



Application

モバイル型リアルタイムPCR装置「Franklin」を用いた 野外フィールドにおけるバクテリアの16S rRNAの検出

製品名

Franklin™ Real-Time PCR Thermocycler (Cat.No.1000005/SET)

メーカー名

Biomeme, Inc.

本データは、広島大学 学術・社会連携室 環境遺伝生態学分野 藤吉 奏 様のご厚意により掲載させていただきました。

実験概要

本機器は、電源がない野外フィールドなどで、PCRを実施することができるモバイル型リアルタイムPCR装置である。海洋に生息する微生物量をオンサイトで分析可能かを検証するため、本機器および試料採取・測定のために必要な機材・器具類をスーツケースひとつにまとめ (Fujiyoshi *et al.* 2020, *Env Sci. Pollut Res*, 28: 14144–55)、広島大学生物生産学部付属練習船基地にて測定を実施した。

実験1: 実験室内で培養株を用いた予備実験

実験室において培養した *Cocleimonas flava* より、ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kitを用いてDNAを抽出した。抽出したDNA (100倍希釈) を鋳型として、以下の条件にてqPCRを行った。

● サンプル

Cocleimonas flava 1コロニー

● 核酸精製キット

ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH, Cat. No. D4300)

● Standard Template DNA

Cocleimonas flava のゲノムDNAにおける16S rRNA 遺伝子V1-V9領域のPCR増幅産物

● PCR試薬

KAPA3G Plant PCR Kits (KAPA BIOSYSTEMS, Cat. No. KK7251)

● 反応組成

PCR grade water	6.54 μL
2X KAPA Plant PCR Buffer	10.0 μL
10 μM Forward Primer	1.0 μL
10 μM Reverse Primer	1.0 μL
10 μM Probe (FAM)	0.3 μL
Template DNA	1.0 μL
2.5 U/μL KAPA3G Plant DNA Polymerase	0.16 μL
Total	20.0 μL

● 反応条件

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial Denaturation	95 °C	15 sec	-
Denaturation	95 °C	10 sec	40 Cycles
Annealing	60 °C	30 sec	

Active Channels : Green

● プライマー, プローブ

Total bacterial 16S rRNA gene

Forward Primer (1055f) : 5' -ATGGCTGTCGTCAGCT-3'

Reverse Primer (1392r) : 5' -ACGGGCGGTGTGTAC-3'

Probe (16STaq1115) : 5' -[6-FAM]-CAACGAGCGCAACCC-[6-TAMRA]-3'
(Hams *et al.* 2003, *Environ Sci. Technol.* 37, 343–51.)

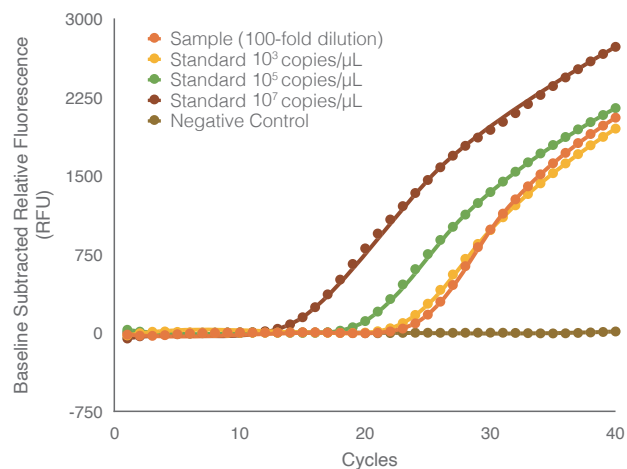
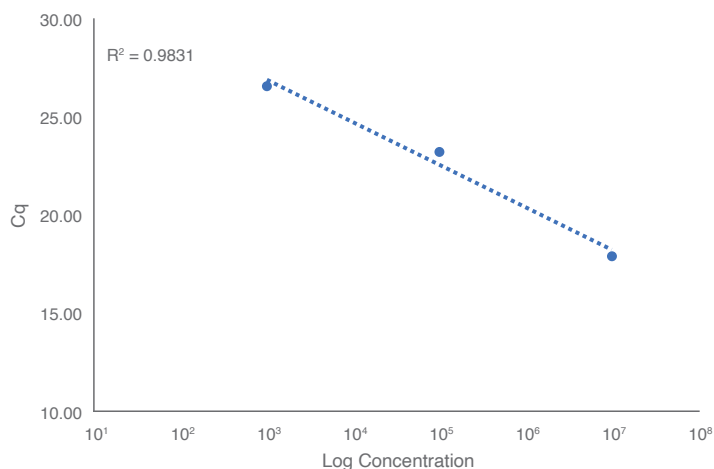


