの病原体核酸抽出に利用され始めている。このビーズ法でグラム陽性菌細胞壁を物理的に破碎して前処理することにより細菌核酸の抽出効率をあげることを試みた。本研究では、グラム陽性菌の中でも強固な細胞壁を持つ黄色ブドウ球菌を試験菌として、種々の条件下における DNA の収量・品質を調べた結果を報告する。

### 対象と方法

#### 菌株

超低温槽 (-80℃) に保存した黄色ブドウ球菌 988336B 1 株 (教室保存株) をマイクロチップで掻き取り、スタフィロコッカス No.100 培地 (栄研化学株式会社) に接種して、37℃で一晩、好気培養した。生えてきた菌を培地に塗り広げ、同じ環境でさらに 24 時間培養した。菌体重量 274.2mg の菌を、1 ml の TE バッファー (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM. pH 8.0) に懸濁した。菌懸濁液 200 $\mu$ l ずつを 1.5ml マイクロ遠心チューブに分注して -20℃ に保存した。各実験には、この保存菌液を用いた。

#### GES 法 (small scale)

GES 法<sup>11)</sup> は、スケールダウンするために原法に若干修正を加えて行った。

- ① TE バッファー 50 $\mu$ l に懸濁した菌液に 250 $\mu$ l の GES 溶解液 (Guanidium Thiocyanate 60g, 0.5M EDTA (pH8.0) 20ml, 10% Sarkosyl 5ml に

蒸留水を加えて全体量を 100ml にする) を加えて 5 ~ 10 分間、室温に放置したのち氷上に置いた。

- ② 7.5 M 酢酸アンモニウム液 125 $\mu$ l を加えてさらに 10 分間氷上に置いた後、クロロフォルム 500 $\mu$ l を加えて静かに転倒混和を 50 回繰り返した。遠心後に上清 (水層) を新しいチューブに移して、クロロフォルム 500 $\mu$ l を加えて静かに転倒混和を 50 回繰り返した。遠心後に上清 (水層) を新しいチューブに移して、半量のイソプロパノールを加えて混和し、遠心操作で沈殿物として DNA を回収した。
- ③ 沈殿した DNA は、70% エタノールで 2 回洗浄後に、200 $\mu$ l の滅菌蒸留水に溶解した。

#### ビーズ法

GES 法の操作①と②との間に、ビーズ破碎操作を加えて、DNA 収量を比較した。破碎に使うビーズの材質として、ガラスとジルコニアを比較した。ビーズ法には、ビーズ式細胞破碎装置 Micro Smash (トミー精工株式会社) を用いた。2.0ml サンプルチューブ (Cat No. 72693 もしくは 72694, アシスト (株)) にガラスもしくはジルコニアのビーズを入れ、バッファーに懸濁した菌を加えてキャップを堅く閉め、バランスがそろろうよう左右対称に機械内ホルダーに配置した。パワーノブを締め付け、固定した後に破碎室ドアを閉めて、振動回数 (rpm) と時間 (sec) を設定してビーズ破碎処理を行った。

#### DNA 定量

DNA の定量は、分光光度計 (ABI) を用いて波長 260nm, 280nm で吸光度を計測し、その値をもとに二本鎖 DNA として算出した<sup>12)</sup>。

### 結果と考察

今回、グラム陽性菌の中でも強固な細胞壁を持つ黄色ブドウ球菌を対象として、その DNA 抽出にビーズ法を取り入れてみた。実験では、まず、対象と方法に示した GES 法の操作①と②との間に、ビーズ破碎操作を加えて、DNA 収量を比較

表1 ビーズの材質, 直径, 量による DNA 収量の違い

サンプル No.	ビーズ			DNA 収量 ( $\mu\text{g}$ )
	材質	直径(mm)	量(mg)	
コントロール	-	-	-	1.1
1	ガラス	1.0	50	1.6
2			100	4.5
3			150	10.5
4			200	9.7
5	ジルコニア	0.5	50	13.7
6			100	20.0
7			150	19.4
8			200	19.7
9	ジルコニア	0.5	50	20.0
10			100	10.9
11			150	6.1
12			200	12.3

速度は 4500rpm, 時間は 30sec.

