

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-333777
(P2001-333777A)

(43) 公開日 平成13年12月4日 (2001.12.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2000-154289 (P2000-154289)

(22) 出願日 平成12年5月25日 (2000.5.25)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年3月5日
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会2000年
度大会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 501203344

独立行政法人 農業技術研究機構
茨城県つくば市観音台3-1-1

(72) 発明者 野村 将

茨城県つくば市竹園3丁目20-1 503-202

(72) 発明者 小林 美穂

茨城県つくば市並木2-14 301-1004

(72) 発明者 岡本 隆史

茨城県つくば市松代5-9-5 626-1

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチドおよびそれを用いた乳酸菌の菌種同定法

(57) 【要約】

【課題】 乳酸菌の同定・検出のために有用なオリゴヌクレオチドおよびそれを用いた乳酸菌の同定・検出方法を提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号1および2、配列番号3および4、配列番号5および6記載の塩基配列の組み合わせまたはこれら配列の1個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失した塩基配列の組み合わせからなるオリゴヌクレオチド並びに上記オリゴヌクレオチドの1または2以上をプライマーとして使用することを特徴とする乳酸菌の同定・検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 および 2 に記載の塩基配列の組み合わせまたはこれら塩基配列の 1 個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失した塩基配列の組み合わせからなるオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】 配列表の配列番号 3 および 4 に記載の塩基配列の組み合わせまたはこれら塩基配列の 1 個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失した塩基配列の組み合わせからなるオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】 配列表の配列番号 5 および 6 に記載の塩基配列の組み合わせまたはこれら塩基配列の 1 個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失した塩基配列の組み合わせからなるオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの 1 または 2 以上を使用することを特徴とする乳酸菌の同定・検出方法。

【請求項 5】 被検菌のゲノム DNA を鋳型とし、請求項 1～3 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの 1 または 2 以上をプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応を行う工程を含む請求項 4 記載の乳酸菌の同定・検出方法。

【請求項 6】 被検菌のゲノム DNA を鋳型とし、請求項 1～3 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの 1 または 2 以上をプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応によって増幅した DNA 断片中における配列表の配列番号 7 記載の塩基配列の有無を検出することを特徴とする請求項 4 記載の乳酸菌の同定・検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は乳酸菌の同定・検出のためのオリゴヌクレオチドおよびそれを用いた乳酸菌の同定・検出方法に関し、詳しくは乳酸菌のグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子に特異的な塩基配列およびそれを用いて特定の乳酸菌を正確、迅速、かつ簡便に同定・検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】乳酸菌ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) は乳製品製造、特にチーズ製造に必須で、発酵スターターとして原料乳に接種される。乳に接種された乳酸菌は乳酸発酵を行い、製造に必要な pH 環境を作り出し、チーズの物性を改善し、雑菌による汚染を防止する。また、様々な酵素を放出して熟成過程にも関与している。ラクトコッカス・ラクチスは、その微生物学的性状の違いからラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) とラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) の二亜種に分類される。さらに、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスの中でジアセチルを生成するものを、ラクトコッカス・ラクチス サブス

ピーシーズ ラクチス バイオバラエティー ジアセチラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*) として区別している。

【0003】チーズ用のスターターとしては、酸生成力が適当である、チーズフレーバーを生成する、高温 (40) で生育しない等の性質がチーズ製造に適しているラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスが好適なものとして使用されている。また、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス バイオバラエティー ジアセチラクチスも独特のフレーバーを付与するために、スターターとして用いられる場合がある。微生物による風味の形成は同じ菌種であっても株ごとに異なるため、さらなる利用価値の高い菌株を求めて、現在でも世界各地の伝統的な発酵乳製造現場から乳酸菌の分離が行われている。分離された菌株については、菌種の同定が必要不可欠である。

