

4. 基本的な実験操作

1) 食品からの乳酸菌の分離・簡易同定に関する操作

(独) 農研機構 畜産草地研究所 鈴木 チセ

はじめに

乳酸菌はヨーグルト、チーズや漬物等の発酵食品として人間が古くから利用してきた微生物であり、近年、健康への関心の高まりから、乳酸菌の健康効果については高い関心が寄せられている。プロバイオティクスは「適量摂取したときに宿主に有益な効果をもたらす生きて微生物」と定義されており、整腸作用はもとより、感染防御や免疫調節作用といった自然防御分野への関心が強まっている。一方で乳酸菌が生産するペプチドやアミノ酪酸などの発酵産物の機能性も注目を集めている。ユニークな機能性をもつ乳酸菌を得るためには、まず菌株を集める必要がある。本稿はそのスタートとしての乳酸菌の分離と簡易同定について記す。

(1) 乳酸菌の分離

準備するもの

1. 乳酸菌を含むと思われる食品 (注意点等参照)
2. 実験装置・器具
 - ・プラスチックシャーレ (滅菌済み)
 - ・試験管 (蓋付き): ガラス試験管にアルミ等のキャップをつけてオートクレーブするか、あるいはディスポ製品でもよい。スモールスケールなら 1.5ml のマイクロチューブでも代用可能
 - ・インキュベーター (30°C または 37°C)
 - ・クリーンベンチ
 - ・オートクレーブ
 - ・顕微鏡
3. 試薬
 - ・寒天培地: 筆者らは主に Difco™ Lactobacilli MRS Broth を用いている。分離したい乳酸菌に合わせて選択すればよい。例えばシャーレ 20 枚分なら、400ml ミリ Q 水を培地びんに入れ、MRS 培地粉末 22g を加えて溶解し、炭酸カルシウム 4g (1%)、寒天 6.4g (1.6%) を加えて、オートクレーブにより 121°C、15 分滅菌する。
 - ・液体培地: 100ml ミリ Q 水を培地びんに入れ、MRS 培地粉末 5.5g を培地びんに加え溶解し、オートクレーブ滅菌する。蓋付き試験管に分注 (15ml 容なら 5-10ml, 5ml 容なら 3ml 程度) してから滅菌してもよいし、後から滅菌した試験管

(またはディスク製品)に分注してもよい。

- ・グリセロールストック用培地：90ml ミリ Q 水を培地びんに入れ，MRS 培地粉末 5.5g，10ml グリセロールを培地びんに加え溶解し，オートクレーブ滅菌する。使用時に凍結用バイアルに分注する。
- ・滅菌食塩水：食塩 0.85%の食塩水を作成する。蓋付き試験管に 4.5ml 入れたもの×6×サンプル数を用意し，オートクレーブする。(培地びん等で滅菌して滅菌済み試験管に分注してもよい。)

プロトコール

1. 寒天培地はオートクレーブ後，45°C 程度に保温しておく。前もって作っておいた場合は電子レンジ等で溶解した後，同様に保温する。
2. クリーンベンチ内にて，食品 0.5g を 4.5ml 滅菌食塩水に入った試験管に入れて懸濁する(食材によってはスケールアップした方が操作しやすい場合もある)。
(オプション) 2. の懸濁液を 5 μ l とって顕微鏡観察しておくかどうか、およその細菌数がわかって希釈列作製の参考になる。
3. 2. から 0.5ml とって 4.5ml の滅菌食塩水に加え，順次希釈列を作製する。ここでは 6 本なので 10⁶ 希釈したことになる。
4. 滅菌シャーレに希釈倍率を書き，各希釈液から 100 μ l を入れる。
5. 保温しておいた寒天培地を 20ml 程度注ぎ，よく混合してから静置する。寒天が固まったら上下反転して蓋についた結露を乾かす。
6. シャーレをクリーンベンチから出し，嫌気ジャーに入れ，脱酸素剤(アネロパックなど)とともに封入して 30°C または 37°C で一晩培養する。
7. 培養後，クリーンベンチ内にて，コロニーを観察し，周囲の炭酸カルシウムが溶解している単一コロニー(酸生成)を滅菌楊枝あるいは白金耳で穿刺し，MRS 液体培地に植菌する。
8. 30°C または 37°C で一晩培養する。
9. 長期保存には上記培養液 10 μ l をグリセロールストック用培地 1ml に懸濁し，-80°C で保存する。

