

R-PCR Basapk\_s/Ba\_sapk2=166bp+Ba\_sapk\_probe (55°C)

RNA ポリメラーゼ B サブユニット (染色体)

rpoBF1	ccaccaacagtagaaaatgcc	21bp <sup>iii</sup>	
rpoBR1	aaatttcaccagtttctggatct	21bp <sup>iii</sup>	
rpoB_probe	5' -FAM-tccaaagcgctatgatttagcaaagt-TAMRA-3'		27bp

(原報は FRET ケミストリで、そのひとつを TaqMan probe とした)

R-PCR rpoBF1/rpoBR1=175bp+rpoB\_probe (60°C)

炭疽菌特異的配列 (染色体)

Ba813R1	ttaattcacttgcaactgatggg	23bp <sup>iv</sup>	
Ba813R2	aacgatagctcctacattggag	23bp <sup>iv</sup>	

PCR Ba813R1/Ba813R2=152bp (58°C)

ペスト菌

侵入性 (染色体)

○YPinv_t_s(2255-2275)	taagggtactatcgcggcgga	21bp <sup>v</sup>	
○YPinv_t_as(2549-2529)	cgtgaaattaaccgtcacact	21bp <sup>v</sup>	
Ype_invks	gagcgtgttctttattgtt	20bp	
Ype_invkas	atctaccccgacagttagta	20bp	
Ype_invkprobe	5' -TET- aaagataatctgcaacgcaaccctt-TAMRA-3'		25bp

PCR YPinv\_t\_s/ YPinv\_t\_as=295bp (54°C)

R-PCR Ype\_invks/Ype\_invkas=107bp+Ype\_invkprobe (60°C)

外膜 (プラスミド)

yopMt_s(700-721)	ataactcatcgggggcaaaat	21bp <sup>v</sup>	
yopMt_as(1264-1242)	gcgttatttatccgaatttagc	22bp <sup>v</sup>	

PCR yopMt\_s/yopMt\_as=565bp (54°C)

カプセル抗原 (プラスミド)

caf1ts	caggaaccactagcacatc	19bp <sup>v</sup>	
caf1tas	ccccacaaggttctcac	18bp <sup>v</sup>	

PCR caf1ts/caf1tas=171bp (54°C)

プラスミノーゲン活性化 (プラスミド)

plats	atcttactttccgtgagaag	20bp <sup>v</sup>	
platas	cttggatggttagcttctcta	20bp <sup>v</sup>	

PCR plats/patas=480bp (54°C)

ペスト菌特異的配列 (染色体)

3a Forward	tgtagccgctaagcactaccatcc	24bp <sup>vi</sup>	
3a Reverse	ggcaacagctcaacaccttgg	22bp <sup>vi</sup>	
Ype3aks	cggagaaagaaatggataa	20bp	

Ype3akas	gattgtgatcaggagtggtt	20bp	
Ype3aprobe	5' -FAM- atacaagcgaatgccatcc-TAMRA-3'		20bp

PCR 3a Forward/3a Reverse=276bp (unknown)  
 R-PCR YPe3aks/YPe3akas=120bp (60°C) + Ype3aprobe

### 赤痢菌

侵入性プラスミド産物 (プラスミド及び染色体)

ipaH			
○Einvs_s	tggaaaaactcagtcctctgcgg	24bp <sup>vii</sup>	
○Einvs_as	ttctgatgcctgatggaccaggag	24bp <sup>vii</sup>	
ipaHks2	gtctctgcacgcaatacc	18bp	
ipaHkas2	agctctcagtggeatcag	18bp	
ipaHk_probe	5' -FAM-ccggattccgtgaacaggtc TAMRA-3'		20bp

PCR Einvs\_s/Einvs\_as=140bp (72°C (5 cycle) + 63°C (20 cycle))  
 R-PCR ipaHks2/ipaHkas2=121bp + ipaHk\_probe (60°C)

invE(プラスミド)

I-1	atatctctatttccaatcgct	22bp <sup>viii</sup>
I-3	ccttgatacaaatgtgcccccg	22bp <sup>viii</sup>
I-5	gatggcgagaaattatatcccg	22bp <sup>viii</sup>
I-51	ggcgagaaattatatcccg	19bp

PCR I-1/I-5=382bp (61°C)  
 PCR I-3/I-5=248bp (61°C)  
 PCR I-1/I-51=379bp (50°C)

### 腸パラチフス

O 抗原 (Tyvelose, Typhi/ParatyphiA) (染色体)

tyvks0	gaggaagggaaatgaagctttt	22bp <sup>ix</sup>
tyvks21	tagcaaaactgtctcccaccatac	23bp <sup>ix</sup>
tyvparaAks	gaagggaaatgaagcttta	19bp
tyvparaAkas	tgttgacacctttacgtgata	20bp
tyvparaAkprobe	5' -VIC-ttgctcctttgctttaagtcaa-TAMRA-3'	

PCR tyvks0/tyvks21=615bp (55°C)  
 R-PCR tyvparaAks/tyvparaAkas=125bp (60°C)

O 抗原 (Paratose, Typhi/ParatyphiA) (染色体)

○paraks2	cttgctatggaagacataacgaacc	25bp <sup>ix</sup>
○parakas1	cgtctccatcaaaagctccataga	24bp <sup>ix</sup>

PCR paraks2/parakas1=258bp (55°C)

H 抗原 (染色体)

fliCcomks1	aatcaacaacaacctgcagcg	21bp <sup>ix</sup>
fliCtykas3	gcatagccaccatcaataacc	22bp <sup>ix</sup>
fliCparakas1	tagtgcttaatgtagccgaagg	22bp <sup>ix</sup>

PCR comks1/fliCtykas3=750bp(H-d), 489bp(H-j) (55°C)

PCR comks1/fliCparakas1=329bp (55°C)

Vi 抗原 (染色体)

sR1	gttatttcagcataaggag	19bp <sup>x</sup>
asR1	acttgtccgtgttttactc	19bp <sup>x</sup>
asR2	cttccataccacttttccg	18bp <sup>x</sup>
VipRks	tgtaaagtgcctgaatit	20bp
VipRkas	attdttgcactctgtcaacc	20bp
VipRkprobe	5' -FAM-ttcaagttcgcgactaatgc-TAMRA-3'	20bp

PCR sR1/asR1=599bp (unknown)

PCR sR1/asR2=439bp (55°C)

R-PCR VipRks/VipRkas=116bp+VipRkprobe (60°C)

コレラ菌

コレラ毒素 (染色体)

○CT-1	tcaaactatattgtctggtc	20bp <sup>xi</sup>
○CT-2	cgcaagtattactcatcga	19bp <sup>xi</sup>
VCT1	acagagtgagtactttgacc	20bp <sup>xi</sup>
VCT2	ataccatccatatatttgggag	22bp <sup>xi</sup>

PCR CT-1/CT-2=380bp (50°C)

PCR VCT1/VCT2=308bp (55°C)

01rfb

01F2-1	gtttcactgaacagatggg	19bp <sup>xii</sup>
01R2-2	ggatcatctgtaagtacaac	19bp <sup>xii</sup>
01s	gttaataccatagtcagtg	22bp
01as	attggcagcgtgtgagcagg	20bp