【0004】通常、菌種の同定は、Bergey's manual of systematic bacteriology にしたがって被検菌の鏡検による形態観察および生理・生化学的試験、すなわち表現形質によって行われている。しかしながら、表現形質を基にした同定法は非常に煩雑で判定に熟練と技能を要し、多大な時間と労力を要する。そのため、近年においては微生物の DNA 情報を解析する手法が開発されてきた。16S rDNA の塩基配列が決定され、また DNA-DNA ホモロジーを調べるハイブリダイゼーションプローブやポリメラーゼ連鎖反応法 (以下、PCR と略記することがある。) 用の DNA プライマーが開発された。ラクトコッカス・ラクチスにおいても、菌種特異的なハイブリダイゼーションプローブや DNA プライマーが開発された。

【0005】また、ラクトコッカス・ラクチスの亜種判別には、アルギニンデヒドロゲナーゼ活性を検出するのが一般的であるが、最近になって α -アミノ酪酸生成能の表現型によって亜種が判別できることが明らかとなり、この性質を用いた亜種判別法が開発された (特許第 3018165 号)。 α -アミノ酪酸は、L-グルタミン酸からグルタミン酸脱炭酸酵素の作用によって生成するアミノ酸である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】DNA-DNA ハイブリダイゼーションは長時間を要する上に、操作が煩雑である等の問題点があった。また、ラクトコッカスの亜種に特異的な DNA プライマーは存在するが、表現形質の違いを反映したものではないため、一部の菌株で表現形質による分類と DNA 情報による分類に違いが生じ、混乱を生んでいる。

【0007】本発明の目的は、乳酸菌ラクトコッカス・ラクチスを亜種レベルまで正確、迅速、かつ簡便に同定・検出することができる菌種特異的なプライマーを提供することにある。さらに、本発明は該プライマーを用いた

乳酸菌菌種の同定・検出方法を提供することも目的としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、乳酸菌ラクトコッカス・ラクチスに特異的な塩基配列を有するDNAプライマーと、これを用いてPCR反応を行うことによって、乳酸菌を簡便、迅速、かつ正確に同定・検出する方法を提供するものである。すなわち、本発明者は、前記のラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスおよびラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズクレモリスのグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子を解析し、表現型の差異が遺伝子の変異に起因することを解明した。本発明は、この遺伝子変異による菌種特異的な配列を検出することができるDNAプライマーと該プライマーを用いた乳酸菌菌種の同定・検出方法である。

【0009】請求項1に記載の本発明は、配列表の配列番号1および2に記載の塩基配列の組み合わせまたはこれら塩基配列の1個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失した塩基配列の組み合わせからなるオリゴヌクレオチドである。請求項2に記載の本発明は、配列表の配列番号3および4に記載の塩基配列の組み合わせまたはこれら塩基配列の1個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失した塩基配列の組み合わせからなるオリゴヌクレオチドである。請求項3に記載の本発明は、配列表の配列番号5および6に記載の塩基配列の組み合わせまたはこれら塩基配列の1個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失した塩基配列の組み合わせからなるオリゴヌクレオチドである。

【0010】請求項4に記載の本発明は、請求項1～3のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの1または2以上を使用することを特徴とする乳酸菌の同定・検出方法である。請求項5に記載の本発明は、被検菌のゲノムDNAを鋳型とし、請求項1～3のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの1または2以上をプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応を行う工程を含む請求項4記載の乳酸菌の同定・検出方法である。請求項6に記載の本発明は、被検菌のゲノムDNAを鋳型とし、請求項1～3のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの1または2以上をプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応によって増幅したDNA断片中における配列表の配列番号7記載の塩基配列の有無を検出することを特徴とする請求項4記載の乳酸菌の同定・検出方法である。

【0011】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳しく説明する。本発明による乳酸菌の菌種同定・検出方法の対象となる被検菌は、乳酸菌ラクトコッカス・ラクチスの亜種であるラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスおよびラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズクレモリスである。本発明の方法においては、これらの菌種を同定・検出するために、3組のオリゴヌ

