各種サンプル（発酵食品や土壌他）からの微生物（麹菌他）検出実施例

■微生物の前処理方法

以下の手順により、シャーレ・斜面培養菌体及び味噌、土壌等の混合物、濃縮した日本酒等から微生物（真菌類等の細胞壁が固く、DNA 抽出が困難な物も含む）の PCR テンプレート用ゲノム DNA の抽出が出来る。

この前処理方法により、実際に麹菌実験室株の相同組換え体のスクリーニングを行っている。また、複数種の味噌から麹菌、及びその他の糸状菌、Candida 酵母等を検出している。スラント培養菌体からは、酒用、醤油用実用麹菌の他、焼酎麹 *Aspergillus kawachii*、酵素生産菌 *Aspergillus niger*、*Trichoderma viride*、チーズカビ *Penicillium roqueforti* が検出可能である。

菌体コロニーそのもの、あるいは味噌、土壌等をそのままサンプリング

↓

TE に懸濁

↓

電子レンジ加熱

↓

FTA カードに滴下

↓

乾燥後、パンチ1枚（φ1.25mm）をPCRに使用

【注意事項など】

●サンプリング方法に関して
麹菌の菌体をサンプリングする場合は、分生子や菌糸先端等 DNA を多く含む部分をなるべく取ること。気菌糸ばかり取っても増幅しないことがある。スラントや寒天プレート培養の場合、多少寒天が混入しても構わない。

●TE への懸濁について
菌体量に対して TE はあまり多すぎない方がよい。サンプル数や PCR 反応系の量に応じて各自増減してください。96 穴プレート使用の場合は論文参照のこと。

●電子レンジでの加熱について
真菌の場合は論文参照のこと。
※電子レンジの代わりに、ヒートブロックにより加熱を行った時は増幅が見られなかった。
原核生物の場合は必要に応じて適切な時間加熱すること。

●FTA カード(*1)のパンチとパンチ治具(*2)の洗浄について
20μL 系 PCR の場合、パンチ 1 枚(φ1.25mm)を使用する。
※実験データとしては特にパンチ治具を洗浄しなくてもクロスコンタミが無いというデータを得ている。パンチ台でのコンタミを避けるため、カードの裏紙の下にパンチ台を敷き、裏紙をパンチの刃が抜ききらないような力加減で、FTA カード本体のみを抜くように注意すること。

(*1)FTA カード: WB120205 (Whatman 社製)
(*2)パンチ治具: HarrisUni-Coreφ1.25mm (Whatman 社製)

■PCR

・PCR 反応液および PCR 温度サイクル条件は、島津製作所推奨プロトコルを参考に各自で検討。
・PCR 酵素は、増幅サイズが 3kbp 以下の場合は NovaTaq(HS)、3kbp 以上の場合は ExTaq(HS)を使用した。

■参考文献

Journal of Bioscience and Bioengineering 2006 Dec;102(6):572-4.

■プロトコルのご提供

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 鈴木 聡 様よりご提供いただきました。