

耐熱性真菌を判別するための技術開発

－修飾オリゴヌクレオチドを用いた核酸増幅技術－

成果の特徴

- 遺伝子増幅技術では、反応条件により僅かな塩基配列の違いを誤認識して増幅反応が進行することで、不正確な増幅結果を生じる可能性があり、類縁性の高い生物種間の正確な判別を困難にしています。
- 本研究では、Locked Nucleic Acid (LNA) と呼ばれる修飾オリゴヌクレオチドを導入したプライマーを採用することで、加工食品等の汚染原因となり、検出や判別の難しい耐熱性真菌 (*Byssochlamys*属菌, *Neosartorya*属菌, *Eurotium*属菌) の特異的判別技術を開発しました。

①プライマー配列の任意の塩基をLNAオリゴに置換

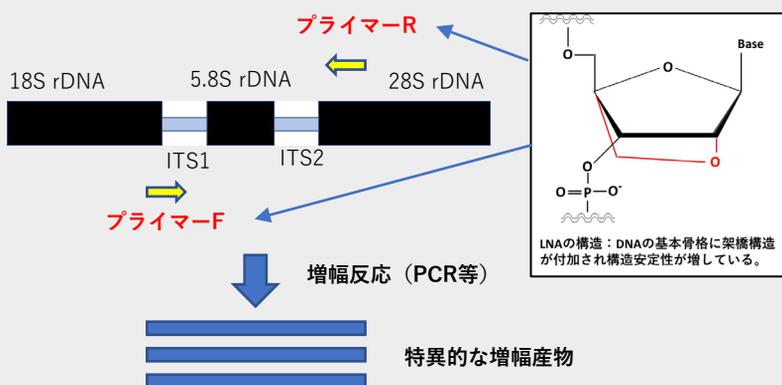


表1. 検出試験に使用した耐熱性真菌

1	NBRC100713	<i>Eurotium chevalieri</i>
2	NBRC112071	<i>Eurotium herbariorum</i>
3	NBRC31809	<i>Eurotium repens</i>
4	NBRC7712	<i>Eurotium rubrum</i>
5	NBRC 33243	<i>Neosartorya primulina</i>
6	NBRC 33244	<i>Neosartorya pseudofischeri</i>
7	IFM 58746	<i>Byssochlamys lagunculariae</i>
8	IFM 59486	<i>Byssochlamys nivea</i>
9	NBRC9929	<i>Talaromyces cejpaii</i>
10	NBRC5728	<i>Talaromyces apiculatus</i>
11	IFM54318	<i>Hamigera insecticola</i>
12	IFM57795	<i>Hamigera striata</i>
13	IFM60075	<i>Thermoascus thermophilus</i>
14	IFM61569	<i>Thermoascus aegyptiacus</i>
15	NBRC106929	<i>Eupenicillium brefeldianum</i>
16	NBRC6032	<i>Eupenicillium cinnamopurpureum</i>
17	IFM62629	<i>Aspergillus fumigatus</i>
18	IFM62508	<i>Aspergillus fumigatus</i>
19	RIB40	<i>Aspergillus oryzae</i>
20	NRRL2999	<i>Aspergillus parasiticus</i>

②修飾構造の付加により構造安定性が増し、融解温度が上昇することで特異的増幅が生じる。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

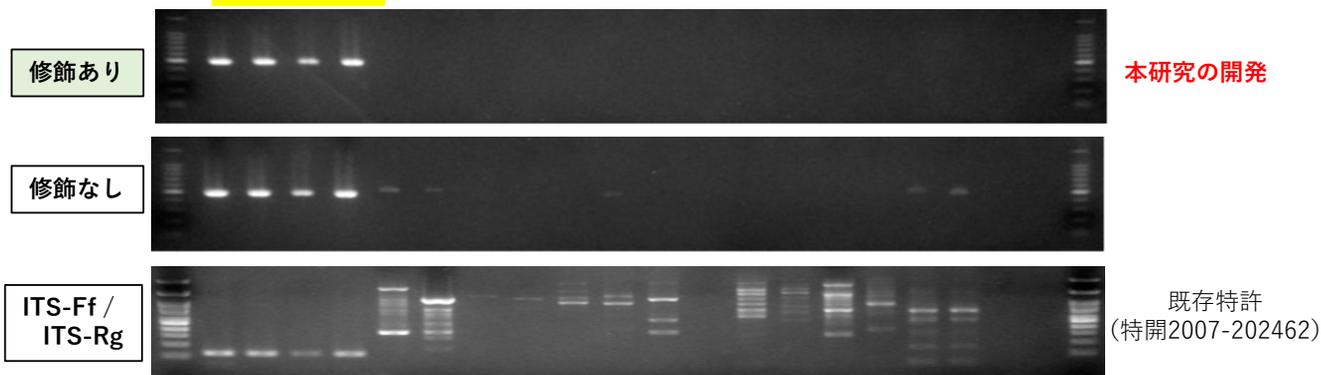


図3. *Eurotium*属菌の特異的検出を目的としたプライマーセットによる遺伝子増幅結果の比較

LNAオリゴを導入したプライマーセットによる増幅 (上段) では、*Eurotium*属菌のみが特異的に増幅産物を生じる。同じ配列のプライマーセットであっても、LNAオリゴ無し (中段) では対象属菌以外にも増幅産物を生じる。

参考

特開2021-141882：標的核酸検出用オリゴヌクレオチド及びその用途

革新的技術開発・緊急展開事業(経営体強化プロジェクト)のうち、「包装米飯及び高圧加工コンポートの流通期間延長技術の開発」(2018-2020)により開発されました。