PCR 01F2-1/01R2-2=192bp (55°C)

PCR 01s/01as=704bp (50°C)

0139-rfb

0139F2	agcctctttattacgggtgg	20bp <sup>xii</sup>
0139R2	gtcaaaccgatcgtaaagg	20bp <sup>xii</sup>

PCR 0139F2/0139R2=449bp (55°C)

出血性大腸菌  
別表 1 及び 2

リボゾーム

23S RNA		
23Srrna_s (Forward6)	gcgatttcygaayggggraaccc	23bp
23Srrna_as (Reverse10)	ttgcctttccctcacgtact	22bp
16S RNA		
R1 (16Srrna_V1s)	aattgaagagtttgatcatg	20bp <sup>xiii</sup>
R2 (16Srrna_V1as)	acattactcaccgtccgge	20bp <sup>xiii</sup>
U1 (16Srrna_V6s)	acgcgaagaaccttacc	17bp <sup>xiii</sup>
U2 (16Srrna_V6as)	catgcagcacctctctc	17bp <sup>xiii</sup>
16S-23S スペーサー領域		
16SS	ttgtacacaccgccgtca	19bp <sup>xiv</sup>
23SAS	ggtaccttagatgtttcagttc	22bp <sup>xiv</sup>

別表 1 出血性大腸菌 O157 関連遺伝子検出用のプライマー

標的遺伝子	プライマー	位置	5'-塩基配列-3'	PCR 産物	アニーリング 温度
エンテロヘモリジン ( <i>hlyA</i> )	hlyAF <sup>xv</sup> hlyAR <sup>xv</sup>	70-603	gcatcatcaagcgtacgttcc aatgagccaagctggtaagct	534bp	65°C*
O157 抗原 ( <i>rfbE</i> )	O157F <sup>xv</sup> O157R <sup>xv</sup>	393-651	cggacatccatgtgatattg ttgcctatgtacagctaattcc	259bp	65°C*
O157 抗原 ( <i>rfbE</i> )	rfbE-1 <sup>xvi</sup> rfbE-2 <sup>xvi</sup>	181-1166	gtctggactcaacgtggatt aacttgctcattcgataggc	986bp	55°C
O111 抗原 ( <i>rfb</i> )	O111F <sup>xv</sup> O111R <sup>xv</sup>	24-429	tagagaaattatcaagtttagttcc atagtatgaacatcttgttttagc	406bp	65°C*
H7 抗原 ( <i>fliC</i> )	FLICH7-F <sup>xvii</sup> FLICH7-R <sup>xvii</sup>	69-694	gcgctgtcgagttctatcgagc caacggtgactttatcgccattcc	625bp	65°C
グロクロニドラーゼ ( <i>uidA</i> )	PT-2 <sup>xviii</sup> PT-3 <sup>xviii</sup>	252-501	gcgaaaactgtggaattggg tgatgctccataacttctctg	252bp	64°C
インチミン ( <i>eae</i> )	eaek1 <sup>xix</sup> EA-2 <sup>xx</sup>	1709-2299	gcttagtgctggttaggat ctctgcagattaacctctgc	591bp	55°C
γ-インチミン ( <i>eae</i> )	EAE157-F <sup>xvii</sup> EAE157-R <sup>xvii</sup>	1959-3047	caggctcgctgtctgctaaa tcagcgtggttgatcaacct	1087bp	65°C

\* : 最初の 10 サイクルは 65°C で、次の 15 サイクルで 60°C まで下げ、最終 35 サイクル

別表2 VT 遺伝子検出用のプライマー

標的 遺伝子	プライマー	位置	5'-塩基配列-3'	PCR 産物 <sup>1)</sup>	アニーリング 温度
VT1/2	MK1 <sup>xxi</sup>	232-251	tttacgatagacttctcgac	228bp	43°C
	MK2 <sup>xxi</sup>	439-459	cacatataaattatttcgctc		
	○mMK1_1	229-251	gaatttaccttagacttctcgac	234bp	55°C
	○mMK1_2	439-462	tgccacatataaattatttcgctc		
	○mMK2_1	308-330	gagtttacgatagacttttcgac	234bp	55°C
	○mMK2_2	518-541	ggccacatataaattatttcgctc		
	Upstream <sup>xxii</sup>	439-458	gaacgaaataatttatatgt	約 900bp <sup>2)</sup>	43°C
Downstream <sup>xxii</sup>	1318-1335	tttgattgttacagtcac			
VT1	LP30 <sup>xviii</sup>	209-229	cagttaatgtgggtggcgaagg	348bp	64°C
	LP31 <sup>xviii</sup>	536-556	caccagacaatgtaaccgctg		
VT2	LP43 <sup>xviii</sup>	295-316	atcctattcccgggagtttacg	584bp (587bp)	64°C
	LP44 <sup>xviii</sup>	860-881	gcgtcatcgatacacaggagc		
VT1	V1 <sup>xxiii</sup>	210-227	agttaatgtgggtggcgaag	811bp (817bp)	55°C
	V5 <sup>xxiii</sup>	1010-1026	gactcttccatctgccg		
VT2	V3 <sup>xxiii</sup>	289-306	ttcggatcctattcccg	471bp (474bp)	55°C
	V4 <sup>xxiii</sup>	745-762	tctctggatcattgtatta		
VT1	VT1a <sup>xxiv</sup>	1019-1038	gaagagtcctgtgggattacg	130bp	55°C
	VT1b <sup>xxiv</sup>	1129-1148	agcgatgcagctattaataa		
VT2	VT2a <sup>xxiv</sup>	426-348	ttaaccacacccacggcagt	346bp (349bp)	55°C
	VT2b <sup>xxiv</sup>	755-774	gctctggatgcatctctggt		
VT1	5' I <sup>xxv</sup>	615-639	aaatcgccattcgttgactacttct	370bp	60°C
	3' I <sup>xxv</sup>	960-984	tgccacttctggcaactcgcgatgca		
VT2	5' II <sup>xxv</sup>	694-718	cagtcgtcactcactggtttcatca	283bp	60°C
	3' II <sup>xxv</sup>	953-976	ggatattctcccactctgacacc		
Vte	VTe-a <sup>xxvi</sup>	217-236	ccttaactaaaaggaatata	230bp	45°C
	VTe-b <sup>xxvi</sup>	427-446	ctgggtgggtatgattaata		

1) VTによってサイズが異なる。

2) ( ) 内は現在のデータベースの配列から計算した増幅産物サイズ。参照した塩基配列は VT1:M17358、VT2:X07865:slt2、VT2e:M21534。