クレオチドの組み合わせの中から選択したものをプライマーとして用いる。

【0012】配列表の配列番号1～2に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスの菌種同定に用いるオリゴヌクレオチドプライマーであり、該菌種のグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子に特異的な配列を含んでおり、被検菌がラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスである場合にのみDNAが増幅される。増幅されるDNAは996bpである。配列番号1記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをgadBLFW（以下、LFWと略記することがある。）と、配列番号2記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをgadBLRV（以下、LRVと略記することがある。）と、それぞれ名付けた。なお、LFWとLRVは、データベースであるDDBJにAccession No.AB010789として登録されているグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子配列の1122～1149、2117～2092をそれぞれ基にして設計したものである。

【0013】配列表の配列番号3～4に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズクレモリスの菌種同定に用いるオリゴヌクレオチドプライマーであり、該菌種のグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子に特異的な配列を含んでおり、被検菌がラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズクレモリスである場合にのみDNAが増幅される。増幅されるDNAは996bpである。配列番号3記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをgadBCFW（以下、CFWと略記することがある。）と、配列番号4記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをgadBCRV（以下、CRVと略記することがある。）と、それぞれ名付けた。なお、CFWとCRVは、データベースであるDDBJにAccession No.AB033218として登録されているグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子配列の393～420、1388～1363をそれぞれ基にして設計したものである。

【0014】配列表の配列番号5～6記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスおよびラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズクレモリスのグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の内部配列と3'下流配列において、両菌種に共通な配列を含んでいるため、どちらの菌種であってもDNAが増幅される。しかし、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズクレモリスは増幅領域内に約40bpの塩基欠失があるため、この1対のプライマーを用いた場合の増幅産物はラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスの増幅産物よりも約40bp小さくなり、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスの場合は602bp、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズクレモリス

の場合は564bpである。配列番号5記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをgadB(21)と、配列番号6記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをGAD7と、それぞれ名付けた。なお、gadB(21)とGAD7は、データベースであるDDBJにAccession No. AB010789として登録されているグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子配列の1901~1926、2502~2476をそれぞれ基にして設計したものである。

【0015】また、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスは、グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の内部に、1塩基のチミン挿入変異が存在する。この変異によって、該菌種のグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子の制限酵素切断サイトである配列表の配列番号7記載の配列が消失する。すなわち、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスから増幅されたDNA断片は、配列表の配列番号7記載の配列を認識するAseI等の制限酵素で切断されるが、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスから増幅したDNA断片は、該制限酵素では切断されない。したがって、両菌種間で制限酵素断片長に多型が生じ、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型解析(以下、PCR-RFLPと略記することがある。)が可能となる。

【0016】上記のように設計した配列表の配列番号1~6に記載した塩基配列からなる3組のオリゴヌクレオチドプライマーは、その塩基配列に従い、DNA合成機等を用いた常法によって、人工的に合成することができる。これらの合成されたオリゴヌクレオチドプライマーの種特異性については、7種の乳酸菌(ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリス、ストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)、ロイコノストック・メゼンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)、エンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム(*Enterococcus faecium*)、ラクトバチルス・カゼイ(*Lactobacillus casei*))に属する14菌株に対するプライマーのバンド形成能を指標として確認したところ、特異性には何ら問題はなかった。

【0017】また、本発明のオリゴヌクレオチドプライマーには、配列表の配列番号1~6記載の塩基配列からなるものの他に、該配列の1個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失したものも含まれる。例えば、配列番号1~4のオリゴヌクレオチドプライマーは、該プライマーの全長の他に、3'末端以外の位置で該配列の1個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失したものも含まれる。ただし、3'末端の1塩基の違いがラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスとラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスに特異的に反応するため、3'末端の塩基を置換したり、3'末端に塩基を付加することはできない。な

