

植物防疫基礎講座：

昆虫類やダニ類からの DNA 抽出と PCR の実践

近畿中国四国農業研究センター み う か ず
三 浦 一 芸

は じ め に

DNA を扱う技術は日進月歩である。それに伴い、昆虫類やダニ類の分類、同定、行動、遺伝および農薬等の応用分野についても DNA が利用されてきている。しかし、「難しそう」、「お金がかかりそう」、「周りにやっている人がいない」等の理由でそれらの技術を敬遠している人も多い。また、各研究室の伝統みたいなものがあり、「なぜ」そんなやり方をするのかという不思議なことを目撃することがある。ここでは、難しい理論は避け、DNA を扱う手法の入り口である DNA 抽出と PCR (polymerase chain reaction) について簡単に安いか具体的なルーチンを紹介する。

I DNA 抽出 (PCR 用テンプレート)

DNA を抽出する方法はたくさんある。ここではまず安いか方法、次に確実に抽出する方法を紹介する。

まず、それぞれの方法に入る前に、発泡スチロールの入れ物にクラッシュアイスを入れる (図-1)。次に、サーマルサイクラー用の 0.2 ml のチューブに区別のための番号をマジックなどで書き込む (図-1)。そして、チューブをサーマルサイクラー用のベースに置く (図-1)。この 0.2 ml チューブは PCR 用のチューブと色違いにしておく後に探すのに楽である (図-1 のチューブは左が色つき、右が白色 (不透明))。例えば、私たちの研究室では PCR 用テンプレートは色つきのチューブで、PCR は白色 (不透明) のチューブである。また、サーマルサイクラー (図-2) の電源を入れておく。PCR にかけていたい虫体が小さい場合は体全体から DNA を抽出する。また、虫体が大きい場合は脚とか必要な部分を適当にカットして DNA を抽出する。

1 キレックス法

(1) 0.2 ml のサーマルサイクラー用チューブに 5% の Chelex 100 (95% は滅菌した超純水) (図-3) 30 μ l を入れる、その中に虫体を入れる。顕微鏡などを使い確実に潰す。潰すには先が尖った使い捨てのプラスチック

爪楊枝が適している (図-4)。

(2) その中に proteinase K (20 mg/ml) を 2 μ l 入れる。Chelex 100 は余分なものの吸着や DNA 分解酵素の阻害等に役に立っている。Proteinase K は邪魔なタンパク質を分解する。



図-1 実験の準備



図-2 サーマルサイクラーの例 (アプライドバイオシステムズ GeneAmp PCR system 9700)

Introduction of DNA Extraction and PCR Method. By Kazuki MIURA

(キーワード: DNA 抽出, PCR, プロトコール)



図-3 キレックス

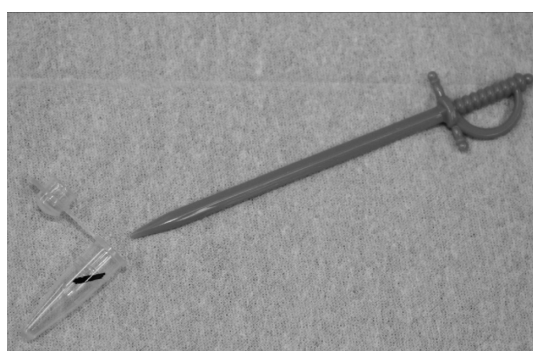


図-4 使い捨てプラスチック爪楊枝と PCR 用 0.2 ml チューブ



図-5 サーマルサイクラーで DNA 抽出

(3) サーマルサイクラーで 56°C 2 時間以上, 99.9°C 3 分かける (図-5)。その後は 4°C または -20°C で維持または保存する (図-5)。私は早急な場合以外 56°C を 24 時間以上する。

(4) これで DNA 抽出が終わり, PCR 用のテンプレートができる。

(5) Chelex 100 は粒状である。分注器 (ピペットマンなど) のチップによってはこの粒が入らない場合がある。ギルソン社の純正チップは Chelex 100 を分注することは可能であるが, 他の会社のチップを使用する場合は顕微鏡で確認することが必要である。

