

# PCR-DGGE 法による土壌線虫相解析法

Ver2.0

2008年1月21日

## 【目次】

1. 土壌試料の取り扱い	p.2
2. 土壌からの線虫分離及びサンプルの前処理	p.2
3. DNA 抽出	p.5
4. PCR	p.6
5. DGGE	p.7
6. 実例	p.8
7. トラブルシューティング	p.9
8. 参考文献	p.10

## 1. 土壌試料の取り扱い

### 【現地圃場における土壌採取】

調査圃場を代表するように、複数か所からオーガー、検土杖などを用いて深さ15 cm程度までの土壌を採取し<sup>※1</sup>、ビニール袋中で混合する。高温を避け常温で持ち帰る<sup>※2</sup>。

※1 降雨直後は、線虫の分離が悪いことがあるため、避けたほうがよい。

※2 加重により線虫がダメージを受けるため、ビニール袋などに入れた土壌はなるべく重ねない。また、室内に運ぶまで日陰に置く。その他、線虫分析用土壌試料の採取法については「線虫学実験法」<sup>※参考文献1</sup>を参照する。

### 【フルイがけ】

目開き約5 mmのフルイに通し、砂利や植物根などを除去する<sup>※3</sup>。土塊は手袋をした手で崩す。堅くて崩せないものは砂利などと一緒に除去する。攪拌後、線虫分析用に700 gを採り大きめのビニール袋(No.15、幅30、長さ45 cm、厚さ0.03 mm等)に入れる。試料はフルイがけの前後を通じて10℃に保管し、採取後3週間以内に次項の線虫分離作業を行う。

※3 加重により線虫がダメージを受けるため、作業中フルイは回収容器の上に置き、ふるった土壌の上には置かない。

## 2. 土壌からの線虫分離及びサンプルの前処理

ベールマントレイ法(図)による線虫の分離を行う。この手法は一般的なベールマンロート法に比べ、装置が単純で回収効率も高い。

### 【使用するもの】

- ・ ステンレスの網皿(家庭調理用、直径約15 cm)
- ・ トレイ(園芸用のプラスチック鉢皿、直径約15 cm)
- ・ JKワイパー<sup>®</sup>(キンバリークラーク)
- ・ 紙皿(直径約18 cm)
- ・ 線虫懸濁液の回収器具(100 ml、500 ml程度のガラス製ビーカー、50 ml遠心管など。トレイやロートの洗浄液を加えても懸濁液が収まるサイズのもの)
- ・ 洗浄ビン
- ・ 蒸留水
- ・ 室温25℃に設定できる部屋

- ・ 5 °C及び 10 °C冷蔵庫

### 【準備】

- (1) 手袋をはめ器材を作製する。2枚重ねた JK ワイパー®を網皿の端より 15 mm ほど出るくらいの大きさに切り、網皿にはめる。
- (2) 室温を 25°Cに設定する。
- (3) 採取後 10 °Cで保管し3週間以内の土壌試料を用いる。使用直前に攪拌<sup>※4</sup>しておく。  
<sup>※4</sup> 激しい攪拌は線虫を殺すので注意する。
- (4) 蒸留水を少し(200-300 ml 程度)入れたトレイに網皿を載せ、水をワイパーにしみこませる。さらに水を補充するとともに、大きな気泡を除去する。