Franklin

INITIAL DENATURE	
Set Temperature	95°C
Set Time	15secs
CYCLING DENATURE	
Set Temperature	95°C
Set Time	10secs
CYCLING ANNEAL	
Set Temperature	60°C
Set Time	30secs
Cycles	40

反応条件の設定画面

結果 1

増幅曲線

検量線


	Sample (100-fold dilution)	Standard 10 ³ copies/μL	Standard 10 ⁵ copies/μL	Standard 10 ⁷ copies/μL
Cq	27.24	26.61	23.26	17.95

検量線より算出したサンプル原液のコピー数 : 7.3×10^4 copies/μL

結果 予備実験では、目的遺伝子を検出することができた。

実験 2 : 野外フィールドにおける実験

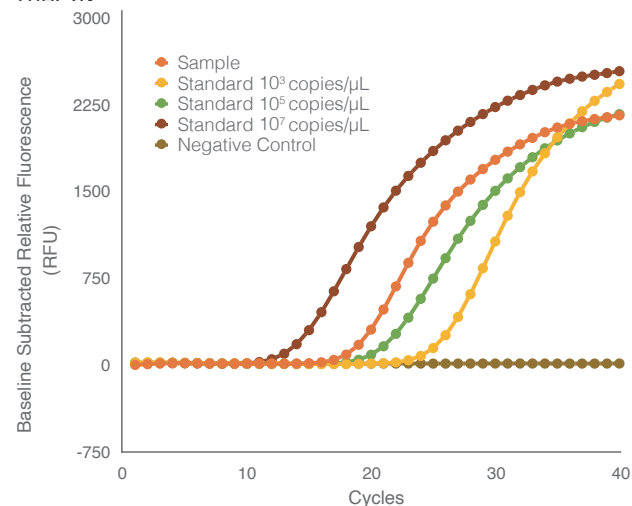
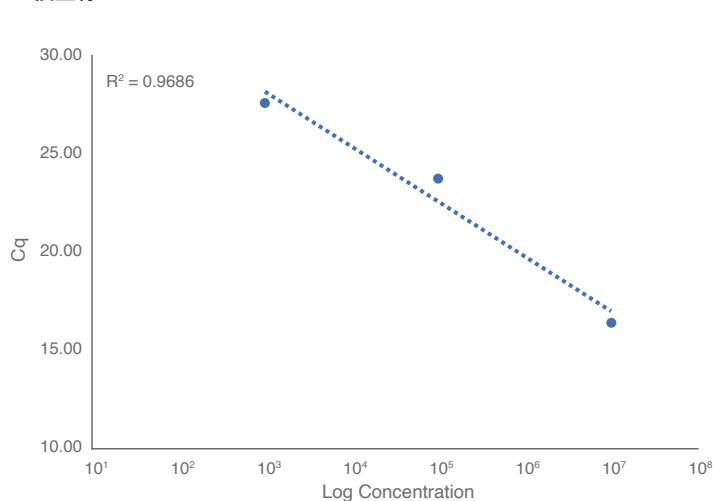
野外フィールドにおいて採取した海水をろ過したフィルターから抽出したDNAを鋳型として、qPCRを行った。

● サンプル

500 mLの海水をろ過したφ0.22 μmフィルター

核酸精製キット, Standard Template DNA, PCR試薬, 反応組成, 反応条件, プライマー, プローブ, は、実験1に準じる。

結果 2

増幅曲線

検量線


	Sample	Standard 10 ³ copies/μL	Standard 10 ⁵ copies/μL	Standard 10 ⁷ copies/μL
Cq	21.22	27.55	23.70	16.37