文 献

- <sup>i</sup> [http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/docs/whoemczdi986.html#\\_Hlk436471582](http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/docs/whoemczdi986.html#_Hlk436471582)
- <sup>ii</sup> Makino S. -I. et al. Detection of anthrax spores from the air by real-time PCR. *Lett. Applied Microbiol.* 33:237-240, 2001
- <sup>iii</sup> Qi et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3720-3727, 2001.
- <sup>iv</sup> Ramiisse et al. *FEMS Microbiol. let.* 145:9-16, 1996.
- <sup>v</sup> Tsukano et al. *Microbiol. Immunol.* 40(1996):773-775
- <sup>vi</sup> Lyndsay et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(2001):3759-3762
- <sup>vii</sup> Pass et al. *J. Clin. Microbiol.* 38(2000):2001-2004
- <sup>viii</sup> 伊藤ら、日本臨床特別号 (1992) : 368-372
- <sup>ix</sup> Hirose et al. *J. Clin. Microbiol.* 40(2002):633-636.
- <sup>x</sup> Hashimoto et al. *J. Clin. Microbiol.* 33(1995):775-777.
- <sup>xi</sup> 小林一寛ら. 病原微生物検出情報
- <sup>xii</sup> Hoshino et al. *FEMS Immunol. Microbiol.* 20(1998):201-207
- <sup>xiii</sup> Mileham A. J. Identification of microorganisms using random primed PCR. *Methods in Molecular Biology.* 46:247-256, 1995.
- <sup>xiv</sup> Kostman J. R. et al. Univeresal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Infect. Diseases.* 171:204-208, 1995.
- <sup>xv</sup> Paton A W, Paton J C: Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb<sub>0111</sub>*, and *rfb<sub>0157</sub>*. *J Clin Microbiol* 36:598-602, 1998.
- <sup>xvi</sup> 塚本定三、河合高生:PCR法による大腸菌 0157 抗原の同定. *感染症学雑誌* 72:738-741、1998.
- <sup>xvii</sup> Gannon V P et al. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 35:656-662, 1997.
- <sup>xviii</sup> Cebula T A et al: Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype 0157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 33:248-250, 1995.
- <sup>xix</sup> 山崎貢他 : 日本で分離された散发下痢症由来大腸菌における *eaeA* 遺伝子の検出状況. *感染症学雑誌* 71 : 1059-1065、1997

- 
- <sup>xx</sup> 八柳潤他：水系感染集団事例から分離された毒素原性大腸菌および腸管集合性大腸菌耐熱性エンテロトキシン(EAST-1)遺伝子保有大腸菌の性状. 感染症誌 70 : 215-223, 1996.
- <sup>xxi</sup> Karch H, Meyer T: Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 27: 2751-2757, 1989.
- <sup>xxii</sup> Lin Z et al: Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. Microbiol Immunol 37: 543-548, 1993.
- <sup>xxiii</sup> 小林一寛：V T産生性 *E. coli* O157:H7 の検査法について. 病原微生物検出情報月報 12 : 3-4, 1991.
- <sup>xxiv</sup> Pollard D R et al: Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 28: 540-545, 1990.
- <sup>xxv</sup> Brian M J et al: Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol 30: 1801-1806, 1992.
- <sup>xxvi</sup> Johnson W M et al: Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* Verotoxin 2 and the Verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 28: 2351-2353, 1990.

水道におけるバイオテロ対策としての迅速高感度な細菌検出方法の開発

補遺 「炭疽菌の特異的なスクリーニング法の検討」

分担研究者 伊藤 健一郎 国立公衆衛生院衛生微生物学部細菌室(現国立感染症研究所)

協力研究者 高木 弘隆 国立感染症研究所バイオセーフティ管理室

森屋 一雄 佐賀県医薬衛生公害研究所微生物課

概要

水道水を標的とするバイオテロリズムに使用されることが強く懸念される炭疽菌は *Bacillus* 属のセレウス群に属し、互いに密接に関係し、医学や農学上の重要性から独立した菌種の位置を与えられているが、*B. cereus* の亜種に該当すると考えられている。本研究で試した PCR 法では炭疽菌ではないと思われる河川由来株の一部も陽性となることが明らかとなった。スクリーニングに使用できる遺伝子診断法として、既に報告されている対象遺伝子・塩基配列および検査法の諸条件を検討した。表面抗原の s-layer をコードする遺伝子 *sap* を対象としてアニーリング温度を 58°C に上昇させることにより、炭疽菌に特異的な染色体上の遺伝子を標的としたスクリーニングが可能である。

A. 研究目的

バイオテロリズムにより水道水に混入されることが予想される病原微生物の中でも、炭疽菌は芽胞が塩素に対し高い耐性を持つことから、その使用が強く懸念され、常時監視・迅速かつ高感度に検出する試験方法を開発することが重要である。

炭疽菌は *Bacillus* 属のセレウス群に属し、群を構成する *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoies* は互いに「表現型および遺伝子型のいずれの点からも極めて密接に関係し、医学や農学上の重要性からそれぞれ独立した菌種の位置を与えられているとはいえ、*B. cereus* の亜種に該当すると考えられ」ている<sup>1)</sup>。また、本研究報告書の「水道におけるバイオテロ対策とし

ての迅速高感度な細菌検出方法の開発」D.

解説、4) 炭疽菌類似菌の分布について、において記述したように、「土壌中にはバチルス属が多く生息し、それらの生態や正常には不明の点が多い。1997年にフランスで発生した炭疽に関して、周辺の土壌調査を行ったところ、炭疽菌に特異的とされていた配列が多くの土壌菌に分布していたと報告された。<sup>2)</sup> 本研究においても、河川で分離した類似菌に *sap* を保有する株が存在していた。また、データは載せなかったが、上水に近い処理水の濃縮液2件を、リアルタイムPCRで調べたところ、両方とも量は少ないが陽性」であった。すなわち、報告されているPCR法でも環境からの *Bacillus* 類似菌では似たような配列を持っているこ



とを示している。これらの株は、炭疽菌のプラスミド上の病原因子を持たないので、確認検査で鑑別できるが、結果が出るまでの間、緊急出動態勢を維持するなど、緊張が強いられる。

本研究は、今までに報告されている遺伝子検査法の対象遺伝子・配列を試し、さらに反応条件を適正化し、炭疽菌のスクリーニングに最適な検査法を開発することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 既報の PCR の標的遺伝子

スクリーニングに用いるために、しばしば脱落するプラスミド上にコードされる遺伝子(カプセル抗原 *cap* や毒素 *pag*)ではなく、染色体上にあり可能なら病原性に関連するものを選択した。挿入配列や繰り返し構造などは得られるバンドの数が長さ1通りではなく、多くのバリエーションがでるため、株間の異同等には有効だが検査においては判定が困難として対象から除いた。

対象として使用した遺伝子・塩基配列は以下の3種類である。WHOのホームページに掲載されており、本研究でもスクリーニング用に使用した表面構造物質(*s-layer*、遺伝子は *sap*<sup>3)</sup>)、RNAポリメラーゼのBサブユニット(遺伝子は *rpoB*)で炭疽菌に特異的な変異が起きている部分<sup>4)</sup>、および機能は不明だが炭疽菌に特異的でフィールド調査にも使用された塩基配列 Ba813<sup>5)</sup>である。

*sap*についてはblastNで検索すると、非常によく似た配列が *Bacillus* 属菌に見られるため(図1A)、より特異的なprimerの設計を試みた。primer一覧を表1に上げる。