表2 破砕速度, 時間による DNA 収量の違い

サンプル No.	チューブの振動		DNA 収量 ( $\mu\text{g}$ )
	速度 (rpm)	時間 (sec)	
13	-	-	1.1
14	4500	30	28.2
15		60	22.6
16		90	17.6
17		120	17.5
18		180	15.5
19	2400	90	14.2
20		120	8.3
21		180	7.2

直径 0.5mm ガラスビーズ 100mg を使用。

した。ビーズの材質, 直径, 量による DNA 収量の違いを表1に, 破砕速度 (サンプルチューブを振動させる速度), 破砕時間による DNA 収量の違いを表2に示す。黄色ブドウ球菌菌体 13.7mg から, GES 法のみでは 1.1 $\mu\text{g}$  の DNA 収量であった (表2, サンプル No.13)。これに対して, ビーズ法を加えた場合, 同じ菌量から最大 28.2 $\mu\text{g}$  の DNA が得られた (表2, サンプル No.14)。

破砕に使うビーズの材質として, ガラスとジルコニアを比較した場合, ジルコニアは 50mg で最も収量が多かったのに対し, ガラスでは 50mg よりも 100mg 以上の収量が多かった (表1)。また, 同じガラスでは, 直径 1.0mm のものに比べて, 直径 0.5mm の方が DNA 収量が多かった (表1)。これは, 細菌の直径が約 1 $\mu\text{m}$  であり, ビーズの直径が小さい方が, 同じ質量でより広い表面積を持ち, 菌と接触する頻度が高いためではないかと考えられる。直径 0.5mm のガラスビーズの場合,

100mg, 150mg, 200mg の間で収量に大きな差は認められなかった。

次に, 直径 0.5mm のガラスビーズ 100mg を使用して, チューブの振動速度および作用時間を変化させて DNA 収量を比較した (表2)。チューブの振動に関する実験では, チューブを振動させなかった場合 (サンプル No.13) の収量は, 1.1 $\mu\text{g}$  で, ビーズ処理を加えたサンプルの最低収量 1.6 $\mu\text{g}$  (サンプル No.1) を下回った。このことから, いくらかでも物理的破砕処理を加えた方が DNA 抽出に効果的であることがわかる。また, 振動速度 2400rpm (最大収量 14.2 $\mu\text{g}$ ) に比べて, 4800rpm (最小収量 15.5 $\mu\text{g}$ ) の方が調べたサンプル全てにおいて収量が多く, 高速の振動によってより強い力が菌体に加わり破砕が進むと考えられる。振動時間は, 短時間 (30 秒) が調べた中で最も効率がよく, 作用時間が長くなるにつれて DNA 収量が減る傾向にあった。また, 得られた DNA をアガロースゲル電気泳動で調べた結果, 作用時間が長くなるにつれて DNA の切断が起こり, 分子サイズが減少することが確認された (図1)。これらの結果から, 直径 0.5mm ガラスビーズ 100mg を用いて, 4500rpm, 30 秒のビーズ処理を加えることによって, 黄色ブドウ球菌からの DNA 収量を増加 (約 26 倍) させることが可能であることが判明し, ビーズ法を加えることが細菌 DNA 抽出に有用であることが伺える。

ビーズ法は, 物理的に細胞壁を破砕して, 以後の DNA 抽出操作を容易にし, 収量増加を促し

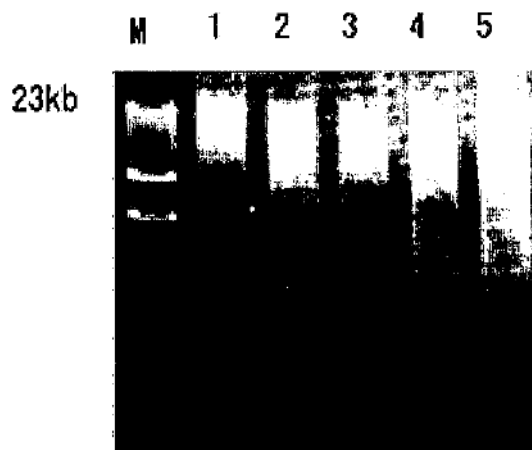


図1

た。ビーズ法は、タバコの葉からのタンパク抽出<sup>8)</sup>、真菌<sup>9)</sup> (クリプトコッカス) からの核酸 (DNA および RNA) や肝臓細胞からの C 型肝炎ウイルス (HCV) RNA 検出<sup>10)</sup> などで有効との報告がある。細菌 DNA 抽出におけるビーズ法の利点は、ペプチドグリカン切断酵素による酵素処理を行う必要がないため、菌種によって処理方法を変える必要がなく、同じ操作でほとんどの菌種に応用可能な点である。グラム陽性菌と陰性菌とでは細胞構造に大きな違いがあるため、臨床検体中のグラム陽性菌、グラム陰性菌から同じ効率で DNA を抽出する良い方法はなかなかない。Hendolin ら<sup>13)</sup> は、*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Alloiococcus otitidis*, *Moraxella catarrhalis* を含む中耳浸出液を、古典的なフェノール・エタノール抽出法と SDS 溶液 (sodium dodecyl sulfate-NaOH-chaotropic salt) 処理を加えた抽出キット法 (Qiamp DNA extraction kit) とで DNA を抽出して、マルチプレックス PCR で解析している。その結果は、興味深いことに、同じ検体を処理したにもかかわらず、フェノール・エタノール抽出法ではグラム陰性菌 (*H. influenzae*, *M. catarrhalis*) の PCR 陽性率が有意に高く、抽出キット法では反対にグラム陽性菌 (*S. pneumoniae*, *A. otitidis*) の検出率が有意に高い結果が示された。臨床検体では、含まれる細菌の種類が未知の場合がほとんどであり、臨床材料からの DNA 抽出にビーズ法を加えることは有用と考えられる<sup>14)</sup>。

