

## パルスフィールドゲル電気泳動のためのグラム陰性菌からの 非酵素法によるDNA抽出

西海弘城\* 山岡政興

### Nonenzymatic Protocol for Pulsed Field Gel Electrophoresis of DNA Extraction from Gram-negative Bacteria

Hiroki NISHIUMI\* and Masaoki YAMAOKA

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of  
Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho,  
Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

We have applied chromosomal DNA extraction by nonenzymatic protocol with detergent and high concentration urea in substitution for a proteolytic enzyme successfully for *Echerichia coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella* Enteritidis and *Vibrio parahaemolyticus*.

This method was superior in comparison with the conventional method for the reasons of omitting the inactivation of proteinase K and not needing complicated buffers and expensive reagents such as proteinase K, Pefabloc SC.

#### I はじめに

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)は分子疫学解析の手段として広く細菌感染症の分野に用いられている。PFGEは2方向から電場を作る専用の泳動装置を用い、幅広い分子量のDNA断片を分析対象とする。そのため、可能な限り物理的な断片化を防いで、できるだけ細菌の細胞内に存在していた時に近い状態で巨大分子の染色体DNAを回収することが必要である。このため、通常アガロースブロック内に菌体を包埋した状態でタンパク分解酵素を使って溶菌し細胞内に存在していた時に近い状態で染色体DNAを抽出する方法がとられる<sup>1)</sup>。

細菌から染色体DNAを抽出するために、通常は溶菌

酵素やタンパク分解酵素などの酵素類が使われるが、より簡便かつ経済的にPFGE用のDNAを調整する非酵素法が、*Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*及び*Aeromonas*について報告がされている<sup>2, 3, 4)</sup>。今回、当所に搬入される機会の多い出血性大腸菌O157, 赤痢菌, サルモネラ及び腸炎ビブリオについて、非酵素法によるDNA調整の可否を検討したので報告する。

#### II 材料と方法

##### 1. 使用菌株

兵庫県下で患者から分離された*Echerichia coli* O157:H7, *Sigella sonnei*, *Salmonella* Enteritidis, *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6を試験に供した。

##### 2. 酵素法によるDNA抽出法

DNAの抽出はPFGE New Protocol-Kinkiの方法<sup>5)</sup>に

感染症部

\* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究センター

感染症部 西海弘城

Table 1. Comparison between enzymatic protocol and nonenzymatic protocol

	Enzymatic Protocol	Nonenzymatic Protocol
Deproteinization	0.5M EDTA (pH8.0) 1% N-Lauroylsarcosine 1mg/mL Proteinase K	0.1M EDTA (pH8.0) 1% N-Lauroyl sarcosine 1% Triton X-100 5M Urea
Wash	TE buffer with 4mM Pefabloc SC 2 times TE buffer once	TE buffer 2 times and once

従った。すなわち菌液を遠心し集菌後、蒸留水に再懸濁し、等量の1%アガロースを加え、固化させた。固化させたアガロースブロックを1% N-Lauroylsarcosine及び1 mg/mL proteinase Kを含む0.5M EDTA(pH8.0)に入れ、50℃で一晩溶菌した。溶菌後、4 mM Pefabloc SCを含むTE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)にブロックを移し50℃20分間保温を二度繰り返しproteinase Kを失活した。次にTE bufferにブロックを移し氷上で20分間平衡化した(表1)。

### 3. 非酵素法によるDNA抽出法

菌をアガロースブロックに包埋するところまでは、酵素法によるDNA抽出と同様に行った。菌を包埋したブロックを5 M 尿素, 1% Triton X-100を含む0.1M EDTA(pH 8.0) 1 mLに入れ、50℃で一晩溶菌した。溶菌後、TE bufferで2回洗浄し、新しいTE buffer置換後、氷上で20分間平衡化した(表1)。

### 4. 制限酵素による染色体DNAの切断

ブロックを制限酵素bufferに移し氷上で30分間平衡化した後、*E. coli* O157:H7, *S. sonnei*及び*S. Enteritidis*については30Uの*Xba* I, *V. parahaemolyticus* O3:K6については30Uの*Not* Iで37℃, 2時間処理した。

### 5. PFGE

電気泳動は、0.5×TBE buffer, 1%アガロースゲル, 電圧6 V/cm, パルスタイム 2.2-54.2秒, 泳動時間19時間でCHEF DRII (BIO-RAD)を用いて行った。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、切断パターンを比較した。