(2) 乳酸菌の簡易同定

準備するもの

1. 実験装置・器具
 - ・ねじ口試験管(蓋付き)：乳酸菌の液体培養に用いる。ディスクの試験管でもよいが，ダーラム管を入れる場合はガラス試験管の方が見やすい。
 - ・ダーラム管：ダーラム管を入れた試験管に 5-10ml の MRS 培地を入れオートクレー

ーブする。ダーラム管中の気体はオートクレーブ中に抜ける。

- ・ インキュベーター
- ・ 顕微鏡

2. 試薬

- ・ 培地：Lactobacilli MRS medium (Difco)
- ・ 過酸化水素水：3%に希釈
- ・ 染色液：フェイバーG (日水製薬)

プロトコール

1. グラム染色

- 1) 一晚培養した菌液 10 μ l をピペットでスライドグラス上に 1cm 平方くらいに塗りつける。乾燥する。
- 2) 火炎に 2-3 回通して固定する (焦がさないように)。
染色液 A (ビクトリアブルー) を滴下, 1 分放置後スライドグラスの裏から水洗する (グラム陽性染色)。
- 3) 染色液 B (フクシン) を滴下, 1 分放置後スライドグラスの裏から水洗する (対比染色)。
- 4) 脱色液を滴下, 青色が溶出しなくなるまで置き, スライドグラスの裏から水洗後, 乾燥する。
- 5) 顕微鏡で観察する。青ければグラム陽性, 赤ければグラム陰性。乳酸菌はグラム陽性である。

2. カタラーゼ試験

- 1) 一晚培養した培養液 (5ml) を遠心して上清を捨てる。
- 2) 残った菌体に 3%過酸化水素水を 1ml 添加する。
- 3) 発泡の有無を観察する。何もおこらなければカタラーゼ陰性。乳酸菌はカタラーゼ陰性である。

3. ガス生成

- 1) 一晚培養した培養液を培地の入ったダーラム管入り試験管に 5-10 μ l 接種し, 30 $^{\circ}$ C または 37 $^{\circ}$ C で一晚培養する。
- 2) ダーラム管中に気体がたまっていればガス生成有り, ヘテロ発酵をする乳酸菌と推定できる。

(3) 16S リボソーム DNA 配列分析

準備するもの

1. プライマー

- ・ 27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
- ・ 1406R 5'-ACG GGC GGT GTG TAC-3'

2. 実験装置・器具

- ・ 核酸電気泳動装置 (Mupid など)
- ・ サーマルサイクラー
- ・ 微量高速遠心機
- ・ 減圧濃縮装置
- ・ ABI PRISM 310 Genetic Analyser 等

3. 試薬

- ・ PCR 用酵素 : KOD plus (TOYOBO)
- ・ PCR 産物精製キット : QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)
- ・ シーケンス用試薬 : BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- ・ アガロースゲル : 1g アガロースに 100ml 1×TAE (40mM トリス/酢酸, 1mM EDTA, pH8.0) を加え, 電子レンジ等で溶解する. 泳動バッファーも 1×TAE.

プロトコール

シーケンサーが利用できない場合は受託解析を利用してもよい. 菌株を渡して解析してもらう方法と, 3. の PCR 産物を渡して解析してもらう方法がある.

1. 乳酸菌を一晚培養した培養液を 1/100 に滅菌ミリ Q 水で希釈する.
2. 16S リボソーム DNA を増幅するプライマー(27F, 1406R)を用い, 1) をテンプレートとして PCR を行う.