### 2) テンプレート DNA の調製

栄養型と異なり芽胞の場合は、通常のテンプレート DNA 調製法では回収率が低く検出感度が下がる。芽胞をあらかじめ作製し、効果的な DNA の調製法を検討した。

### 3) PCR 条件

反応液は最終 50  $\mu$ l で、0.1~0.2  $\mu$ M プライマー溶液、0.2 mM dNTP 混液、 $\times$ 1 PCR 緩衝液、1U *Taq* DNA ポリメラーゼ(プロメガ)、テンプレート 3  $\mu$ l である。サーマルサイクラーは GeneAmp9600 システム(パーキンエルマー)を使用し、5分間の熱変性を行い、最初の5サイクル:熱変性 95 $^{\circ}$ C、1分、アニーリング、1分、伸長反応 72 $^{\circ}$ C、1分で行い、次の35サイクル:熱変性 95 $^{\circ}$ C、30秒、アニーリング、30秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C、45秒 1分 30秒、を行い、最後に 72 $^{\circ}$ C、3分間の最終伸長反応を行った。アニーリング温度は、50~58.5 $^{\circ}$ Cに振って増幅産物の生成効率と特異性を調べた。

産物は微量のエチジウムブロミドを増幅産物液に加え、1.5%アガロースゲル、TBE 緩衝液中で電気泳動し、トランスイルミネータのもとで観察した。

### 4) 菌株および DNA テンプレート

炭疽菌および他のセレウス群菌を使用した。*B. anthracis* は標準株を用いた。*B. cereus* は、女子栄養大学衛生学教室から分

与していただいた環境(植物由来 21 株)および食品(食肉由来 8 株)分離株 29 株と佐賀県の食品(漬物由来株 5 株、牛乳由来 1 株)および患者(1 株)分離株 7 株の合計 36 株、*B. thuringiensis* は九州医科大学?教室から分与していただいた 4 株を用いた。*B. mycoies* は今回の研究では省略した。神奈川衛生研究所で取水口に近い河川水から熱処理して選択した株のうち 16SrDNA の配列から *Bacillus* 属と推定される 21 株を使用した。

### C. 結果

セレウス菌分離株 29 株を調べたところ、表 2 に示したように *rpoB* および *sap* では多くの株が、Ba813 でも 4 株が陽性となった。*rpoB* と *sap*、Ba813 と *sap* において互いに陽性となった株が異なっているものが多かった。図 1B に示すように、*sap* 遺伝子配列の中から炭疽菌に特異的な領域を用いて primer を設計しなおした。アニーリング温度も第 1 サイクルステップ 58.5°C、第 2 サイクルステップ 60°C と高くして、陽性だった株を再検査した結果、炭疽菌では明らかなバンドが出ている条件で、セレウス菌分離株および河川水株はバンドが見られず特異性の高い PCR が出来た(図 2)。次にこの新しい PCR システムを用いて、河川水分離株を調べた結果を表 3 に示す。新しい領域から選んだ *sap* および WHO primer はいずれも良好な特異性を示した。また、*B. cereus* 国内分離株および、*B. thuringiensis*

では調べた結果は、表 4 に示すようにいずれも陰性であった。一方、*rpoB* では 2 株を除いて陽性となり、むしろセレウス群に特異的といえた。

また、テンプレート調製は図 3 のように、芽胞菌の一夜、液体培養菌を高温処理により破壊し、アルカリ処理・タンパク分解酵素処理することにより収率よく回収できた(図 4)。

### E. 考察

炭疽菌の芽胞を対象として、高収率のテンプレート DNA 調製法と、より特異性の高い PCR 法が開発され、この方法を用いることにより炭疽菌の微量・迅速な検査体制が構築できると考えられる。

### F. 文献

- 1) 品川邦汎 2 *Bacillus cereus* 2000. in 食水系感染症と細菌性食中毒(坂崎利一編) pp473-491.
- 2) Patra, G. et al. 1998. Molecular Characterization of *Bacillus* Strains Involved in Outbreaks of Anthrax in France in 1977. *J. Clin. Microbiol.* 36:3412-3414.
- 3) [http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/docs/whoemczdi986.html#\\_Hlk436471582](http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/docs/whoemczdi986.html#_Hlk436471582)
- 4) Qi, Y. et al. 2001. Utilization of the *rpoB* Gene as a Specific Chromosomal Marker for Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3720-3727.
- 5) Patra, G. et al. 1996. Isolation of a Specific Chromosomal DNA Sequence of *Bacillus anthracis* and its Possible Use in Diagnosis. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 15:223-231.

### G. 発表業績 なし

表 1. プライマー一覧

primer または probe 名	5' - 配列 -3'	長さ
PCR	PCR の primer の組み合わせ (アニーリング温度)	
文献番号がないものは本研究で作製または未発表		

炭疽菌

表面タンパク (染色体)

slayerwho_s	cgcgtttctatggcatctcttct	23bp <sup>3)</sup>
slayerwho_as	ttctgaagctggcgttacaaat	22bp <sup>3)</sup>
Ba-slywhoR	ttctgcagctggcgttacaaat	22bp
Ba_sapks	cgtttctatggcatctcttc	20bp
Ba_sapkas2	gctccattgatcacca	17bp
Ba-sap-tF1	ggtactggtgatcaatgggagcc	23bp
Ba-sap-tR1	ttcaactttccagttgttactgcg	25bp
Ba-sap-tR2	cctacagctacttctgtttaccaa	25bp

PCR slayerwo\_s/slayerwho\_as=639bp

Ba-sap-tF1/Ba-sap-tR1=782bp

Ba-sap-tF1/Ba-sap-tR2=349bp

RNA ポリメラーゼ B サブユニット (染色体)

rpoBF1	ccaccaacagtagaaaatgcc	21bp <sup>4)</sup>
rpoBR1	aaatttcaccagtttctggatct	21bp <sup>4)</sup>

rpoBF1/rpoBR1=175bp

炭疽菌特異的配列 (染色体)

Ba813R1	ttaattcacttgcaactgatggg	23bp <sup>5)</sup>
Ba813R2	aacgatagctcctacatttgag	23bp <sup>5)</sup>

PCR Ba813R1/Ba813R2=152bp (58°C)

図 1. Bacillus 属 sap 遺伝子と primer の位置

A. blastN の検索結果

emb Z36946.1 BASAPG B. anthracis sap gene encoding S-layer protein	4847	0.0
emb AJ012290.1 BTH012290 Bacillus thuringiensis ctc gene	2777	0.0
gb U38842.1 BLU38842 Bacillus licheniformis S-layer protein gene...	224	3e-55