## III 結 果

今回、我々は尿素を用いる非酵素法によるDNA抽出法が、当所に搬入される機会の多い出血性大腸菌O157, 赤痢菌, サルモネラ及び腸炎ビブリオにおけるPFGEに適用可能か否か、酵素を用いたDNA抽出法と比較して検討を行った。結果は図1に示した通りである。

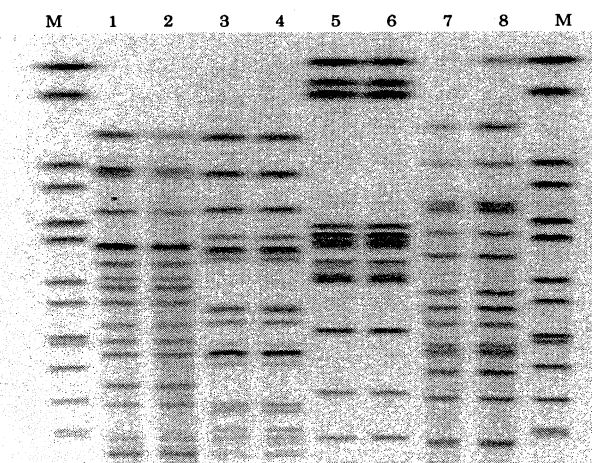


Fig. 1 PFGE of restriction enzyme-digested genomic DNA extracted by enzymatic and nonenzymatic protocol from representative isolates of *E. coli*, *S. sonnei* and *S. Enteritidis* and *V. parahaemolyticus*.

Location of isolates are as follows : Lanes 1 and 2 : *E. coli*, 3 and 4 : *S. sonnei*, 5 and 6 : *S. Enteritidis*, 7 and 8 : *V. parahaemolyticus*, M : *Salmonella* Braenderup *Xba* I digestion

Lane 1, 3, 5 and 7 : enzymatic protocol

Lane 2, 4, 6 and 8 : nonenzymatic protocol

大腸菌では約30~600kbpにかけて20本のバンドがみられた。バンドに多少の濃淡はあるが、いずれの抽出法を用いても明瞭であり、抽出方法によるPFGEパターンの差は認められなかった。また、赤痢菌では約30~500 kbpの間に20本のバンド、サルモネラでは約30~1000kbpの間に13本のバンド、腸炎ビブリオでは約30~1000kbpの間に18本のバンドがあり、いずれの抽出法においても大腸菌と同様に多少の濃淡はあるが、バンドは明瞭であり、泳動位置はすべて一致した。

## IV 考 察

McEllistremはlysozymeやmutanolysinといった溶菌酵素やproteinase Kなどのタンパク分解酵素を使わずにEDTAとN-Lauroylsarcosineを含むバッファーで*S. pneumoniae*からPFGE用のDNAを調整する方法を報告している<sup>2)</sup>。また、Lopez-Canovasらは尿素及び2種類

の界面活性剤(N-Lauroylsarcosine及びNonidet P-40)を含むバッファーを用いて1ステップでPFGE用のDNAを調整する方法を*P. aeruginosa*, *V. cholerae*及び*Aeromonas*について報告している<sup>3, 4)</sup>。今回、我々は出血性大腸菌O157, 赤痢菌, サルモネラ及び腸炎ビブリオについて、新たに開発したTriton X-100と尿素を含むEDTAバッファーを用いたシンプルな非酵素法により従来の酵素法と同等の良好な結果が得られたものと考え、Lopez-Canovasら<sup>3, 4)</sup>は蛋白質を可溶化させるために2種類の界面活性剤(N-Lauroylsarcosine及びNonidet P-40)を利用している。我々は臨界ミセル濃度が比較的高く、かつ安価なTriton X-100のみで蛋白質の可溶化が十分であることを確認した。

我々の試みた非酵素法は、タンパク分解酵素の代わりに尿素によって蛋白質を変性させた後にTriton X-100で可溶化し、DNAを抽出する方法である。尿素はタンパク変性剤の一つであり、水の網目構造の破壊、蛋白質分子内の側鎖間やペプチド結合間の水素結合の破壊及び蛋白質分子内の疎水結合の破壊が複合的に働くことにより蛋白質を可溶化、変性させる。