お、配列番号5~6のオリゴヌクレオチドプライマーについては、このような制約はなく、1個もしくは数個の塩基が置換、付加もしくは欠失する位置は限定されない。

【0018】次に、本発明のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR反応を行うことによって、乳酸菌を同定・検出する方法について説明する。まず、被検菌となる乳酸菌をM17やMRS等の培地を用いて、25~37℃、好ましくは30℃で1~2日間、好ましくは1日間培養する。培養終了後、培養物を遠心分離して菌体を集め、Murmur法やSaito & Miuraの方法等の定法にしたがってDNAを調製する。例えば、Saito & Miuraの方法では、湿菌体1gをリゾチームとN-アセチルムラミダーゼを含む0.15M塩化ナトリウム-0.1M EDTA(pH8.0)溶液5mLに懸濁し、37℃で30分間加温する。加温後、該菌体懸濁液に0.1M トリス-塩酸(pH9.0)-1% SDS溶液15mLを加え、さらに60℃で10分間加温する。続いて、該懸濁液と等量の水飽和フェノールを加えてよく混和した後、冷却遠心(10000rpm、20分間)し、水層とフェノール層を得る。こうして得た水層に、2倍量の冷エタノールを加えてDNAを沈殿させた後、DNAを70%エタノールですすぎ、風乾した後、0.1xSSC10mLに溶解し、これをDNA溶液とする。該DNA溶液に0.2% RNase A溶液250μLを加え、37℃で30分間反応させる。反応終了後、DNA溶液の1/5量の水飽和フェノールを加えてよく混和し、上記と同様に遠心分離、エタノール沈殿、エタノールによるすすぎを行い、ゲノムDNAを抽出する。

【0019】こうして得た被検菌のゲノムDNAを鋳型として、PCR反応を行う。プライマーとしては、配列番号1~2、配列番号3~4、配列番号5~6記載のオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせから1または2以上を選択して用いるが、組み合わせについては特に制限されることはない。抽出したゲノムDNAは、TE緩衝液(10mM トリス-塩酸(pH8.0)-1mM EDTA)等に溶解して濃度を測定した後、約200μg/mLの濃度となるように調製し、これを鋳型DNA溶液とする。続いて、これを鋳型としてPCR反応を行う。PCR反応は、定法にしたがって行えばよく、市販されているKOD-Plus-(東洋紡社製)やAmpliTaq Gold(パーキンエルマー社製)等のPCR反応試薬キットを使用することによって、より簡便に行うことができる。該キットを用いてPCR反応を行う場合には、使用するキットの推奨する温度と時間で、予備加熱、変性、アニーリングや伸長を行えばよい。ただし、アニーリングの温度については、最適な条件を検討する必要がある。また、伸長時間は、予想される産物長によって変更する必要があるが、上記のPCR

反応試薬キットにおいては、予想される産物長1 kbに対して60秒の反応時間を推奨している。例えば、KOD-Plus-（東洋紡社製）の場合、PCR反応液の総量を50 µLとすると、キット付属の反応緩衝液 5 µL、dNTP mixture 0.2 mM、MgSO₄ 1 mM、プライマー 各0.3 µM、鋳型DNA 200 ng、KOD-Plus-DNAポリメラーゼ 1.0 U を含む反応液を、PCR反応機により、94 で2分の予備加熱後、変性を94 で15秒、アニリングを64 で30秒、伸長を68 で60秒35サイクルのPCR反応を行う。

【0020】続いて、PCR反応によって得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、バンドの有無または移動度によってラクトコッカス・ラクチスの亜種であるラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスおよびラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスの2菌種を同定・検出する。同定・検出方法は、例えばPCR産物を1.5~4%アガロースで50~100 V、好ましくは100 Vで、30~60分、好ましくは40分で電気泳動し、臭化エチジウム（0.5 µg/mL）で染色後、UVランプ下でバンドを観察することによって行うことができる。すなわち、配列表の配列番号1~2記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCR反応を行い、996 bpのPCR産物が生じた場合には、被検菌がラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスであり、配列番号3~4記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCR反応を行い、996 bpのPCR産物が生じた場合には、被検菌がラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスである。

【0021】さらに、配列番号5~6記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCR反応を行い、PCR産物として602 bpのバンドが得られた場合の被検菌は、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス、564 bpのバンドが得られた場合の被検菌は、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスである。また、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス MG 1363株は、表現型ではラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスに分類されるが、DNA配列の系統解析ではラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスに分類される菌株である。該菌株のPCR産物の大きさは、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスと同じ564 bpである。しかし、その後の制限酵素処理で、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスは切断されないのに対して、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス MG 1363株はラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスと同様に2本の断片に切断される。該切断断片の大きさは、ラクトコッカス・ラクチ