2 アルカリ法

(1) 0.2 ml のサーマルサイクラー用チューブ (大きい虫などは 1.5 ml チューブなど) に 20 μ l の 50 mM NaOH を入れる。その中に虫体を入れる。そして, キレックス法と同様に顕微鏡下で潰す。なお, NaOH は劇物なので取り扱いに注意する。

(2) サーマルサイクラーなどで 95°C 15 分維持する。

(3) 取り出し 20 μ l 0.2 M Tris-HCl (pH8.0) を加え軽く混合しチビタン (図-6) などでスピンドウンする (軽く回す)。

(4) これで DNA 抽出が終わり, PCR 用のテンプレートができる。

3 PrepMan™ Ultra Reagent 法 (アプライドバイオシステムズ: 商品番号 4322547, 15,000 円)

(1) 1.5 ml チューブに 200 μ l の PrepMan™ Ultra Reagent を入れる (虫体の大きさに合わせて量を調整する: 虫体の量は PrepMan™ Ultra Reagent の 5 ~ 20% 程度)。その中に虫体を入れる。

(2) キレックス法と同様に顕微鏡下で潰す。ボルテックス (図-6) で混合し, チビタン (図-6) などでスピンドウンする (軽く回す)。



図-6 ボルテックス (左), チビタン (中央), ボルテックス (右)

(3) サーマルサイクラー (図-2) などで 100℃ (99.9℃) で 10 分置く。

(4) 取り出し室温で 2 分放置する。

(5) 遠心機で 16,000 g 3 分間遠心する。

(6) 上清を PCR 用テンプレートとして使用する。

4 DNeasy[®] Blood & Tissue 法 (キアゲン: 商品番号 69504, 23,000 円)

上記三つの方法で DNA が抽出できなかった場合、市販のキットを使うことになる。また、古い標本からの DNA の抽出は最初からこのキットを使うほうが成功の確率が高くなる (状態によっては DNA は抽出できないという意味である)。

ウオーターバスまたはインキュベーターを用意し、56℃に設定する。

(1) 1.5 ml チューブに 180 μ l の ATL buffer を入れる。その中に虫体を入れる。確実に潰す。

(2) 20 μ l の proteinase K を加える。ボルテックスで混合した後、56℃で 1 時間以上置き完全に溶かす。ときどき取り出して様子を見てボルテックスで混合する。溶けていなかったら再び 56℃へ。

(3) 一定時間たったものを 15 秒間ボルテックスで混合する。200 μ l の AL buffer を加えて 10 秒間ボルテックスで混合した後、200 μ l のエタノールアルコール (96 ~ 100%) を加える。再びボルテックスで混合してチビタンなどでスピンドウンする。

(4) DNeasy Mini spin column を添付の 2 ml コレクションチューブに立て、分注器 (ピペットマンなど) で (3) の溶液を移す。遠心機で 6,000 g (8,000 rpm) 1 分間遠心する。廃液が出ているコレクションチューブを捨てる。

(5) 新しいコレクションチューブに交換し、DNeasy Mini spin column に 500 μ l の AW 1 buffer を加え、6,000 g (8,000 rpm) で 1 分間遠心する。

(6) 新しいコレクションチューブに交換し、DNeasy Mini spin column に 500 μ l の AW 2 buffer を加え、20,000 g (14,000 rpm) で 3 分間遠心する。

(7) 新しい 1.5 ml のチューブに DNeasy Mini spin column を立て、AE buffer を 200 μ l 加え、室温で 1 分間置く。その後 6,000 g (8,000 rpm) で 1 分間遠心し、DNA を溶出する。

(8) (7) を繰り返す。

古い標本から DNA を抽出したい場合、まず虫体をできるだけ粉々にする。特に背中側を粉々にするとよい (筋肉量が多いため)。また、(2) の 56℃での維持を数日 (2 日以上) 行う。毎日 1 回 proteinase K を同量加え