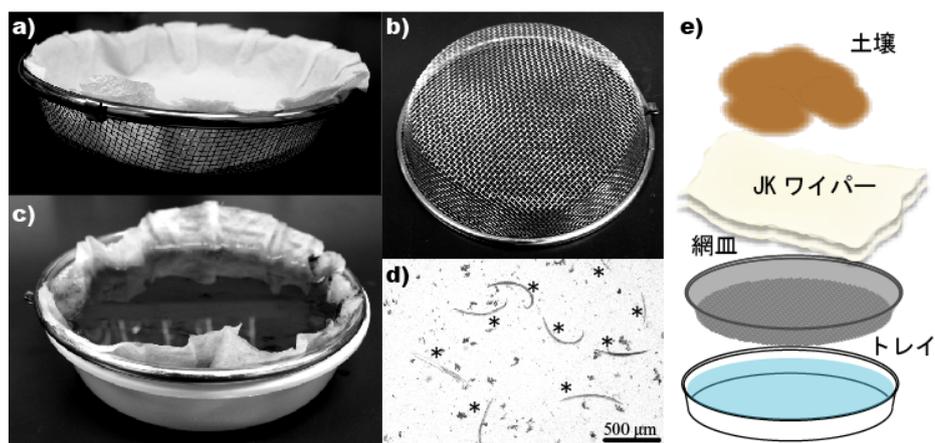


図 ベールマントレイの実例: a) JK ワイパーをセットした網皿、b) 網皿(裏面)、c) 線虫分離状態、d) 分離された線虫(\*), e) 模式図

### 【手順】

- (1) 攪拌した生土 80 g をワイパー上にまんべんなく散布し、洗浄ビンを用いて蒸留水を追加する<sup>※5</sup>。葉さじ等で土壌をトレイ全体へ広げる<sup>※6</sup>。土壌全体が完全に水没するまでさらに水を追加する。  
<sup>※5</sup> 土壌には直接かけないようにする。  
<sup>※6</sup> 必要以上に土壌を攪拌すると線虫が遊出しにくくなるので注意する。
- (2) トレイ、網皿がほぼ水平になり、土壌全体が浸漬されたのを確認後、ワイパーの縁を内側に折り込む(トレイの外へ水が滴るのを防ぐため)。その後、紙皿でフタをする。

- (3) 48 時間の静置後、以下の手順で線虫サンプルを回収する。
- 1) 網皿を持ち上げて水切れを待たずに一気に除去する<sup>※7</sup>。  
※7 滴る水が他のトレイに入らないように注意する。
  - 2) 3割ほど残してトレイ内の水を回収容器に注入する。トレイ内を濯ぐようにして残った水を攪拌し、同じ容器へ入れる。
  - 3) 新たな蒸留水をトレイに入れ、再び濯いだ後、回収容器へ注ぎ込む。同じ作業をもう一度行い、容器を5 °Cで保管する。これをサンプルとする。
- (4) 回収容器を静置し、線虫が沈降するのを待って上澄みを除去し、サンプル液を濃縮する。最終的に 15-50 ml の遠心管に回収するまでこの作業を繰り返す。線虫の沈降は、半日から一晩（懸濁液の量による）の静置等によって行う。この後もサンプルは5 °Cで保存するが、早めに下記の作業を行う。
- (5) 線虫個体数の推定。必要に応じてサンプル液を希釈または濃縮し、プラスチック製品への線虫の付着を抑えるため Tween20 を添加し（終濃度 0.05 %）、攪拌<sup>※8</sup>した後、一部を取って<sup>※9</sup> 実体顕微鏡下で線虫個体数を計数する。1サンプルにつきこの作業を最低2回行い、その平均値をもとにサンプル中の線虫個体数を推定する。
- ※8 ピペッティングや容器の振盪によるサンプル液の攪拌を激しく行くと線虫体が壊れるので注意する。容器を回してサンプル液が回転するように行うと良い。
- ※9 ピペッターを用いてサンプル液を採取する場合、大型の線虫も通過できるよう先端径の大きい（1-2 mm 程度）、あるいは先端を切ったピペットチップを用いる。
- (6) 原生動物、ミミズ等の除去。(5)の後、一晩静置（5 °C）等によりサンプル内の線虫を沈降させる。その後、原生動物を遊出させるため常温に戻し、上澄みを吸引除去する。5 ml 程度になったサンプルをシャーレ等に移し、顕微鏡下でヒメミミズや夾雑物を除去する。
- (7) サンプルを 10-15 ml の遠心管に回収する。残った線虫をできるだけ回収するため、Tween20 を添加した 5 ml 程度の蒸留水で(6)のシャーレを洗い、洗浄液も遠心管に移す。
- (8) 遠心による沈静（5,800 g、5分）及び上澄みの除去による濃縮を繰り返し、5-20 ml 程度になった段階で、300 頭相当の線虫懸濁液をピペットで 1.5 ml チューブに移し、遠心する（5,800 g、5分）。ピペットで静かに上清を吸い取り、40  $\mu$ l 程度にまで減らす。直ちに DNA 抽出を行わない場合は-20 °C以下で冷凍保存する。また、可能であればサンプルの一部を形態同定用に保存する。線虫を熱殺し、TAF 液（トリエタノールアミン 40 ml、40 %フォルマリン 140 ml、蒸留水 820 ml を混合）を線虫懸濁液に等量加えて固定後、室温で保存する。