ス サブスピーシーズ ラクチスが約190 bpと約410 bpであるのに対し、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチス MG 1363株は約190 bpと約370 bpとなる。すなわち、制限酵素切断サイトの有無が、表現型であるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の有無と関連しているといえる。これらの同定・検出結果は、従来の生化学的性状試験の結果やDNA情報による分類と一致し、さらに制限酵素による切断も表現型による分類と一致している。

【0022】また、本発明の乳酸菌の同定・検出方法においては、上記のようにDNAを調製しなくても、乳酸菌の生菌から直接PCR反応を行うことも可能である。その場合の実施方法としては、例えば寒天平板培地にコロニーを形成した乳酸菌を滅菌した爪楊枝で釣菌し、これを鋳型DNAを含まないPCR反応液10~100 µL、好ましくは50 µLに加えてPCR反応を行った後、アガロース電気泳動を行ってバンドの有無または泳動距離を調べる方法がある。さらに、この他の方法としては、被検菌をMRS培地やM17培地等の液体培地で培養した培養液を、滅菌蒸留水で10~10⁴倍、好ましくは10²倍に希釈し、該希釈液の1 µLをPCR反応液（組成は、上記と同様）に加えてPCR反応を行い、バンド形成能から同定することもできる。

【0023】

【実施例】以下に、本発明を実施例によって詳しく説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

実施例1

(1) 被検菌の培養とDNAの抽出

各種被検菌となる乳酸菌をM17培地またはMRS培地を用いて、30 で1日間培養した。培養終了後、培養物を遠心分離して菌体を集め、下記のSaito & Miuraの方法にしたがってDNAを調製した。まず、湿菌体1gをリゾチームとN-アセチルムラミダーゼを含む0.15 M塩化ナトリウム-0.1 M EDTA (pH 8.0) 溶液5 mLに懸濁し、37 で30分間加温した。加温後、該菌体懸濁液に0.1 M トリス-塩酸 (pH 9.0) - 1% SDS溶液15 mLを加え、さらに60 で10分間加温した。続いて、該菌体懸濁液と等量の水飽和フェノールを加えよく混和した後、冷却遠心 (10000 rpm、20分間) し、水層とフェノール層を得た。

【0024】このようにして得た水層に、2倍量の冷エタノールを加えてDNAを沈殿させた後、DNAを70%エタノールですすぎ、風乾した後、0.1 x SSC 10 mLに溶解し、これをDNA溶液とした。該DNA溶液に0.2% RNase A溶液250 µLを加え、37 で30分間反応させた。反応終了後、DNA溶液の1/5量の水飽和フェノールを加えてよく混和し、上記と同様に遠心分離、エタノール沈殿、エタノールによる

すすぎを行い、ゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAを、TE緩衝液(10mM トリス-塩酸(pH8.0)-1mM EDTA)に溶解して濃度を測定した後、200µg/mLの濃度となるように調製し、これを鋳型DNA溶液とした。

【0025】(2)PCR反応

(1)において得た被検菌のDNA溶液を鋳型とし、LFW(配列番号1)およびLRV(配列番号2)をプライマーとして用い、PCR反応試薬キットであるKOD-Plus-(東洋紡社製)の方法にしたがってPCR反応を行った。PCR反応液の総量を50µLとすると、キット付属の反応緩衝液5µL、dNTP mixture 0.2mM、MgSO₄ 1mM、プライマー各0.3µM、鋳型DNA 200ng、KOD-Plus-DNAポリメラーゼ1.0Uを含む反応液を、GeneAmp PCR System 2400(パーキンエルマー社製)を用いて、94で2分の予備加熱後、変性を94で15秒、アニーリングを64で30秒、伸長を68で60秒のサイクルを35サイクル行った。