るとよい。(7) は虫体に合わせて量を変えるとよい。例えば、虫体が小さい場合 AE buffer を 50 μ l ぐらいにする。

上記の方法で DNA 抽出が終わりにすぐに PCR 法を行わない場合、-20℃の冷凍庫に保管する。保管するときに小さなビニール袋に入れ、紙にメモ書きをし同封すると場所をとらない保管ができる。

II PCR

PCR 用テンプレートができれば、次に PCR に移る。

プライマー (primer)

DNA の特定の領域を増幅するためにはプライマーが通常 2 本 1 組必要となる。PCR を行う目的に沿った参考論文からプライマーの配列を探すことになる。例えば、DAVIES et al. (2009) の p. 537 に C1-J-1718 (5'-GGA GGA TTT GGA AAT TGATTA GTT CC-3') and C1-N-2329 (5'-ACT GTAAAT ATA TGA TGT GCT CA-3') (ex SIMON et al., 1994) と書かれている。C1-J-1718 がプライマーの名前で 5'-GGA GGA TTT GGA AAT TGATTA GTT CC-3' が配列である。これらを invitrogen 社のウェブサイト (<https://www4.invitrogen.jp/poem/Login.jsp>) などから注文する (図-7)。私は乾燥、スケールが 50 nmol、精製が脱塩、5' 修飾なし、3' 修飾なしとして、簡易入力に C1-J-1718, GGA GGA TTT GGA AAT TGATTA GTT CC と入力し段を下げ、C1-N-2329, ACT GTAAAT ATA TGA TGT GCT CA と入力して以下メッセージに合わせて注文する。おおよそ 1 本 1,000 円前後である。

郵送されてきたものを PCR 用のプライマーにするには、以下のようにする。送られてきたプライマーのチューブのラベルを見ると「45.8 nmol」と表示されている。nmol を μ l に置きかえ、数値を 10 倍した量の滅菌水を送られてきたチューブに入れる (例えば、45.8 nmol → 458 μ l の滅菌水を入れる)。そして軽くボルテックスで混合する。チューブから 100 μ l とり、1.5 ml チューブに入れる。そして、900 μ l の滅菌水を加える。これで PCR 用のプライマーができたことになる。使わないときは -20℃で保管する。

文献などを調べても使えそうなプライマーがない場合、ミトコンドリア DNA のプライマーは SIMON et al. (2006) に多数書かれている。以前、核のプライマーもウェブサイトにあったが、最近では削除されている。ご一報いただければ配列を紹介する。

AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix の場合

(1) 発泡スチロールの入れ物にクラッシュアイスを入れる。次に、サーマルサイクラー用の 0.2 ml のチュ

簡易入力

> 乾燥品

※プライマーの複数入力が、簡易な操作で行えます。
※研究者、スケール、精製、脱塩が共通です。プライマー名とシーケンスを入力して作成します。

プライマーの複数登録

研究者名

miurakazuki

(半角英字30文字まで)

スケール

50nmol

精製

脱塩

5'修飾

修飾なし

3'修飾

修飾なし

各項目の説明

入力方法は、下記の2つの方法(「直接キー入力」、「Excelを利用して入力」)があります。

<直接キー入力>

下の欄に、プライマー名とシーケンスをカンマ(,)で区切って入力してください。
複数件の登録を行うには改行して、1行に1件となるように入力してください。
(例)
primer1,AAAAAAAAAAAA
primer2,GGGGGGGGGGGG

<Excelを利用して入力>

1. まず、プライマー名とシーケンスを入力する指定形式のEXCELのテンプレートをダウンロードしてください。
2. Excelのテンプレートを開き、所定の列にプライマー名とシーケンスを入力してください。
3. 登録したいデータをコピーし、下欄の領域に貼り付けてください。

プライマー名 (半角英数字30文字まで)