### 3. DNA 抽出

線虫体からの DNA 抽出には破砕効率を最適化した破砕チューブを用いる。DNA の精製には市販キットを用いる。

#### 【使用するもの】

- ・ 破砕チューブ  
2 ml マイクロチューブ (アシスト社製、型番 72.693) に  $\phi$  0.1 mm ガラスビーズ (TOMY 精工、型番 GB-05、滅菌) 0.1 g、 $\phi$  1.2 mm ジルコニアシリカビーズ (バイオメディカルサイエンス社製、型番 ZS12-0001、滅菌) 4 個を入れたものをサンプル数分用意しておく。
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ (滅菌)
- ・ 20 % (w/v) スキムミルク  
スキムミルク (培養基質用) を超純水に定溶後、DNA の持ち込みを防ぐため、あらかじめオートクレーブで 115 °C-5 分の加熱処理をする。若干褐変するが効果に問題はない。2 ml 程度のスクリューキャップチューブに小分けに作製して -20 °C で保存しておく。
- ・ Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega 社製、型番 A2360)
- ・ Nuclei Lysis Solution (Promega 社製、型番 A7941、上記キット添付分で足りない場合に購入)
- ・ 特級 95 % エタノール (上記キットの wash solution に添加する)
- ・ 細胞破砕装置 (FastPrep 100A (BIO101)、ビードビーター (セントラル科学貿易) など)

#### 【抽出手順】

- (1) 1.5 ml チューブに回収した 300 頭相当の試料に 200  $\mu$ l の Nuclei Lysis Solution (NLS、Promega 社製 Wizard® SV Genomic DNA Purification System に添付) を加え、破砕チューブにマイクロピペットで移す。さらに 1.5 ml チューブを 200  $\mu$ l の NLS でリンスし破砕チューブに入れる。
- (2) 50  $\mu$ l の 20 % スキムミルク、50  $\mu$ l の 0.5 M EDTA (キット添付) を加える。良く攪拌した後、-80 °C で 15 分以上冷凍する。
- (3) FastPrep 100A にチューブをセットし、6.5 m/seq、155 秒 (45 秒 3 回、20 秒 1 回) 振とうする。
- (4) 消泡のため 13,000 g で 1 分間遠心する。
- (5) キットに付属の Wizard SV Lysis Buffer を 500  $\mu$ l 加え、攪拌する。
- (6) 13,000 g で 1 分間遠心する。

- (7) SV メンブレンカラム を新しい 2 ml チューブ (キット添付) にセットし、カップ部に破碎液の上清 800  $\mu$ l を加え、13,000 g で 3 分間遠心する。
- (8) 2 ml チューブの液をデカントあるいはピペッターで捨てる。
- (9) 650  $\mu$ l の wash solution (EtOH 添加済み) を加え、13,000 g で 1 分間遠心する。
- (10) (8)、(9) の工程を 4 回行い、最後に (8) を行った後に、メンブレンに残った液を完全に除去するために、13,000 g で 3 分間遠心する。
- (11) 新しい 1.5 ml マイクロチューブにメンブレンカラムを移す。
- (12) 250  $\mu$ l の Nucleace-Free Water (キット添付) を加え、1 分間置き、13,000 g で 1 分間遠心する。
- (13) 再度 250  $\mu$ l の Nucleace-Free Water を加え、13,000 g で 3 分間遠心する。
- (14) メンブレンカラムを捨て、キャップを  $-20$   $^{\circ}$ C 以下で冷凍保存する。

## 4. PCR

PCR は、18S rRNA 遺伝子の前半部を標的とする以下のプライマーセットを用いる。このプライマーセット<sup>※参考文献 2,3)</sup>は線虫種全般に対応するが、糸状菌や原生動物、環形動物の一部なども増幅してしまう。しかし、一般にベールマン法で得られたサンプルでは線虫が優占するので、DGGE を行った場合でも線虫以外の生物種のバンドはマイナーなものとして現れる。