	×1	×10
KOD 10× buffer	2.0	20
dNTP	2.0	20
MgCl ₂	0.8	8
27F (20μM)	0.6	6
1406R (20μM)	0.6	6
Water	11.6	116
KOD (polymerase)	0.4	4
計	18.0μl	180μl

上記反応液を 18μl ずつ PCR チューブに分注し, 1) の希釈液 2μl を加えて混合後, 94°C 3 分- [94°C 15 秒-45°C 35 秒-68°C 2 分] ×35 サイクル-68°C 7 分のプ

プログラムで PCR を行う。

3. 1%アガロースゲル(100V 30 分泳動)で約 1.4kb のバンドを確認するとともに、PCR 産物を精製する。(QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)のマニュアル参照。)
4. 精製した PCR 産物をテンプレートとしてシーケンス反応を行い、部分配列を解析する。

	×1	×10
Big Dye	2.0	20
5×sequencing buffer	1.0	10
water	1.4	14
27F 1μM	1.6	16
計	6.0μl	60μl

上記反応液を 6μl ずつ PCR チューブに分注する。3) の精製 PCR 産物を 4μl 加えてシーケンス反応 [96°C 10 秒-50°C 5 秒-60°C 4 分] ×25 サイクル-4°C 保存のプログラムを行う。

5. シーケンス反応の精製
 4. の反応液 10μl に 2.5μl の 12.5mM EDTA と 30μl の 100% エタノールを加え、混合後 15 分室温に放置する。その後 12,000rpm, 15 分間遠心し、上清を捨てる。100μl の 70%エタノールを加え、再度 12,000rpm, 15 分間遠心し、上清を捨てる。15 分間減圧乾燥する。
6. 13μl のホルムアミド (シーケンス用) に溶解し、95°C, 2 分間加熱変性する。この溶液をシーケンスに用いる (このステップはシーケンサーによって異なるのでマニュアルを参照)。
7. シーケンスが読めたら、DDBJ 等のデータベースで blast 検索する。プログラムは blastn, 検索対象データベースは 16S rRNA にチェックを入れる。

(4) 種特異的 PCR

準備するもの

1. プライマー

・ *Lactobacillus curvatus/sakei* 用

5'Lb.cur-sakei 5'-GCT GGA TCA CCT CCT TTC-3'

3'Lb.sakei 5'-ATG AAA CTA TTA AAT TGG TAC-3'

3'Lb.cur 5'-TTG GTA CTA TTT AAT TCT TAG-3'

・ *Lactobacillus plantarum/pentosus/paraplantarum* 用

pREV	5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3'
planF	5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3'
pentof	5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3'
paraF	5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3'

2. 実験装置・器具

- ・ 核酸電気泳動装置 (Mupid など)
- ・ サーマルサイクラー
- ・ 微量高速遠心機
- ・ 恒温槽 (37°C, 56°C)

3. 試薬

- ・ DNA 精製用キット : DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)
- ・ DNA 精製用試薬 : リゾチーム, Triton X-100, 2×TE buffer
- ・ PCR 用酵素 : KOD plus (TOYOBO)
- ・ アガロースゲル : 1.5g アガロースに 100ml 1×TAE (40mM トリス/酢酸, 1mM EDTA, pH8.0) を加え, 電子レンジ等で溶解する. 泳動バッファーも 1×TAE.

プロトコール

1. 乳酸菌 DNA の調製

種特異的 PCR 用の DNA 調製. 簡便なのでキットを使用しているが, 他の DNA 調製法でも可. 精製した DNA を使った方が再現性がよい.

1) MRS 液体培地で菌を一晩培養する.

2) DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) のグラム陽性細菌の DNA 調製プロトコールに従い, DNA を調製する.

(1) 培養液 1ml (1×10^9 cells) を 8,000rpm 5 分間遠心し, 集菌する. 上清は捨てる.

(2) 180μl のリシス溶液 (2×TE (20mM Tris-HCl, 2mM EDTA) 1ml に 20 mg リゾチーム, 12μl Triton X-100 を加えて調製) を菌体に加え, 懸濁後, 37°C, 30 分インキュベートする.