シーケンス (半角英字100文字まで)

C1-J-1718, GGA GGA TTT GGA AAT TGATTA GTT CC
C1-N-2329, ACT GTAAAT ATA TGA TGT GGT CA

プライマーの一括登録

戻る

図-7 プライマーの注文例

ープに番号をマジックなどで書き込む。そして、チューブをサーマルサイクラー用のベースに置く。サーマルサイクラーの電源を入れる。

(2) クラッシュアイスの中に AmpliTaq Gold® 360 Master Mix とプライマーを置き、解凍する。

(3) PCR を行う本数分の AmpliTaq Gold® 360 Master Mix、超純水およびプライマーを表-1 に合わせて 1.5 ml チューブに入れる。軽くボルテックスをしチビタンで回す。1 本分量を 0.2 ml のチューブに分注する。先に作成した PCR 用テンプレートを 1μl 0.2 ml のチューブに入れる。

(4) ふたをした 0.2 ml のチューブをサーマルサイクラーに置き、温度を設定する。例えば、前述した C1-J-1718 と C1-N-2329 のプライマーは図-8 のとおりになる。図-8 の四角で囲まれた温度はプライマーによって異なる。

(5) PCR が終わったら次は電気泳動である。

(6) なお、Taq (ここでは AmpliTaq Gold® 360 Master Mix) が異なれば分量なども変わる。Applied Biosystems 社の AmpliTaq Gold® PCR Master Mix や AmpliTaq Gold® Fast PCR Master Mix, UP を使うときは

表-1 PCR 用薬品の分量

サンプル数	1	2	4	8	12
AmpliTaq Gold 360 Master Mix	16.5	55.6	111.2	222.4	333.6
プライマー 1	1.3	2.6	5.2	10.4	15.6
プライマー 2	1.3	2.6	5.2	10.4	15.6
超純水	13.9	27.8	55.6	111.2	166.8



図-8 PCR の温度条件例
白い四角で囲んだところはプライマーによって温度が変わる。

分量や温度設定は同じである。



図-9 電気泳動で使う機器など

III 電気泳動 (図-9)

ゲルの作成

(1) アガロース HG0.5 g を 200 ml の三角フラスコへ入れる。そして、 $1 \times$ TAE Buffer をビーカーで 50 ml 計り三角フラスコへ入れる。

(2) 三角フラスコの口にラップをかけ電子レンジに置く。目で確認しながら沸騰「直前」までかける。電子レンジから取り出し完全に溶けるまで軽く振る（溶けたら透明になる）。

(3) ゲル用のプレートとコームを組み立てる。

(4) (2)を流し込みラップをかけ 15 分以上放置し固める。

泳動

(1) 発泡スチロールの入れ物にクラッシュアイスを入れる。クラッシュアイスの中に PCR 産物、サイズマ

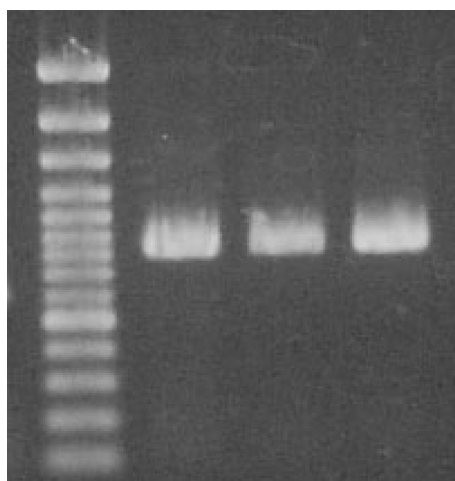


図-10 電気泳動結果

左からマーカー、キレックス法、PrepMan Ultra Reagent 法、アルカリ法。

ーカーおよびローディングダイを置き解凍する。

(2) $1 \times$ TAE Buffer で適当に満たされた電気泳動装置に固まったゲルを置く。

(3) フィルム状のもの（例えば TS フィルム）に、分注器（ピペットマンなど）で $0.7 \sim 8 \mu\text{l}$ ずつ色素を置く（サンプル分と同じ数）。

