

常在菌遺伝子の迅速かつ特異的な計測法に関する研究

Rapid and specific measurement for the gene sequence of *Staphylococcus aureus*

東京工科大¹, ○ーノ瀬優哉¹, 湯沢友之¹, 鶴岡誠¹

Tokyo Univ. of Tech.¹, °Yuya Ichinose¹, Tomoyuki Yuzawa¹, Makoto Tsuruoka¹

E-mail: tsuruoka@stf.teu.ac.jp

【はじめに】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、大腸菌、緑膿菌と並ぶ三大常在菌のひとつである。感染症の拡大防止等の観点から、より迅速かつ簡便に計測する手法が必要である。そこで、蛍光偏光法 (FP 法) を用いた遺伝子検出によって、これを実現しようと考えた。FP 法は、一本鎖 DNA とプローブとが二本鎖 DNA を形成するか否かを蛍光偏光度の差として判別することができるものである。この方法には検出速度の他に装置の小型軽量化が可能である点や、DNA 増幅時と測定時で二重の特異性を保持しているといった利点がある。本研究 FP 法による遺伝子検出は、遺伝子抽出、非対称 PCR による増幅、FP 法測定の手順で行われる。これには目的の遺伝子に対する相同性と特異性を併せ持つプライマーと、その増幅領域内に特異結合するプローブ塩基配列を探す必要がある。本研究では、プライマー設計に際し黄色ブドウ球菌コアグララーゼを対象とする配列[1]を参考として FP 法用の至適化を行い、更に、新たに FP 法の特徴である特異性を持つプローブ試薬の開発を目的とする。また、ヘアピン構造によるプローブ結合時の障害を避けるため、増幅産物の塩基配列に応じた二次構造予測を用いてプローブの設計を行う。設計した試薬を用いて FP 法測定を行い、その有効性を確認したので報告する。

【実験方法】

ベースとなるプライマーを選定し、Primer-BLAST を用いて増幅領域が短くなるよう至適化した。その後、電気泳動による増幅の確認を行った。遺伝情報処理ソフトである GENETYX を用

いて増幅領域に対する二次構造予測を行い、ヘアピン構造をとらない部分領域にプローブの塩基配列を設定し、FP 法による遺伝子検出実験を行った。尚、プライマーの増幅領域は 477 塩基、設計プローブの塩基数は 18 となった。

【結果・考察】

本研究 FP 法による実験結果を以下に示す。Fig.1 から、黄色ブドウ球菌のみ判定基準を超えた蛍光偏光度が計測されていることが分かる。尚、判定基準とは本研究 FP 法で遺伝子検出の陽性を決める際の参考とする値である。また、大腸菌及び緑膿菌に対しては陰性と同程度の蛍光偏光度におさまった。以上より、三大常在菌における黄色ブドウ球菌遺伝子の検出特異性が確保され、設計試薬の有効性が確認できたと考えられる。

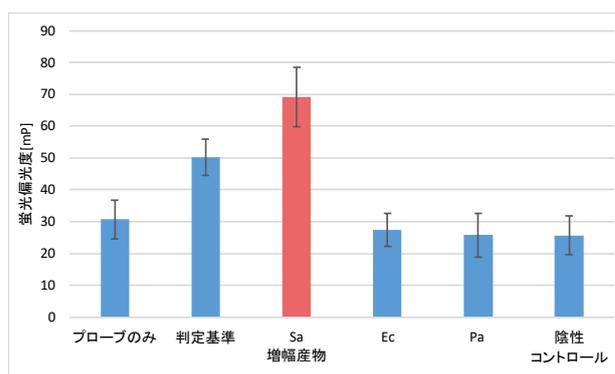


Fig.1 FP measurement result

【参考文献】

- [1]. SWEE-HAN GOH, SEAN K. BYRNE, J. L. ZHANG, AND ANTHONY W. CHOW'.
“Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* on the Basis of Coagulase Gene Polymorphisms” (1992)