また、ビーズ法は、酵素処理に比べて処理時間も短く済むため検査の迅速化につながるとともに、酵素処理に比べて安価である。本法は、サンプルの取扱いが安全で、かつ、半自動化可能であり、操作する人の経験に頼らないため再現性が高いと考えられる。また、細胞破砕から除タンパクまでを 1 本のチューブで行えるため、サンプル間の相互汚染を極力抑えられる。

#### おわりに

遺伝子検査・解析において、鑄型となる DNA の抽出は第 1 段階であり、検査結果を左右する

重要なステップである。グラム陽性菌の細胞壁は、ペプチドグリカン切断酵素の使用によって化学的に破砕して、効果的に溶菌が可能である。しかし、これらの酵素の残存は PCR に影響を及ぼすため、極力少なくすることが肝要である。また、ブドウ球菌属、レンサ球菌属など種を選ばずに同じ方法で効果的に溶菌する方法は今のところ報告されていない。今回、我々は、細胞壁を物理的に破砕するビーズ法を検討した。短時間のガラスビーズ処理と GES 法との組み合わせが最も効果的であった。同じ物理的な細胞破砕法に、超音波破砕 (sonication) がある。今回は試してはいないが、超音波処理時に検体がエアロゾルとなって飛び散り、周囲を汚染して感染や相互汚染 (cross contamination) の原因となる危険性が懸念される。今回、ビーズ法による黄色ブドウ球菌の物理的溶菌と DNA 抽出の検討結果は、他の菌種においても応用可能と考えられ、様々な微生物が混入している可能性のある臨床検体からの病原微生物・病原因子の直接検出に有効と期待される。

#### 文 献

- 1) Kane TD, Alexander JW, and Johannigman, JA: Thedetection of microbial DNA in the blood: a sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients. *Ann Surg* 227: 1-9, 1998.
- 2) Cursons RT, Jeyerajah E, and Sleight JW: The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. *Crit Care Med* 27:937-940, 1999.
- 3) Lu JJ, Perng CL, Lee SY, and Wan CC: Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease diagnosis for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 38:20076-2080, 2000.
- 4) Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J. et al: Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 38:32-39, 2000.

- 5) Mariani BD, Martin DS, Levine MJ, Booth REJ, and Tuan RS: The Coventry Award. polymerase chain reaction detection of bacterial infection in total knee arthroplasty. *Clin Orthop* 331:11-22, 1996.
- 6) 小島夫美子, 山田 巖, 藤本秀士: 健康な大学生における黄色ブドウ球菌の鼻腔内保菌状況とそのコアグララーゼ遺伝子型別. *九州医短部紀要* 28:117-122, 2001.
- 7) 藤本秀士, 小島夫美子: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 解析による黄色ブドウ球菌ゲノムタイピング. *九州医短部紀要* 28:99-106, 2001.
- 8) Broothaerts W. McPherson J. Li B. Randall E. Lane WD. Wiersma PA: Fast apple (*Malus x domestica*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf polyphenol oxidase activity assay for screening transgenic plants. *J Agricul Food Chem* 48:5924-8, 2000.
- 9) Bolano A. Stinchi S. Preziosi R. et al: Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research*. 1 :221-4, 2001.
- 10) Bielawski KP, Bernat A, Wlasiuk M and Falkiewicz B: HCV-RNA detection in liver biotates--a comparison of automatic and 'home-made' protocols combined with a new procedure of HCV-RNA extraction. *Med Sci Monitor*. 7 :197-201, 2001.
- 11) Pitcher DG, Saunders NA, and Owen RJ: Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8 :151-156, 1989.
- 12) Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis, T: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed, pE-5. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 13) Hendolin PH, Paulin L and Ylikoski: Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens. *J Clin Microbiol* 38:125-132, 2000.
- 14) Rantakokko-Jalava K and Jalava J: Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J Clin Microbiol* 40:4211-17, 2002.