(4) サンプル $5 \mu\text{l}$ とローディングダイを分注器（ピペットマンなど）で混ぜる（うがいをさせるように）。

(5) $5 \mu\text{l}$ ずつ、マーカーとローディングダイ入りサンプルをゲルの穴に注入し、泳動を始める。

(6) ゲルの 3 分の 2 ぐらいまでマーカーがきたら止める。

バンドの確認

(1) エチジウムブロマイド（エチブロ）が入っている容器に泳動が終わったゲルを入れる。

(2) 20 分以上染色する（シェークしたほうがよい）。

(3) トランスイルミネータの上に少量の水をのせラップを敷く。

(4) 染色したゲルをトランスイルミネータにのせる。

(5) トランスイルミネータの電源を入れデジタルカメラなどで撮影する（図-10）。

おわりに

今回は DNA 抽出（PCR 用テンプレート）と PCR の実践を説明した。難しい理論を除くこと、特定の試薬や器具での実践紹介という形で進めた。これ以外の試薬や器具を使う方法はたくさんある。できるだけ、初心者

表-2 キレックス法と PCR 法での必要な物品リスト (2010 年 7 月時点)

品目	販売メーカー名	商品番号	価格
器械など			
サーマルサイクラー (Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー)	アプライドバイオシステムズ	2720	580,000
電気泳動・トランスイルミネータ (Mupid-Scope WD)	タカラバイオ	AD600	340,953
0.2 ml チューブ (MicroAmp Reaction Tube with Cap 1,000 本)	アプライドバイオシステムズ	N8010840	20,500
分注器 (ピペットマン P-10, P-20, P-100, P-200, P-1000 など)	ギルソン (エムエム機器)		各 32,000 ぐらい
分注器用チップ (DL10, D200, D1000 など)	ギルソン (エムエム機器)		
ミニ遠心機 (チビタン R)	アズワンカタログ	1-6891-01	40,000
試薬など			
キレックス (Chelex 100)	バイオ・ラッド	143-2832	26,000
preteinas K (20 mg/ml)	インビトロジェン	25530-049	23,800
プライマー	インビトロジェン		1,000
Taq (AmpliTaq Gold® 360 Master Mix 1 ml)	アプライドバイオシステムズ	4398876	6,000
アガロース HS	ワコー	312-01431	26,800
1 × TAE Buffer (10 × TAE Buffer (1 l) を 10 倍にうすめる)	インビトロジェン	15558-042	4,900
サイズマーカー (トラックイット 100 bp DNA ラダー)	インビトロジェン	10488-058	18,900
ローディングダイ (トラックイットシアン/オレンジバッファ)	インビトロジェン	10482-028	4,800
エチジウムブロマイド (Ethidium Bromide (10 mg/ml))	インビトロジェン	15585-011	6,000
その他 (どこかを探せばあるだろう物品)			
発泡スチロール			
プラスチック爪楊枝			
1.5 ml または 2 ml チューブ			
三角フラスコ 200 ml			
ビーカー 50 ml			
電子レンジ			
サランラップ			
フィルム (TS フィルムなど)			
クラッシュアイス			
-20℃低温器			
4℃定温器			
超純水			
染色用容器 (ステンレス深型バット+フタ 2 号ぐらい)			
洗浄瓶 (水入れ)			

方に迷いがなく実践できることを目的としたのでこのような形となった。キレックス法を利用した場合に必要な器具などとその価格を表-2 に書き出した。わかりにくいことがあればメール (miurak@affrc.go.jp) などをお送りくだされば幸いです。古い標本からの DNA 抽出について貴重なご意見をいただいた九州大学丸山宗利博士

に厚くお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) DAVIES, A. et al. (2009) : Appl. Entomol. Zool. 44 : 535 ~ 541.
- 2) SIMON, C. et al. (2006) : Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst. 37 : 545 ~ 579.