B. sap 遺伝子のアラインメントと primer の位置

Z36946_Ba_sap	1	ATGGCAAAGACTAACTTTACAAAAAGTAATCGCTGGTACAATGACAGCAGCAATGGTA
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	1	.....
U38842_BI_S-layer	1	.....A.....
Z36946_Ba_sap	61	GCAGGTGTTGTTTCTCCAGTAGCAGCAGCAGGTA AACATTCCAGAGCTTCTGCTGAT
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	61	.....A...T.....A.....
U38842_BI_S-layer	61	.....A.....T.....A...GA
Z36946_Ba_sap	121	CACTGGGAATTGATTCTATTACTACTTAGTAGAAAAAGCGCAGTTAAAGGTAACGAC
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	121	.....C.....T
U38842_BI_S-layer	121	..T...C.GAA.....T...T...A..GT.....GCCA
Z36946_Ba_sap	181	AAAGGAATGTTTCGAGCCTGGAAAAGAATTAACCTCGTGCAGAAGCAGCTACAATGATGGCT
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	181	.....
U38842_BI_S-layer	181	G.C..T.CA.AT.GT..AACCG.GTC.A.CGA.....TTCT.....GTT..TT.CA..
Z36946_Ba_sap	241	CAAATCTTAACTTACCAATCGATAAAGATGCTAAACCATCTTTCGCTGACTCTCAAGGC
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	241	.....
U38842_BI_S-layer	241	A...T...T.....G.T...G..A...GC...T.....AAA..TG..A..AAT
Z36946_Ba_sap	301	CAATGGTACTCCATTCATCGCAGCTGTAGAAAAAGCTGGCGTTATTAAAGGTACAGGA
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	301	.....C
U38842_BI_S-layer	301	.TT...CTT.AAA..AT..T...A..T.....T..CG.....GAT...
s-layer_whos		CGCGTTTCTATGGCATCTCTTCT
Ba_sapk5		CGTTTCTATGGCATCTCTTCT
Z36946_Ba_sap	361	AACGGC---TTTGAGCCAAACGGAAAAATCGACCGGTTTCTATGGCATCTCTTCTTGTA
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	361	.....A.....
U38842_BI_S-layer	361	..A.ATAAT..CT.T..TG.A....G..T...T.C...T.C..G...A.G..A...
Z36946_Ba_sap	418	GAAGCTTACAAATTAGATACTAAAGTAAAGTAACTTCTGCAACTAACTTCAAAAGATTTA
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	418	.....
U38842_BI_S-layer	421	.GT...T..CC..A.AGAA.....G.T..C..ATT..TT..A.....TG.T.....
Z36946_Ba_sap	478	GAAACATTAACTGGGGTAAAGAAAAAGCTAACATCTTAGTTGAATTAGGAATCTCTGTT
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	478	.....C.....
U38842_BI_S-layer	481	AG.GG.C---.T.....G...G.....C....A.CC.T.....A
Ba_sapk2		T---GGTGATCAATGGGAGC
Ba-sap-tf1		GGTACT---GGTGATCAATGGGAGCC
Z36946_Ba_sap	538	GGTACT---GGTGATCAATGGGAGCCTAAGAAAACTGTAACATAAGCAGAAGCTGCTCAA
AJ012290_Bt_ctc_S-layer_	538	.....ACA.C...A.G.....
U38842_BI_S-layer	538	.....---...G.A.....G..T...T...T..CGT.....A.....
Z36946_Ba_sap	595	TTCATTGCTAAGACTGACAAGCAGTTCCGGTA---CAGAAGCAGCAAAAAGTTGAATCTGCA

AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 598 ..T.....A.....---.....T.....T  
U38842\_B1\_S-layer 595 ..T..C..GTTA..A..T..AA.A.AT.CA.AAC...GAACAGTG.T.CGA..GTAA..

Z36946\_Ba\_sap 652 AAAGCTGTTACAACCTCAAAAAGTAGAAGTTAAATTCA---GCAAAGCTGTTGAAAAATTA  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 655 .....A.....  
U38842\_B1\_S-layer 655 ..C.T..C.G.T...G.GCC.AC.C..T.A.CG..A.CTG.T.C..GAT.AA.C..GC.T

Z36946\_Ba\_sap 709 ACTAAAGAAGATATCAAAGT---AACTAACAAAGCTAACACGATAAAGT-ACTA-----  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 712 .....CG.T...T.---.G.....-.T..-----  
U38842\_B1\_S-layer 715 ..AGCT.....G.T.CGC.TGA.GGA..T....G.T.GCACT.G...CG.G..AGGAC

Z36946\_Ba\_sap 760 GTTAAAGAGGTAACCTTTATCAGAAGATAAAAAATCTGCTACAGTT---GAATTATATAGT  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 763 .....T...AA.....C.....  
U38842\_B1\_S-layer 775 .GG...TCT.C.GT.G..A.GTT.AG.GG...AT...C..AA.AAA...C.TCC.GT.

Ba-sap-tr2 TTTGTA AAAACAGAACT  
Z36946\_Ba\_sap 817 AACTTAGCAGCTAAACAACTTACACTGTAG-ATGTAACAAAAGTTGTA AAAACAGAACT  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 820 .....T.....-.....T.....GT...G..  
U38842\_B1\_S-layer 835 ..AG..AA..G...-T.C.T...TTG..A..T....T..G...GAAA...TT.CGC..

Ba-sap-tr2 AACTGTAGG  
Z36946\_Ba\_sap 876 AGCTGTAGGTTCTTTAGAAGCAAAA---ACAATCGAAATGGCTGACCAACACAGTTGTAGC  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 879 .A.....C.....---.....T.....  
U38842\_B1\_S-layer 894 ..AACA.CT.A.A..T..T.ACG.CCGTG..GA.C..GCA.T..T.TTC.A.T.AAAT.A

Z36946\_Ba\_sap 933 TGATGA-GCCAACAGCATTAC--AATTCACAGTTAAAGATGAAAACGGTACTGAAAGTTGT  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 936 .....-.....T.....A--...A.....G.....  
U38842\_B1\_S-layer 954 ...AA.A.GT...GCTGA..TCG.G.ATTT..A..TC.C..GTC.T.A.GTGA..T...

Ba-slywhoR A-----TTTGTAACGCCAGCTGCAGAA  
slylayer\_whoas A-----TTTGTAACGCCAGCTGCAGAA  
Z36946\_Ba\_sap 990 TTCA-----CCAGAGGGTATTGAA-----TTTGTAACGCCAGCTGCAGAAAAAAT  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 993 ....-----...C.....-----.....T.....  
U38842\_B1\_S-layer 1014 .G..AATAAT.T...T..C.C.CC.GCAAACATC...A.GGTGGCA.....GTC..C

Z36946\_Ba\_sap 1035 TAATGCAAAAAGGTGAAATCACTTTAGCAAAAAGGTAAGTCAACTACTGTA AAAAGCTGTTTA  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1038 .....T.....  
U38842\_B1\_S-layer 1074 A.C..GT...CTA.C.G.TGG.A.T..TG.....AA.AC.A-.G..G..GTA.AAG...

Z36946\_Ba\_sap 1095 TAAAAAA-GACGGTAAAGTAGTA-----GCTGAAAGTAAAGAAGTAAAAGTTTCTGCTG  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1098 .....-.....G.....-----.....  
U38842\_B1\_S-layer 1133 CG...CGT.G...C.TCAC...TTCTAACA...GT.T..TC....G...AACCT..A..

Z36946\_Ba\_sap 1148 AAGGTGCTGCAGTAGCTTCAATCTCTAACTGGACAGTTG---CAGAACAATAAAGCTG  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1151 .....A.....A.---...C.G..---.....  
U38842\_B1\_S-layer 1193 C..AA..AA...C.AT.AA.GATGT.GTA.TTG...A.ATA...TA..GC.GGT.TAA

Z36946\_Ba\_sap 1205 ACTTTACT-----TCTAA-----AGATTTCAAACAAAACAATAAAGTTTA---CGAAG  
AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1205 .T..C...-----.....C.....G.....---T...  
U38842\_B1\_S-layer 1253 .T.ACG..AAACC.T...GTGGAAC...C...C.TT....GC...AC..TAGTT.CT.