(3) 25μl の Proteinase K (キット添付) と 200μl の buffer AL を加え, 混合後, 56°C, 30 分インキュベートする.

(4) 200μl の 100%エタノールを加える.

(5) 以下プロトコールに従って DNA のカラム精製を行う.

(6) OD 260 nm の吸光度を測定し DNA 濃度 ($OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$) を決定する.

2. 種特異的 PCR1 (*Lactobacillus curvatus* と *Lb. sakei* の識別) ¹⁾

1) 以下の試薬とプライマーを混合する (各菌株で 2 セット反応)。

	×1
KOD 10x buffer	2.0
dNTP	2.0
MgCl ₂	0.8
5'Lb.cur-sakei (20μM)	0.3
3'Lb.cur または 3'Lb.sakei (20μM)	0.3
Water	12.2
KOD (polymerase)	0.4
計	18.0μl

2) PCR チューブに上記溶液を 18μl 分注し, DNA 溶液 2μl (20-30ng) を加え 94°C 3 分- [94°C 15 秒-53°C 35 秒-68°C 2 分] ×35 サイクル-68°C 7 分のプログラムで PCR を行う。1.5%アガロースゲル電気泳動 (100V, 30 分) で PCR 産物を泳動してバンドの検出を行う。

3) *Lb. curvatus* か *Lb. sakei* のプライマーでどちらかにバンド (200bp) ができれば, *Lb. curvatus* あるいは *Lb. sakei* と考えられる (16S rDNA の結果を相補する)。

3. 種特異的 PCR2 (*Lactobacillus plantarum* と *Lb. pentosus*, *Lb. paraplantarum* の識別) ²⁾

1) 4 つのプライマー, plan (20μM) 1μl, pent (20μM) 2μl, para (20μM) 2μl, pREV (20μM) 2μl と滅菌水 13μl を混合する (Primer mix)。

2) 以下の試薬とプライマーを混合する。

	×1
KOD 10x buffer	2.0
dNTP	2.0
MgCl ₂	0.8
Primer mix	2.5
Water	10.3
KOD plus	0.4
計	18.0μl

- 3) PCR チューブに上記溶液を 18µl 分注し, DNA 溶液 2µl (20-30ng) を加え 94°C 3 分- [94°C 30 秒-54°C 10 秒-72°C 30 秒] ×30 サイクル-72°C 5 分のプログラムで PCR を行う. 1.5%アガロースゲル電気泳動 (100V, 30 分) で PCR 産物を泳動してバンドの検出を行う.
- 4) *Lb. plantarum* 300bp, *Lb. pentosus* 200bp, *Lb. paraplantarum* 100bp のいずれかのバンドができれば, 対応する菌種と考えられる (16S rDNA の結果を相補する).

注意点等

市販の発酵乳製品や漬け物等はスターター乳酸菌を使っており, これらを分離して用いることは倫理上避けた方がよい. 海外遺伝資源を利用する場合には, 1993 年に発効した生物多様性条約の原則を踏まえて, 提供国政府の事前の同意を得ることが必要である. これ以前に出版された成書/マニュアルではこの点について記載がないので注意が必要である. 乳酸菌の分離源となる食品は限られるが, 国内の自家製の発酵食品, 生乳, 果物等は比較的入手が容易であろう. ある食品に大多数に存在する菌ばかりでなく, 混在する少数の菌を得ることも必要かもしれない. 工夫次第で多様な乳酸菌が収集できるはずである. 糞便は魅力的な乳酸菌の分離源であるが, 操作については本マニュアル (Ⅱ) の「腸内細菌に関する実験操作」を参照されたい.

参考文献

- 1) Berthier, F. and Ehrlich, S. D., Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int. J. Sys. Bacteriol.* ,**49**, 997-1007 (1999).
- 2) Trriani, S., Felis, G.E. and Dellaglio, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* ,**67**, 3450-3454 (2001).
- 3) 小崎道雄監修, 内村 泰, 岡田早苗著, 乳酸菌実験マニュアル - 分離から同定まで (朝倉書店, 東京), (1992).