検量線より算出したサンプルのコピー数 : 3.0×10^5 copies/μL

結果 野外フィールドでも同様に、目的遺伝子を検出することができた。

● まとめ

電源が無い野外フィールドでも、本装置を用いて海洋に生息する微生物のコピー数を算出することができた。

補足1: ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kitを使用したDNA抽出工程

サンプル*をZR BashingBead Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm)に入れる

*海水をろ過したフィルターは、細かく切ってから処理する



※フィールドでの遠心条件

使用遠心機：プチまる8 1.5 (2.0) mL チューブ8 本用卓上遠心機 (ワケンビーテック株式会社, Cat. No. WKN-2322)

使用遠心機の回転速度は、ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kitの取扱説明書記載の回転速度よりも低いため、遠心時間を適宜延長し、DNA抽出を行った。

補足2: 藤吉様の研究と野外フィールドにおける実験の様子

● 藤吉様の研究について

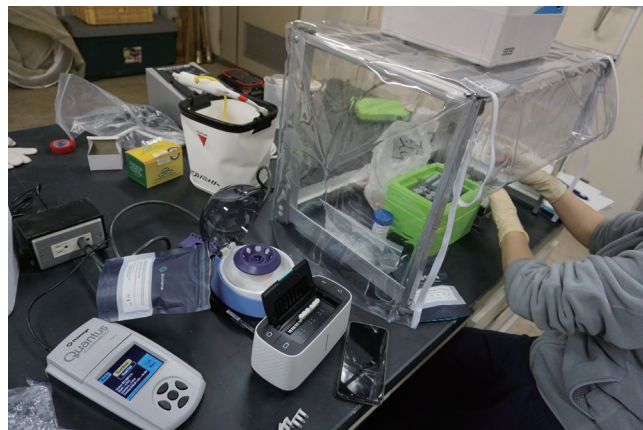
微生物が微生物同士や環境とどのように相互作用して生息しているかについて、実験・ビッグデータ解析の両面から取り組まれています。特に、住環境の微生物動態、微生物と気候変動との関係、赤潮、養殖場の抗生物質耐性に着目されています。

● 野外フィールドにおける実験について

上記研究を電源が無い野外フィールドで実施する際、「バッテリー駆動かつ持ち運び可能な装置」としてFranklinが使用されています。藤吉様の研究室では、下記の写真のようにひとつのスーツケースに機材・器具類をまとめ（スーツケースラボ）、野外フィールドでの実験が行われております。



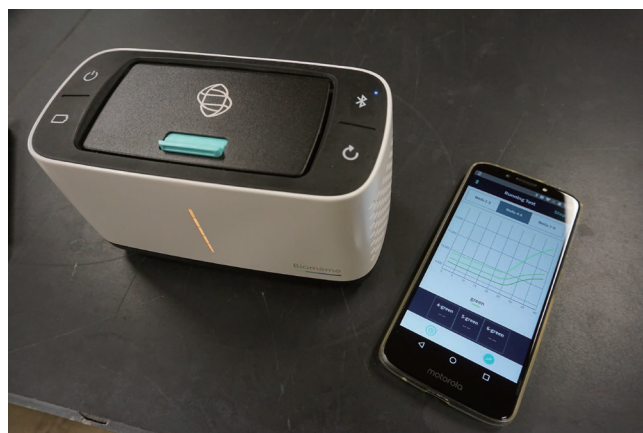
野外フィールドでのサンプル採取



サンプル調製の様子



スーツケースラボの中身



qPCR中のFranklin



お客様のコメント

フィールドで実施する際にコンセントがないことが多いため、バッテリー駆動なのは助かりました。また、スマホから簡単に操作、操作手順に従うだけでランを始めることができました。作業中は試薬や試料で汚れるためパソコンを出しにくいのですが、結果もスマホからリアルタイムに見ることができるのがよかったです。