【0026】(3)アガロース電気泳動

PCR反応によって得られたPCR産物を、1.5%アガロースゲルで100V、30分電気泳動した。次に、アガロースゲルを臭化エチジウム(0.5µg/mL)で染色後、UVランプ下でバンドを観察した。結果を、第1表に示す。表中、プライマーと反応して996bpのPCR産物が増幅されたものを+、プライマーと反応しなかったものを-と表す。なお、ラクトコッカス・ラ

クチスサブスピーシーズ ラクチス ATCC 19435株、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス バイオバラエティー ジアセチラクチス ATCC 13675株、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリス ATCC 19257株は、それぞれラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスとラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス バイオバラエティー ジアセチラクチス、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスの標準株である。この結果、従来 of 生化学性状試験でラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスと同定されるラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスおよびラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス バイオバラエティー ジアセチラクチスと同定される菌株だけを特異的に検出することができた。

【0027】実施例2

被検菌の乳酸菌から調製したゲノムDNAを鋳型とし、CFW(配列番号3)とCRV(配列番号4)をプライマーとして用いたこと以外は、すべて実施例1と同様に行った。結果を、第1表に示す。表中、プライマーと反応して996bpのPCR産物が増幅されたものを+、プライマーと反応しなかったものを-と表す。この結果、従来 of 生化学性状試験でラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスと同定される菌株だけを特異的に検出することができた。

【0028】

【表1】第1表

菌 株	PCR の結果*		PCR による 同定結果
	LFWLRV 実施例1	CFWCRV 実施例2	
ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス バイオバラエティー ジアセチラクチス ATCC 13675 NIAI 01-7 DRC1	+	-	ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス
ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス ATCC 19435 NIAI 527 MG 1363 **	+	-	ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス
ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリス ATCC 19257 H - 61 HP	-	+	ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリス
ストレプトコッカス・サーモフィルス 9Y	-	-	ラクトコッカス・ラクチス以外
ロイコストック・メゼンテロイデス ATCC 8293	-	-	ラクトコッカス・ラクチス以外
エンテロコッカス・フェカリス IFO 12964	-	-	ラクトコッカス・ラクチス以外
エンテロコッカス・フェシウム IFO 13712	-	-	ラクトコッカス・ラクチス以外
ラクトバチルス・カゼイ ATCC 393	-	-	ラクトコッカス・ラクチス以外

* + : 反応あり、- : 反応なし

**ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス MG 1363株は、表現型ではラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスに分類されるが、DNA配列の系統解析ではラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスに分類される。ここでは、表現型による分類に基づいた。

【0029】実施例3 (PCR-RFLP法による乳酸菌の同定)

(1)被検菌の培養とDNAの抽出

被検菌である乳酸菌からのゲノムDNAの調製は、すべて実施例1と同様に行った。抽出した制限酵素処理ゲノムDNAをTE緩衝液(10mM トリス-塩酸(pH 8.0) - 1mM EDTA)に溶解して濃度を測定した後、200µg/mLの濃度となるように調製し、これを鋳型DNA溶液とした。

【0030】(2)PCR反応

(1)において得た被検菌のDNA溶液を鋳型とし、g ad B (21) (配列番号5)およびGAD7 (配列番号6)をプライマーとして用い、PCR反応試薬キットであるAmpli Taq Gold (パーキンエルマー社製)の方法にしたがってPCR反応を行った。PCR反応液の総量を50µLとすると、キット付属の反応緩衝液 5µL、dNTP mixture 0.2mM、プライマー 各0.4µM、鋳型DNA 200n

g、Ampli Taq DNAポリメラーゼ 1.0Uを含む反応液を、Gene Amp PCR System (パーキンエルマー社製)を用いて、95 で9分の予備加熱後、変性を95 で30秒、アニーリングを50 で30秒、伸長を72 で60秒のサイクルを45サイクル行った。

【0031】(3)アガロース電気泳動

上記PCR反応によって得られたPCR産物を、4%アガロースゲルで100V、50分電気泳動した。続いて、アガロースゲルを臭化エチジウム(0.5µg/mL)で染色後、UVランプ下でバンドを観察した。

