

# 夾雑物を除去する洗浄技術開発と応用分野検討

## 1. 目的

生命科学系の試験で使用する製品の多くは DNA、微生物等の夾雑物が除かれた品質が求められる。そこで、該当製品に対して高いレベルでの夾雑物フリーを達成する洗浄技術の確立が必要である。本研究では、DNA 分解に有効な方法及び製品の洗浄に有効な方法を検討した。

## 2. 方法と結果

### 2-1. DNA 分解方法の検討

DNA 分解方法を検討するため、市販の DNA 試薬 (100 bp DNA Ladder 130 ng/μL タカラバイオ) 10 μL を、洗浄試薬 A、洗浄試薬 B、洗浄試薬 C とそれぞれ混合し、5 時間静置した後に 2% アガロースゲル (Agarose21 ニッポンジーン) 電気泳動を行った。その結果、洗浄試薬 C はバンドが確認されず、DNA が分解されたことが示唆された。また、洗浄試薬 A は薄いバンド、洗浄試薬 B は濃いバンドが確認されたため、洗浄試薬 A 及び洗浄試薬 B の DNA 分解能は低いと考えられる。これらの結果より、DNA 分解には洗浄試薬 C が最も有効であることが示唆された。

### 2-2. 製品の洗浄試験

生命科学系試験で使用する製品 (本研究ではスワブを採用) を意図的に細菌で汚染させ、製品の洗浄に有効な方法を検討した。定常期まで前培養した *E.coli* をスワブ拭き取り部に 100 μL 滴下し、室温で 10 分間乾燥させた。次に、各洗浄試薬 (A, B, C) にスワブ拭き取り部を浸漬させ、室温で 5 時間静置した。滅菌水 3 mL の入ったバイアルにスワブを入れ、1 分間ボルテックスを行った。内容液 1 mL について、NucleoSpin Tissue (タカラバイオ) を用いて DNA を抽出した後、PCR を行った。PCR 試薬を表 1 に示した。

表 1. PCR 試薬

試薬	(μL/チューブ)	終濃度
FAST SYBR Green Master Mix	10	
Forward primer : 1369F	2	1,000 nM
Reverse primer : 1492R	2	1,000 nM
sample	2	
dH <sub>2</sub> O	4	
Total volume	20	

本研究で用いたユニバーサルプライマーは、16S ribosomal RNA の保存領域をもとに作製した。プライマーの配列を表 2 に示した。

表 2. プライマーの配列

プライマー	配列 (5' to 3')
1369F	CGGTGAATACGTTTCYCGG
1492R	GGWTACCTTGTTACGACTT

PCR を行った後、2%アガロースゲル電気泳動でバンドを確認した。結果を写真 1 に示した。

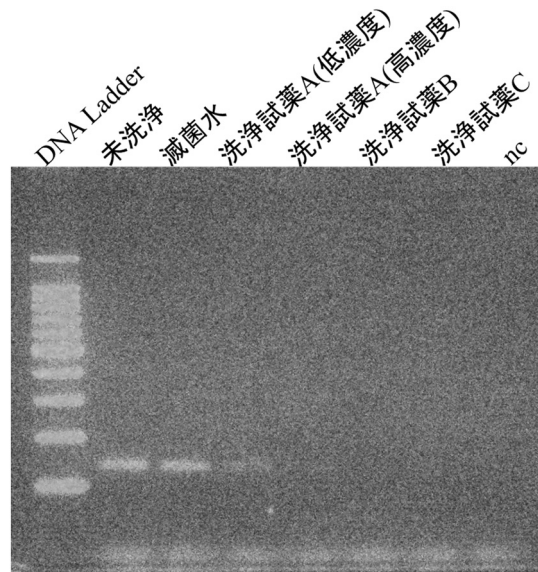


写真 1. スワブの洗浄試験結果

洗浄試薬 B, C についてバンドが確認されなかったことから、スワブから細菌及び DNA を除去できたことが示唆された。しかし、スワブ浸漬後の内容液の pH を pH 試験紙で測定したところ、洗浄試薬 B, C はスワブに残留していることが確認された。

## 3. まとめ

DNA 分解とスワブ洗浄の双方に有効であったのは洗浄試薬 C であった。しかし、洗浄試薬 C はスワブへの残留が確認されており、実用化のためには品質への影響確認や、洗浄試薬 C の除去が必要であると考えられる。