**Forward Primer**: SSU18A

5'-aaa gat taa gcc atg cat g-3'

**Reverse Primer**: SSU9R-GC

5'-cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc ggc ccg ccg ccc ccg ccc gag ctg gaa tta ccg cgg ctg-3'

\* 下線部は GC クランプ

### 【PCR 条件】

タカラバイオ「Prime<sup>®</sup> STAR HS」を使用し、以下の条件で反応を行う。

・反応液組成 (25 µl 反応系)

	添加量	終濃度
滅菌蒸留水	5.5 µl	
5x Buffer	5.0 µl	1x
dNTPs (2.5mM)	2.0 µl	0.2 mM
SSU18A (20 µM)	0.6 µl	0.5 µM
SSU9R/GC (20 µM)	0.6 µl	0.5 µM
Prime Star HS	0.25 µl	2.5 U/100 µl
Template DNA	10.0 µl	

・反応サイクル

98°C-3 分→[98°C-10 秒, 54°C-15 秒, 72°C-40 秒]×27→72°C-10 分

#### 【PCR 産物の確認および精製】

PCR 産物 5 µl をアガロースゲルで電気泳動して期待サイズ (約 590 bp) の産物が得られていることを確認する。残りの産物は市販の PCR 産物精製キット等で精製した後、DNA 濃度を測定しておく。すぐに DGGE を行わない場合、精製産物は -20 °C で保存する。

## 5. DGGE

DGGE には Bio-Rad 社製の DCode™ システムを用いる。変性剤ゲルの組成 (下記) 及び泳動条件は線虫分析に適したものをを用いるが、ゲル板の作製、泳動及び染色の手順は微生物分析の場合と同様なので「土壌細菌・糸状菌相解析法」を参照のこと。なお、線虫用の泳動条件は、ゲル濃度 6%、変性濃度勾配 20%→50%、60°C、75V、16 時間。また、本マニュアルの解析条件に最適化した DGGE マーカーが(株)ニッポンジーンより販売される予定。

表 線虫分析用 DGGE 用ゲルストック溶液の組成<sup>\*10</sup>

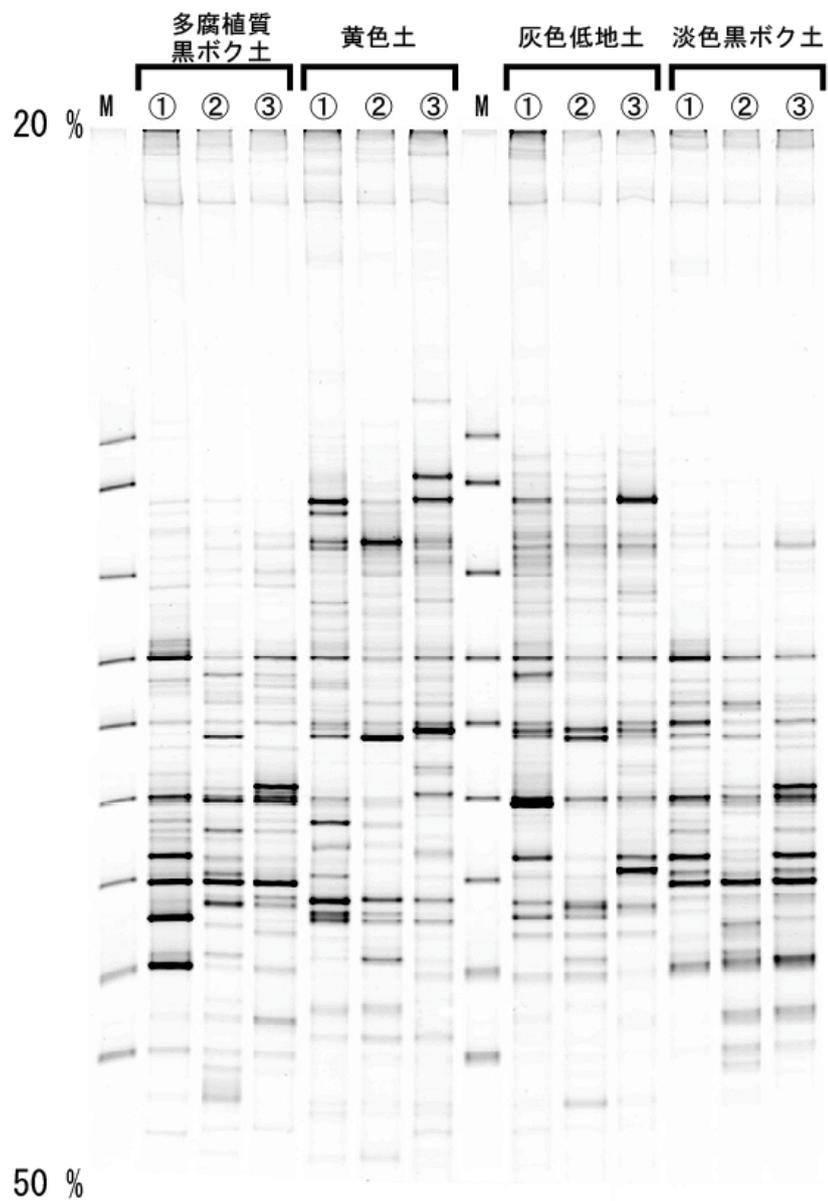
組成	20%変成	50%変成
40% アクリルアミド/ビス 37.5:1	15 ml	15 ml
50x TAE	2 ml	2 ml
ホルムアミド (deionized)	8 ml	20 ml
尿素	8.4 g	21 g
超純水	to 100 ml	to 100 ml