一方、*Campylobacter*属<sup>6, 7)</sup>や*Clostridium*属<sup>8, 9)</sup>は菌株によっては、DNA抽出中にDNAが内在性DNA分解酵素により分解され、泳動結果がスメアになることが報告されている。そのため、これらの菌を用いてPFGEによる解析を実施する場合、アガロースに菌体を包埋する前に、ホルマリンで前処理することにより内在性DNA分解酵素を不活化する方法が用いられる。Asahidaら<sup>10)</sup>は尿素が内在性DNA分解酵素を変性させることを利用して、高濃度の尿素を含むTRES-Urea bufferを用いることにより、カレイやヒラメのような内在性DNA分解酵素が豊富な魚類からのDNA抽出を可能にした。今回我々が試みた非酵素法は高濃度の尿素を含有するため、*Campylobacter*属や*Clostridium*属のような内在性DNA分解酵素が豊富な菌でもホルマリンによる前処理なしでDNA抽出が可能であると考えられるため、今後検討したい。

酵素法ではタンパク質をproteinase Kで分解するが、その後にproteinase Kが残存していると制限酵素によるDNA切断の過程で制限酵素が分解されてしまうため、DNAが切断されない。そのため、プロテアーゼインヒビターであるPefabloc SCによるタンパク分解酵素の不活化が必要となる。しかし、今回我々が試みた尿素及び界面活性剤によりタンパクを可溶化し除去する非酵素法の場合、ブロックの洗浄のみで尿素や界面活性剤は除去できるため、Pefabloc SCによるproteinase Kの不活化操作を省くことができる。また、proteinase KやPefabloc

loc SCといった高価な試薬も必要としない利点につながった。

## V 要 旨

グラム陰性細菌について、PFGEのためにタンパク分解酵素の代わりに高濃度の尿素を用いて染色体DNAを抽出する非酵素法を開発した。この方法は、大腸菌、赤痢菌、サルモネラ菌及び腸炎ビブリオに適用可能だった。我々の非酵素法はproteinase Kの不活化操作を省略でき、proteinase KやプロテアーゼインヒビターであるPefabloc SCといった高価な試薬を必要とせず、複雑な組成のバッファーを必要としないという点で優れていた。

本研究は厚生労働研究費補助金により実施した。

## 文 献

- 1) Bohm, H., Karch, H. : DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2169-2172 (1992)
- 2) McEllistrem, M. C., Stout, J. E., and Harrison, L. H. : Simplified protocol for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 351-353 (2000)
- 3) Lopez-Canovas, L., Sanchez-Alonso, A., Higginson, D., Ariosa, C., Clark, H., Riveron, A. M. : Nonenzymatic protocol for *Pseudomonas aeruginosa* DNA preparation and rapid subtyping by mini pulsed-field gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **24**, 1152-1158 (2003)
- 4) Lopez-Canovas, L., Bravo, L., Herrera, J., Riveron, A. M., Javer, E., Sanchez, A., Fando, R., Noa, M. D., Fernandez, A. : DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species by pulsed-field minigel electrophoresis. *Electrophoresis*, **27**, 2857-2864 (2006)
- 5) 勢戸和子, 石川和彦, 藤原恵子, 竹上修平, 小笠原準, 横田正春, 西海弘城, 黒川学, 川西伸也, 中山章文, 金澤祐子, 田口真澄, 小林一寛: 近畿ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)型別法の施設間変動について—感染研新プロトコルの試用—, 新興・再興感染症研究事業平成15年度総括・分担研究報告書, 95-104 (2003)

- 6) Gibson, J. R., Sutherland, K., Owen, R. J.  
: Inhibition of DNase activity in PFGE analysis  
of DNA from *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl.  
Microbiol., **19**, 357-358 (1994)
- 7) Owen, R. J., Sutherland, K., Fitzgerald, C.,  
Gibson, J., Borman, P., Stanley, J. : Molecular  
subtyping scheme for serotypes HS1 and HS4 of  
*Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol., **33**,  
872-877 (1995)
- 8) Hielm, S., Bjorkroth, J., Hyytia, E., Korkeala,  
H. : Genomic analysis of *Clostridium botulinum*  
group II by pulsed-field gel electrophoresis. Appl.  
Environ. Microbiol., **64**, 703-708 (1998)
- 9) Maslanka, S. E., Kerr, J. G., Williams, G.,  
Barbaree, J. M., Carson, L. A., Miller, J. M.,  
Swaminathan, B. : Molecular subtyping of  
*Clostridium perfringens* by pulsed-field gel  
electrophoresis to facilitate food-borne-disease  
outbreak investigations. J. Clin. Microbiol., **37**,  
2209-2214 (1999)
- 10) Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K.,  
Nakayama, I. : Tissue preservation and total  
DNA extraction from fish stored at ambient  
temperature using buffers containing high  
concentration of urea. Fishers Sci., **62**, 727-730  
(1996)