Ba-sap-rf1 GCGACA  
Z36946\_Ba\_sap 1250 GCGACAACGCTTACGTTCAAGTAGA---ATTGAAA--GATCAATT---TAAAGCAAAA

AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1250 . T . . . . . T . CT . . . . . ---- . . . A . . . . . C . . . . . CAA . . . . . TG . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1313 . T . . A . . A . . GGTA . C . . CAA . . TTGTTGC . C . . TTA . CA . . GAAAAC . . A . TT . . TG

Ba sap: BK1 CAACTGGAAAAGTTAA  
 Z36946\_Ba\_sap 1301 CAACTGGAAAAGTTGAATATGAGTCGTTAAACACAGAAGTTGCTGTAGTAGATAAAGCTA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1304 AT . AC . TT . . . . . C . . . . . A . . . . . T . . . . . G . . A . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1373 ATC . . A . CGCGA . . AGCCTAA . A . . A . CT . . TC . . GT . . ATCTCT . . TA . A . . C . G . G

Z36946\_Ba\_sap 1361 CTGGTAAAGTAACTGTATTATCTGCAGGAAAAGCACCAGTAAAAGTAACTGTAAAAGATT  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1364 . . . . . T . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1433 AAAT . . . . . C . GAA . C . GCTGG . T . T . C . . C . CTTA . . . . . T . . . . . --- . . CCG . T . TAA

Z36946\_Ba\_sap 1421 CAAAAGGTAAAGAACTGTTTCAAAAACAGTTGAAATTGAAGCTTTCGCTCAAAAAGC--  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1424 . . . . . T . . . . . --  
 U38842\_B1\_S-layer 1490 . . . . . ACATTT . . TT . C . . . . . GT . . . . . G . A . ACTCG . A . . CT . ACAA . . GT . . . . . TA

Z36946\_Ba\_sap 1479 -----AATGAAAGAAATTAATTAAGAAAACTAAC-GTAGCGCTTTCTACAAAAG  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1482 ----- . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1550 ATCCAGATC . . T . . AGTTG . . G . . GGT . . G . GT . . C . A . . A . AT . CGTA . . . . . CT .

Z36946\_Ba\_sap 1529 A---TGTAACAGATTTAAAAGTAAAAGCTCCAGTACTAGATCAATACGGTAAAGA-GTT  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1532 . --- . . . . . C . . . . . T . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1610 . CCAA . ACGG . GATCCATTTG . . GC . . AT . . TG . . G . . --- . . T . . AGAA . . TTCCC . CA

Z36946\_Ba\_sap 1584 TACAGCTCCTGTAACAGTAAAAGTAACTGATAAAGATGGTAAAGAAT-TAAAAGAACAAA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1587 CG . . . . . GA . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1668 A . . G . G . GT . . . . . A . . ATT . . ATG . . AC . . C . ACAA . G . . GT . C . . TCG . T . . TC

Z36946\_Ba\_sap 1643 AATTA--GAAGCTAAATATGTGAACAA-AGAATTAGT-----TCTGAA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1646 . . . . . -- . T . . . . . AA . T . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1728 TTC . . TTA . . T . . . . . GG . A . . . . . GTTG . . GC . G . . ACAATCCACTTCCAAAA . CA . .

Z36946\_Ba\_sap 1683 TGCAGCAGGTCAAGAA-GCTGGTAATTATACAGTTGTATTA---ACTGCAAAATCTGGTG  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1686 . . . . . CAT . . C . . . . . - . . . . . A . . . . . T . . A . A . . --- . . A . . T . . . . . A  
 U38842\_B1\_S-layer 1788 . . . . . AGT . . G . . . . . GTTA . G . A . C . C . TC . TGT . GAAG . . CGA . GA . . C . . - . . C

Z36946\_Ba\_sap 1739 AAAAAGAAGCAAAAGCTACATTAGCT-CTAGAATT-----AAAAGCTCCAGGTGCATTCT  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1742 . . . . . TG . . T . . A . C . . . . . -T . . . . . ----- . . . . . C . T . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1847 . TG . . CTC . . CGCTTAGAGC . T . T . T . . A . GC . GGTCA . . . . . G . GA . . C . . TGA . A

Z36946\_Ba\_sap 1793 CTAATTTGAAGTTCGTGGTTAGAAA---AAGAATTAGATAAATATGTTACTGAGGAAA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1796 . . . . . C . T . . . . . --- . T . . . . . C . . . . . A . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1907 . . . C . C . . GT . C . G . AAA . AC . . T . GCAT . TC . . . . . TC . . T . . CAC . . . . . A . CGG

Z36946\_Ba\_sap 1850 ACCAAAAGAATGCAA-----TGAAGTTCAGTTCTTCTGTAGATGCAAATGGATTAG  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1853 . . A . . . . . C . A . . ----- . GTA . . . . . T . . . . . A . . . . . T . . . . . T . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 1967 TAT . TGCTG . . . . . GCTGATT . AG . A . GA . AT . AGT . . AGA . . . . . GAAATG . . AA . A . C .

Z36946\_Ba\_sap 1904 TATTAAGGTGCGAAGCAGCTGAACTAAAAGTAACAACAACAAA-----CAAAG  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1907 . T . . . . . G . . AGAA . . . . . AAC . . T . . . . . T . . T . . G . . -----T . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 2027 CT . C . GC . AAAATT . . . . . G . AAAAC . T . . . . . GGT . A . . CAGCTGGTGT . C . .

Z36946\_Ba\_sap 1955 AAGGTAA-----AGAAGTAGACGCAACTGATGCACAAGTTACTGT-----ACAAA

AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 1958 . T . . . . . ----- . T . . G . . T . . . . . TCA. GT. . . . . AG. . . . . ----- . A. TG  
 U38842\_B1\_S-layer 2087 . T . T . TCTTAACGA. . . AT. G. . T . . A . C . . G . . C . CA. . . A. TACTGTTAC. . . . G

Z36946\_Ba\_sap 2000 ATAACAGTG---TAATTACTGTTGG---TCAAGGTGCAAAAGCTGG-----TGAAACTT  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 2003 .. GCTGC. . GCAC. . . . . . . . . . . A. . ---AA. T. AA. . . . . . . . . . . ----- . . . . . A.  
 U38842\_B1\_S-layer 2147 . A . T. TCCAAA. C. CAT. . . . . AAATT. A. . . . . A. . T. G. G. T. . AGCAATT. . . . . ACC

Z36946\_Ba\_sap 2048 ATAAAGTAACAGT-----TGTACTAGATG---GTAAATTAATCACAACCTCATTTCATTC  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 2054 . . . . . . . . . . T. . -----A. . . GC. . . C. ---. . . . . GC. . . . . . . . . . . . . . . T  
 U38842\_B1\_S-layer 2207 G. . . . . T. ATA. CGACAGA. . . . . C. TCGT. A. G. G. G. . -. A. GA. G. . GTTC. A

Z36946\_Ba\_sap 2098 AAAGTTGTTGA-TACAGCACC--AACTGCTAAAGGATTAGCAGTAGAATTTACAAGCACA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 2104 . . . . . . . . . . -C. . . . . . . . . . --TG. A. . . . . AA. . . . . . . . . . . T. . C. . . . . . . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 2266 . . T. GCA. CA. A. TA. A. . T. TC. . . A. AAC. TAA. G. . CGTA. C. TTGA. GA. G. T. . .