\*10 変性濃度 100%は尿素 7 M, ホルムアミド 40 %に相当。

## 6. 実例

### 【線虫相のDGGE】

土壌(中央農業研究センター長岡一成氏提供。番号は肥培管理の違いを示す)から、本マニュアルに従い、線虫DNAを抽出し18S rRNA遺伝子のPCR産物を精製した後、各100 ng相当量(20wellコームを使用)を泳動した。SYBR<sup>®</sup> Green I で染色後、Pharos FX (Bio-Rad) で画像化。M は線虫用DGGE マーカー。



6 % アクリルアミドゲル、60 °C、75 V で 16 時間泳動

## 7. トラブルシューティング

ここでは線虫関連のトラブルに絞って記述した。PCR や DGGE 関連の一般的トラブルについては「土壌細菌・糸状菌相解析法」を参照のこと。

### 【線虫の分離】

#### ・線虫が少ない

→降雨直後の土壌では、抽出効率が低下することがある。別途試料採集する。また、水田などの重粘土質の土壌でも抽出効率が低下する。この場合、サンプルあたりのトレイの数(供試土壌の量)を増やすか、密度勾配遠心分離法<sup>※参考文献 1)</sup>などを行う。

### 【DNA 抽出関連】

#### ・DNA が得られない

→濃縮工程中に線虫が失われた可能性がある。廃液を一部採取し、実体顕微鏡下で線虫が大量に含まれていないかどうか確認する。

→破碎時の振とう強度・時間が最適でない可能性がある。破碎装置の設定を確認の上、試料をカラムにアプライした後の残渣を実体顕微鏡で観察し、線虫体の破碎状況を観察する。破碎が不完全であれば、処理時間を延長するか振とう強度を上げる。ただし、過度に破碎するとDNA が断片化してしまうので注意する。

### 【DGGE関連】

#### ・バンドがぼんやりする。

→*Caenorhabditis*属、*Diploscapter*属線虫の塩基配列は、本実験系ではバンドを形成せずスミアになる。これらの線虫の存在を確認する場合は、特異的PCRなどを行う必要がある。

## 8. 参考文献

- 1) 日本線虫学会 編 (2004) 線虫学実験法, 日本線虫学会, 247p, つくば.
- 2) Blaxter M, Ley P, Gareys J, Liu L, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren J, Mackey L, Dorris M, Frisse L, Vida J and Thomas K (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71-75.
- 3) Okada, H. and Oba, H. (2008) Comparison of nematode community similarities assessed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and by morphological identification. *Nematology* 10, 689-700.
- 4) 大場、岡田、PCR-DGGE 法による土壌生物群集解析法 (2)、土と微生物、62 (1)、69-73. (2008)