

農耕地土壌に由来する繊毛虫の同一個体を用いた顕微鏡観察と
DNA 抽出法の確立

嶋谷 智佳子, 橋本 知義 (九州沖縄農業研究センター)

A new protocol to extract the DNA from one soil ciliate that has been identified under
the microscope

Chikako SHIMAYA and Tomoyoshi HASHIMOTO (National Agricultural Research Center for
Kyusyu Okinawa Region)

SUMMARY

We established a new protocol that allows DNA extraction from one specimen of a soil ciliate that has been observed under the microscope. In this method, we first observed and identified a single soil ciliate in a drop of sterilized water on a glass slide under a microscope. When the water had almost dried, the soil ciliate was crushed with a piece of filter paper (1.5 mm × 1.5 mm). The piece of filter paper that contained the soil ciliate remains was then immediately placed into a PCR buffer and used as the DNA template. A suitable condition was determined to identify the soil ciliate's species. The species identified through DNA analysis was the same as the forms observed under the microscope.

[目的] 農耕地土壌に由来する繊毛虫は、温度や水分 養も困難である。そのため、繊毛虫 1 個体を顕微鏡
などの環境の変化ですぐに死滅してしまい、系統培 観察した後に、その同一個体から DNA を抽出して、

そのまま PCR (Polymerase Chain Reaction) のための鋳型として用いることは極めて有用な方法である。原生動物をうまく破碎し、PCR の鋳型となる DNA を抽出することができれば、培養が困難な原生動物でも塩基配列を解析することが可能になる。線虫では、1頭から DNA を抽出し、塩基配列を解析して生物種を同定している。そこで、本研究では、線虫の方法 (Iwahori *et al.*, 2000、Saeki *et al.*, 2003) を改良し、1個体の繊毛虫を用いての顕微鏡観察と DNA 抽出法を検討した。

[材料と方法] 土壌試料として、環境保全型農業推進地帯の有機物長期連用畑圃場の表層土を 2006 年 5 月に採取し、低温保存したものを実験に供した。この土壌をバクテリア (*Enterobacter aerogenes*) を含んだレタス浸出液に入れ、遊泳してきた繊毛虫 1 個体を実体顕微鏡下でガラスピペットを用いて単離し、スライドグラス上に乗せ、生細胞の動画を撮影して保存した。PCR には、真核生物ユニバーサル・プライマーセット (EU1F : 5'-GAAACTGCGAATGGCTCATT と EU929R : 5'-TTGGCAAATGCTTTCGC) および繊毛虫に特異的なプライマーセット (CS322F : 5'-GATGGTAGTGATTGGAC と EU929R) (Puitika *et al.*, 2007) を用いた。得られた PCR 産物は、Invisorb Spin PCRapid Kit (Invitex 社製) で精製し、塩基配列の解析を行った。

[結果と考察] 顕微鏡観察した後の繊毛虫 1 個体からの DNA 抽出法を検討した結果、下記の方法で DNA 抽出効率が高まった。実体顕微鏡下で観察しながら

水分が蒸発して繊毛虫のみが残るまで待ち、水分がなくなってきたら、約 1.5 mm 角に切ったろ紙 (no.131; ADVANTEC 社製) をピンセットでつまんで繊毛虫の上に載せ、ピンセットの先で強く押しつぶした。スライドグラスに残る繊毛虫の残渣をろ紙で拭き取った後、滅菌水 5 μ l をあらかじめ入れておいた PCR 用チューブにそのままピンセットでろ紙を移した。そこへ緩衝液 (10mM Tris-HCl pH 8.0) 4 μ l とプロテインース K を 0.1 μ g 加えて、60°C で 1 時間処理した後、95°C で 10 分加熱し、最後に -70°C で 30 分、または -20°C で 1 時間以上凍結させ、PCR のための鋳型とした。室温に戻してから PCR 反応を行ったところ、真核生物ユニバーサル・プライマーセットおよび繊毛虫に特異的なプライマーセットで増幅した。その PCR 産物の塩基配列の解析を行った結果、動画データにより形態で同定した種名と塩基配列から同定した種名が一致した。したがって、繊毛虫の同一個体から顕微鏡観察と DNA 抽出の両方を行う方法を確立することができた。

[文献]

- Iwahori, H., Kanzaki, N. and Futai, K. (2000) For. Path. 30: 157-164.
- Puitika, T., Kasahara, Y., Miyoshi, N., Sato, Y. and Shimano, S. (2007) Microbes and Environments. 22(1): 78-81.
- Saeki, Y., Kawano, E., Yamashita, C., Akao, S. and Nagatomo, Y. (2003) Soil Sci. PlantNutr. 49(2): 291-295.