【0032】(4)PCR-RFLP法

(3)においてバンドが検出されたPCR産物について、配列表の配列番号7記載の塩基配列を認識する制限酵素であるAse I (東洋紡社製)で処理し、再度アガロースゲル電気泳動した。制限酵素処理は、PCR反応液8.5µL、制限酵素用緩衝液(商品名:High buffer、東洋紡社製)1µL、Ase I 0.5µLを混和したものを、37 で4時間処理することによって行った。反応後、4%アガロースゲルを用いて100V、30分電気泳動した。次いで、アガロースゲルを臭化エチジウム(0.5µg/mL)で染色後、UVランプ下でバンドを観察した。結果を第2表に示す。

【0033】

【表2】第2表

菌 株	PCR 産物長* (kb)	制限酵素 断片長* (kb)	PCRによる 同定結果
ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス バイオペラエティー ジアセチラクチス ATCC 13675 NIAI 01-7 DRC1	0.60 0.60 0.60	0.19+0.41 0.19+0.41 0.19+0.41	ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス
ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス ATCC 19435 NIAI 527 MG 1363 **	0.60 0.60 0.56	0.19+0.41 0.19+0.41 0.19+0.37	ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス
ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリス ATCC 19257 H - 61 HP	0.56 0.56 0.56	0.56 0.56 0.56	ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリス
ストレプトコッカス・サーモフィルス 9Y	—	—	ラクトコッカス・ラクチス以外
ロイコストック・メセンテロイデス ATCC 8293	—	—	ラクトコッカス・ラクチス以外
エンテロコッカス・フェカリス IFO 12964	—	—	ラクトコッカス・ラクチス以外
エンテロコッカス・フェシウム IFO 13712	—	—	ラクトコッカス・ラクチス以外
ラクトバチルス・カゼイ ATCC 393	—	—	ラクトコッカス・ラクチス以外

- : 反応なし

**ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス MG 1363株は、表現型ではラクトコッカス

・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスに分類されるが、DNA配列の系統解析ではラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスに分類される。こ

ここでは、表現型による分類に基づいた。

【0034】この結果、従来の生化学性状試験でラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスと同一とされる菌株についてのみ、約600bpの位置にバンドが検出された。一方、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスと同一とされる菌株については、約560bpの位置にバンドが検出された。両菌種以外の乳酸菌からはバンドは検出されなかった。バンドが検出されたPCR産物について、配列表の配列番号7記載の塩基配列を認識する制限酵素であるAseIで処理した後、アガロースゲル電気泳動したところ、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチスの反応産物は約190bpと約410bpに切断されていた。一方、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスのバンドには変化がなかった。また、表現型による分類では、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスの性質を示すが、DNA情報による分類ではラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスに分類されるラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ ラクチス MG 1363株のような菌株のPCR産物の大きさは、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ クレモリスと同じ約560bpであり、制限酵素処理ではラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズラクチスと同様に2本に切断された。切断断片の大きさは、約190bpと約370bpを示した。

【0035】実施例4

第1表に記載された各種被検菌を、寒天平板培地に接種して30℃で2日間培養した。培養によって形成した各種の被検菌のコロニーを、滅菌した爪楊枝で釣菌し、PCR反応液50μLに懸濁し、PCR反応を行った。なお、PCR反応液の組成は、キット付属の反応緩衝液5μL、dNTP mixture 0.2mM、MgSO₄ 1mM、プライマー 各0.3μM、KOD-Plus-DNAポリメラーゼ 1.0Uを含む反応液であり、プライマーとしてはLFWとLRV（配列番号1～2記載）、CFW（配列番号3）とCRV（配列番号4）の2組のプライマーをそれぞれ用いた。次に、PCR産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、バンドの有無と移動度を調べた。なお、PCR反応およびアガロース電気泳動の条件は、すべて実施例1および2と同様である。この結果、調製したDNAを鋳型に用いた実施例1と同様の結果が得られた。したがって、本発明の乳酸菌の同定・検出方法は、被検菌からDNAを抽出しなくても行うことができるため、従来法と比べて正確、迅速、かつ簡便にラクトコッカス・ラクチスを選択して同定・検出することができる。

