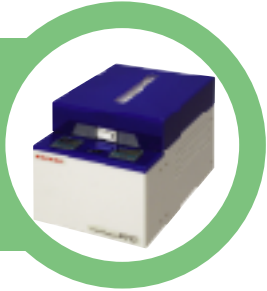


アプリケーションデータシート #021

温度勾配ゲル電気泳動装置 **マイクロTG** No. 02

マイクロゲルの微生物群集構造解析への応用検討



26S rDNA D1/D2ドメインを指標とした土壌微生物群集構造解析の予備実験

【マイクロTG】は、専用である約25mm角の超小型ゲル(マイクロゲル)を用いた泳動方式とサーキュレーターを必要としない電子加熱冷却方式の採用により、温度勾配ゲル電気泳動(Temperature Gradient Gel Electrophoresis; TGGE)が手軽にできる装置です。アプリケーションデータシート(ADS)#004ではHeteroduplex法によるSNPsの分離事例を取り上げましたが、今回は微生物群集構造解析として行われている同一サイズの複数rDNA断片群について、マイクロTG/マイクロゲルで分離可能かを検討しました。

【実験】

①試料の調製

3ヶ所の土壌(埼玉県川口市の芝川土手、さいたま市内の畑および竹林)を採取し、土壌用DNA抽出キット[ISOIL:ニッポンジーン]を使用してPCR用テンプレートを調製した。

②PCR

26S rDNAのD1/D2ドメインを標的としたプライマーセットを用いて、98°C1分で変性後、①98°C/5秒②68°C/30秒を30サイクル行い、最後に68°C 30秒を行った(エペンドルフ社のマスターサイクラー/グラディエントを使用)。PCR産物の確認は、6%Tアクリルアミド(5%C、6.5M尿素、1×TBE)のマイクロゲルを作製し、マイクロTGを用いた一定温度(15°C)での電気泳動で行った(図1)。

③TGGEおよびバンドの確認

4%Tアクリルアミド(5%C、6.5M尿素、1×TBE)のマイクロゲルを作製して温度勾配33°C-45°C、泳動バッファー5×TBE、100V定電圧で12分泳動した。泳動終了後、マイクロゲルをゲルカセットから剥し、10mlの1×SYBR Goldに浸漬して6分間穏やかに振とうして染色、UVトランスイルミネーターで検出した(図2)。

【結果と考察】

M:サイズマーカー、A:土手、B:畑、C:竹林

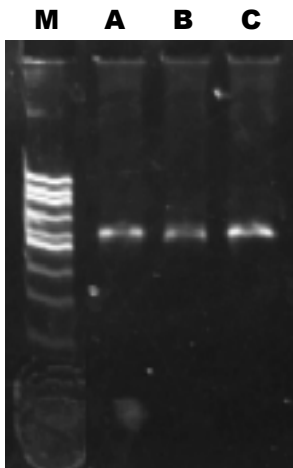


図1. PCR産物の確認

【泳動条件】  
 ・6%Tアクリルアミドゲル(5%C、6.5M尿素、1×TBE)  
 ・5×TBE泳動バッファー  
 ・泳動温度15°C  
 ・泳動時間12分

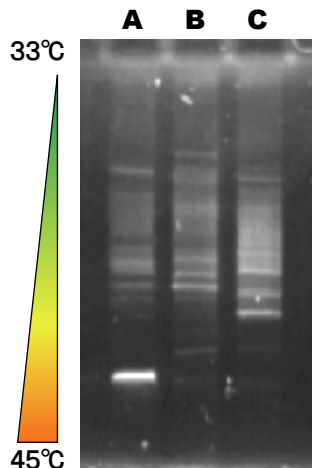


図2. TGGEによる分離

【泳動条件】  
 ・4%Tアクリルアミドゲル(5%C、6.5M尿素、1×TBE)  
 ・5×TBE泳動バッファー  
 ・温度勾配33°C-45°C  
 ・泳動時間12分

今回検討したマイクロTGにおけるTGGE条件では、通常の泳動では単一のバンドであったPCR産物を複数のバンドに明確に分離することができた。このバンドの分離から26S rDNA塩基配列の複数種類の存在が示され、各土壌中の多様なEukaryoteの存在が推測できた。また、土壌間のパターンの違いも確認することができた(土壌Aのみで強く出るバンド等、その微生物相の差も示唆される)。

従来、このような群集DNA解析では変性剤濃度勾配電気泳動法(DGGE)が広く利用されているが、DGGEの泳動は数リットルの泳動バッファーを60°Cに加熱しつつ循環しながら数時間から十数時間にまで及ぶのが通例であり、尿素およびホルムアミドを使用した変性剤濃度勾配ゲルの作製が煩雑であることも指摘されている。実際、グラディエントメーカーを使用して一度に作製した複数枚のゲル間では再現性が得やすいものの作製ロット間では得ることが困難であるし、変性剤濃度勾配は変性剤の経時拡散によりほとんど保存ができない。

マイクロTGの場合、変性剤は6.5M均一濃度の尿素のみでよく、専用のゲルカセット内に形成させたわずか30×20×0.8mmのマイクロゲルを温度勾配ステージに載せるだけで変性条件を再現できる。このように再現良く温度勾配を形成させたマイクロゲルを用いて15分程度(DGGEの数時間~十数時間に較べると数十分の一の時短)で群集DNAの分離泳動がルーチンにできるようになれば、群集DNA解析のスピードアップにつながるものと期待できる。今後もこのような実験事例を多く収集していくほか、例えば分離能を向上させた形状のゲルカセット等、マイクロゲルのバリエーション展開も検討していく。

本紙および製品についてのお問い合わせ:  
 タイテック株式会社 商品企画部 宣伝企画グループ  
 TEL:048-988-8359 FAX:048-988-8362 E-mail:miyatani@taitec.org