Z36946\_Ba\_sap 2155 TCTCTTAAAGAAGTAGCTCCAAATGCTGATTTAAAGCTGCACCTTTTAAATATCT---TA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 2161 . . . . . . . . . . C. . G. . T. . . . . A. GG. AGC. . A. . . . . A. . . . . . . . . . . C. . . . . . . . . . C---. .  
 U38842\_B1\_S-layer 2326 GAG. AAGG. A. . . . GTAC. T. G. . CG. A. CGAC. . T. . . . . A. . T. CGACGG. . A. GATG. T

Z36946\_Ba\_sap 2212 TCTGTTGATGGTGTACCTGCGACTACAGCAAAAGCAACAGTTTCTAATGTAGAATTTG-T  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 2218 . . A. . . . . . . . . . T. . A. . A. . A. . T. . GGGT. . . . . T. . AA. . G. C. . GA. . . . . . . . . . -.  
 U38842\_B1\_S-layer 2386 G. GC. . . G. TA. . . . A. A. . TGT. . A. T. . . T. AT. . . . . . . . . . . A. A. . G. AA. . AC

Z36946\_Ba\_sap 2271 TTCTGCTGACAC--AAATGTTGTAGCTGAAAA---TGGTACAGTTGGTGCAAAAGGTGCA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 2277 . . . . . A. . T. . --. . . . . . . . . . AG. . . . G. AAC. . C. . AGT. . . . . A. . . . . . . . . . T. T  
 U38842\_B1\_S-layer 2446 . . A. T. AA. TT. TT. . C. . A. . A. . A. . . CT. CTAACAAA. AT. A. . TCTTC. . . . . . . . . T.

Z36946\_Ba\_sap 2326 ACATCTATCTATGTGAAAAACCTGACAGT--TGTAAGATGGAAAAGAGCAAAA-AGTA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 2335 . . T. . A. . . . T. . . . A. . . . G. A. . T. . T. . --. AA. . . . . G. . AGC. . ACA. . . . . . . . . . T  
 U38842\_B1\_S-layer 2506 . . . A. . GCA. T. . GAG. T. . AGGT. . . . . AA. C. TT. . AG. AATG. . AGA. . G. GT. . C.

Z36946\_Ba\_sap 2383 GAATTTGATAAA-GCTGTACAAGTTGCAGTTTCTATTAAGAAGCAAAACCTGCAACAAA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 2392 . . GC. . . . C. . G-C. A. . . . G. . . . A. AT. . . . . . . . . . . T. . . . . ---. A. GT. . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 2566 CC. AC. AC. G. GTATG. . . . . A-A. . T. . AA. A. . C. . C. TTATT. . . . . ---. A. GA. . T

Z36946\_Ba\_sap 2442 ATAA  
 AJ012290\_Bt\_ctc\_S-layer\_ 2448 . . . .  
 U38842\_B1\_S-layer 2622 C. . .

Ba-sapt F1/R1

Ba-sapt F1/R2

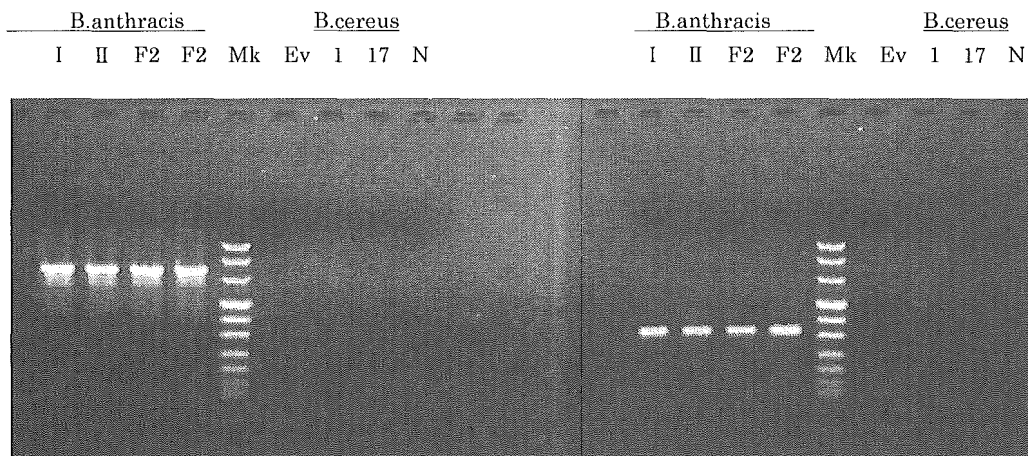


図 2. 新規 primer および反応条件による炭疽菌 s-layer の特異的検出

アニーリング温度：第 1 サイクルステップ 58.5℃、第 2 サイクルステップ 60℃

Primers : Ba-sapt F1/R1、Ba-sapt F1/R2、s-layer-who F/R、Ba-sapk nF1

B.anthraxis : I 描株, II 描株, 34F2 株、B.cereus : NO.1、17、Ev. : 河川分離株 NO.1

(いずれも sapk-PCR で陽性の株)