【0036】実施例5

第1表に記載された各種被検菌を、液体培地のMRS培地（DIFCO社製）またはM17培地（DIFCO社

製）100mLに接種し、30℃で1日間培養した。培養終了後、該培養液50μLを滅菌蒸留水で100倍に希釈し、該希釈液の1μLをPCR反応液に加えてPCR反応を行った。なお、PCR反応液の組成は、キット付属の反応緩衝液5μL、dNTP mixture 0.2mM、MgSO₄ 1mM、プライマー 各0.3μM、KOD-Plus-DNAポリメラーゼ 1.0Uを含む反応液であり、プライマーとしてはLFWとLRV（配列番号1～2記載）、CFW（配列番号3）とCRV（配列番号4）の2組のプライマーをそれぞれ用いた。次に、PCR産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、バンドの有無と移動度を調べた。なお、PCR反応およびアガロース電気泳動の条件は、すべて実施例1および2と同様である。この結果、調製したDNAを鋳型に用いた実施例1と同様の結果が得られた。したがって、本発明の乳酸菌の同定・検出方法によれば、従来法と比べ正確、迅速、かつ簡便にラクトコッカス・ラクチスを選択して同定・検出することができる、この例からも支持された。

【0037】実施例6

第2表に記載された各種被検菌を、寒天平板培地に接種して30℃で2日間培養した。培養によって形成した各種の被検菌のコロニーを、滅菌した爪楊枝で釣菌し、PCR反応液50μLに懸濁し、PCR反応を行った。次に、PCR産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、バンドの有無と移動度を調べた。なお、PCR反応およびアガロース電気泳動の条件は、すべて実施例3と同様である。その結果、調製したDNAを鋳型に用いた実施例3と同様の結果が得られた。このことから、本発明の乳酸菌の同定・検出方法は、被検菌からDNAを抽出しなくても行うことができるため、従来法と比べて正確、迅速、かつ簡便にラクトコッカス・ラクチスを選択して同定・検出できることが分かる。

【0038】実施例7

第2表に記載された各種被検菌を、液体培地のMRS培地（DIFCO社製）またはM17培地（DIFCO社製）100mLに接種し、30℃で1日間培養した。培養終了後、該培養液50μLを滅菌蒸留水で100倍に希釈し、該希釈液の1μLをPCR反応液に加えてPCR反応を行った。次に、PCR産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、バンドの有無と移動度を調べた。なお、PCR反応およびアガロース電気泳動の条件は、すべて実施例3と同様である。その結果、調製したDNAを鋳型に用いた実施例3と同様の結果が得られた。このことから、本発明の乳酸菌の同定・検出方法は、被検菌からDNAを抽出しなくても行うことができるため、従来法と比べて正確、迅速、かつ簡便にラクトコッカス・ラクチスを選択して同定・検出できることが分かる。

【0039】

【発明の効果】本発明のプライマーを用いれば、発酵乳

製品や漬け物等から分離した乳酸菌から生菌を培養することなく、正確、迅速、かつ簡便にラクトコッカス・ラクチスの亜種まで同定・検出することができる。また、試料中のラクトコッカス・ラクチスの生菌数が、他の細菌数に比較して極端に低く平板培地上で分離できない場合においても、ラクトコッカス・ラクチスを検出することができる。このため、ラクトコッカス・ラクチスの同定・検出における本発明の活用が期待される。

【0040】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 農林水産省畜産試験場長 横内 圀生
<120> オリゴヌクレオチドおよびそれを用いた乳酸菌の菌種同定法

<130> P121121K

<160> 7

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 1

aactaatgag tcaaaccttg gaaaaaaa 28

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 2

caggcacttg ccatcccttc attaat 26

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 3

aactaatgag tcaaaccttg gaaaaaat 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 4

caggcacttg ccatcccttc attaaa 26

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 5

cgttatggat ttgatggata taaagc 26

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 6

actcttctta agaacaagtt taacagc 27

<210> 7

<211> 6

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 7

attaat 6

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA03 CA09 DA05

GA27 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ44 QR32

QR39 QR62 QR66 QS10 QS16

QS25 QX02