Mk : DNA molecular maker; 19-1, pUCBM21/Hpa II + pUCBM21/Dra I +HindIII



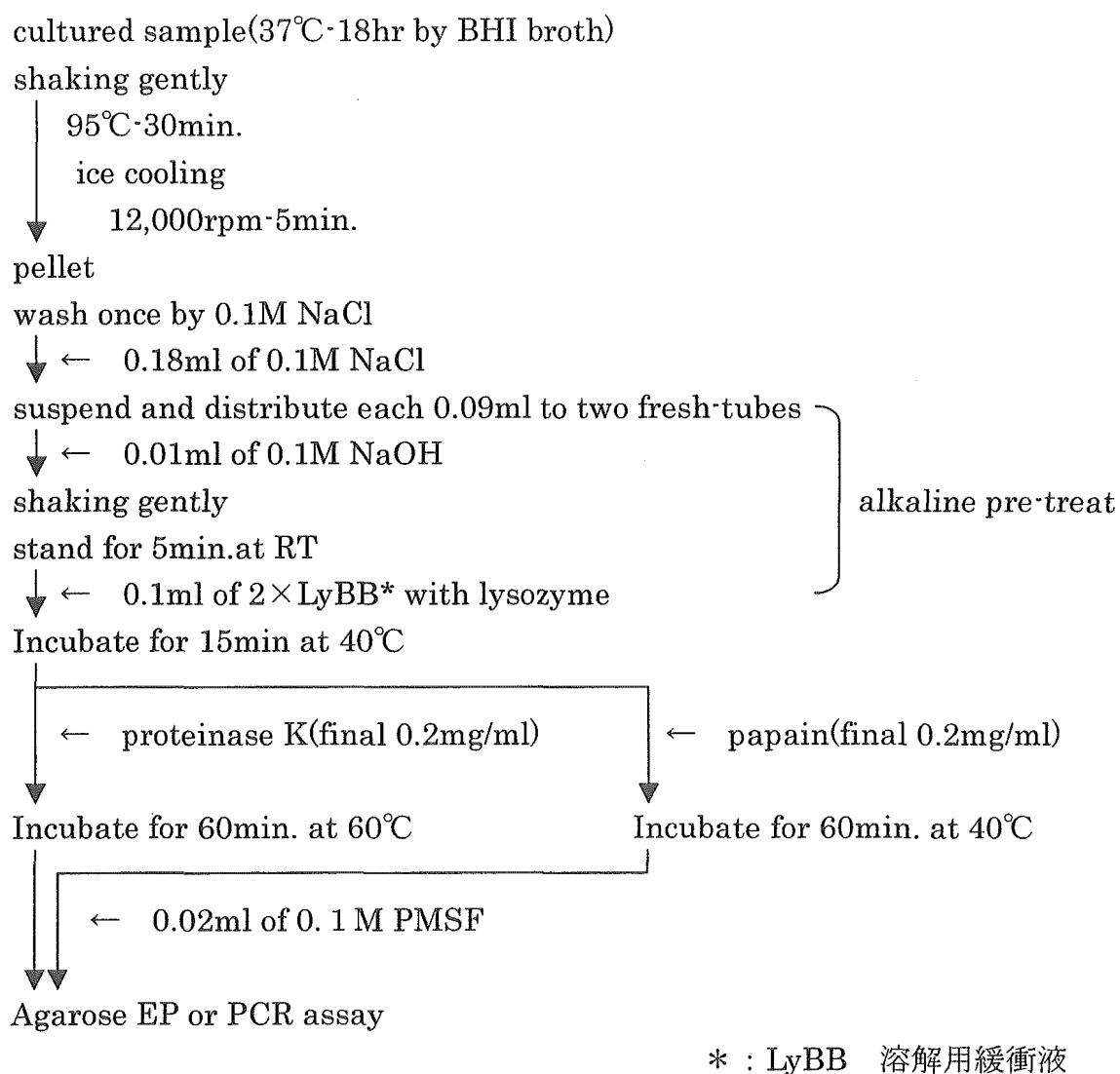


図3. Bacillus 属芽胞からのゲノム調製法

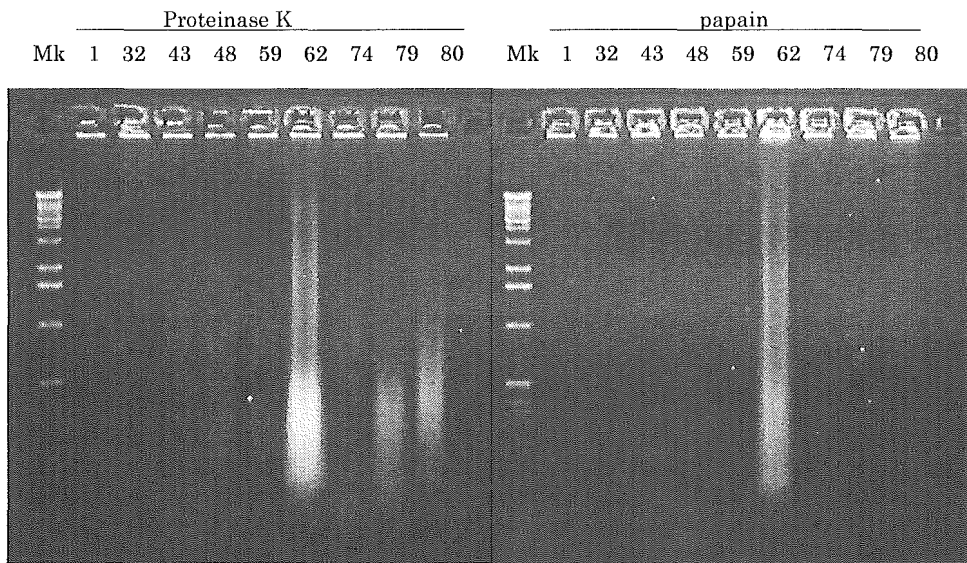


図 4. *Bacillus* 属芽胞から調製したゲノムの電気泳動像

河川分離株を使用した。使用したタンパク分解酵素は電気泳動像の上に表した。

Mk : DNA 1kbp ladder marker

表2. セレウス菌分離株のPCR結果

アニーリング温度は、第1サイクルステップ57°C、  
第2サイクルステップ60°Cで行った。

菌株番号	由来	rpoB	Ba813	sapk
1	植物	-	-	+
2	植物	+	-	-
3	植物	-	-	+
4	植物	+	-	-
5	植物	+	-	-
6	植物	-	-	+
7	植物	-	-	-
8	植物	-	-	+
9	植物	-	-	+
10	植物	+	-	-
11	植物	+	-	+
12	植物	+	-	-
13	植物	ND	-	-
14	植物	+	-	-
15	植物	+	-	+
16	植物	+	-	+
17	植物	+	-	+
18	植物	+	±	-
19	植物	+	-	-
20	植物	±	-	+
21	植物	+	-	-
22	食肉	+	-	-
23	食肉	+	-	-
24	食肉	ND	-	-
25	食肉	+	+	-
26	食肉	+	+	-
27	食肉	ND	+	-
28	食肉	ND	-	+
29	食肉	ND	-	+

ND: Not Determined

表3. 高温選択した河川分離株の改良PCRの結果

primer名の下での温度は、第1サイクルステップのアニーリング温度を示す。  
第2サイクルステップのアニーリングは全て60°Cで行った。

菌株 番号	16S rDNA配列からの推定菌種	rpoB	Ba813	sapk	sapt	sapt	slayer
		57°C	57°C	57°C	F1/R1 58.5°C	F1/R2 58.5°C	WHO 58.5°C
1	<i>B. cereus/thuringiensis</i>	+	-	+	-	-	-
2	<i>B. SUBTILIS/LICH</i>	-	-	-	ND	ND	ND
3	<i>B. SUBTILIS/LICH</i>	-	-	-	ND	ND	ND
14	<i>B. subtilis/licheniformis</i>	-	-	-	-	-	-
15	<i>B. mycoides</i>	-	-	-	-	-	-
21	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	ND	ND	ND
22	<i>B. subtilis/licheniformis</i>	-	-	-	ND	ND	ND
24	<i>B. SUBTILIS/LICH</i>	-	-	-	ND	ND	ND
28	<i>B. cereus/thuringiensis</i>	+	-	-	-	-	-
32	<i>B. anthracis/cereus/thuringiensis</i>	+	-	-	-	-	-
34	<i>B. SUBTILIS</i>	-	-	-	ND	ND	ND
43	<i>B. anthracis/cereus/thuringiensis</i>	+	-	-	-	-	-
48	<i>B. thuringiensis/sereus</i>	+	-	-	-	-	-
52	<i>B. SUBTILIS</i>	-	-	-	ND	ND	ND
57	<i>B. SUBTILIS/LICH</i>	-	-	-	ND	ND	ND
59	<i>B. anthracis/cereus/thuringiensis</i>	+	-	-	-	-	-
62	<i>B. SUBTILIS/LICH</i>	-	-	-	-	-	-
66	<i>Paenibacillus alvei</i>	-	-	-	-	-	-
74	<i>B.cereus</i>	+	-	-	-	-	-
79	-	+	-	-	-	-	-
80	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-

ND: Not Determined