

マニラにおけるデング熱媒介蚊の遺伝子流動の評価を目的とした DNA 抽出及び PCR の最適化

愛媛大学大学院 学生会員 ○大岸航平 De La Salle University 非会員 Thaddeus Carvajal
愛媛大学大学院理工学研究科 正会員 渡辺幸三

1. はじめに

デング熱はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) などによって媒介されるウイルス感染症である。フィリピンの首都マニラは 45%以上のデング熱患者が発生している流行地域である。現在、効果的なワクチンが開発されていないため、蚊の発生源や飛翔経路を制御してデング熱の流行を効果的に抑制する必要がある。

一般に、生物の移動パターンや移入発生源は、地域集団間の遺伝的類似性に基づいて推測できる。このとき、DNA 塩基配列の変異を超高感度で検出できる一塩基多型 (SNP) を活用すると、隣接地域間などのわずかな遺伝的違いを評価できる可能性がある。

現在、我々の研究グループでは、マニラのネッタイシマカの集団遺伝構造とデングウイルス感染症を評価する研究プロジェクトを遂行している (図 1)。蚊の頭部と腹部は RT-PCR 分析によるデングウイルスの検出に使用する。そのため、足部と翅部からより高い濃度と純度の DNA を抽出する必要がある。本稿では、タンパク分解酵素や DNA 溶出 Buffer の量およびタンパク分解時間の最適化に関して報告する。また、ネッタイシマカの SNP 領域は 7 つ発見されている¹⁾。7 つの SNP 領域を一度で増幅できるマルチプレックス PCR を可能にする PCR アニーリング温度の検索結果についても併せて報告する。

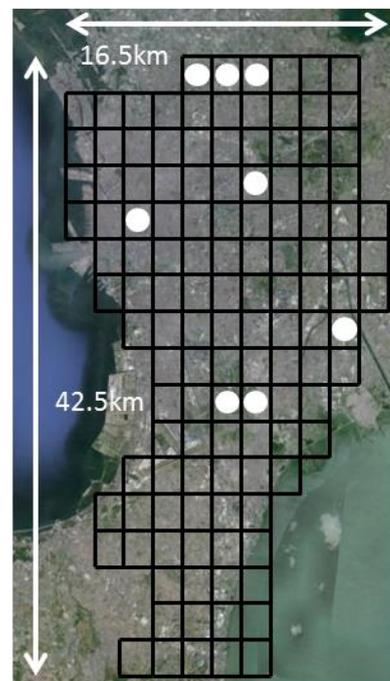


図 1. 分割したマニラ周辺とその周辺都市 (白丸は現在ネッタイシマカを採取した場所)

2. 方法

2-1 タンパク分解酵素の濃度と反応時間の最適化

DNA 抽出で使用するタンパク分解酵素の効果を最大化するため、攪拌ペッスルを使って蚊をすりつぶすか否かで DNA 濃度と不純度を比較した。不純度は、測定した純度の値から 1.80 を引いたものの絶対値と定義した。次にタンパク分解酵素である Proteinase K の濃度を全体の 10%、20%および 30%で比較した。さらにウォーターバスを用いたタンパク分解の反応時間を 3 時間と 24 時間で比較した。そして、DNA 抽出キット (QIAGEN) のカラムから DNA を溶出させるための Elution Buffer を 100 μ l, 200 μ l および 300 μ l で DNA 量を比較した。さらに上記の最適なプロトコルを検索した後、エタノール沈殿による DNA の濃度と純度を高める手法についても、その効果を検討した。



図 2. ネッタイシマカの足と翅 (左)
頭と腹 (右)

2-2 マルチプレックス PCR のアニーリング温度の最適化

試薬配合は TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いて、H₂O が 5.425 μ l, 10 \times Reaction Buffer が 1.5 μ l, MgCl₂ (25mM) が 0.75 μ l, dNTP (2.5mM) が 1.0 μ l, プライマー (50mM) が各 0.25 μ l, Taq Polymerase

が0.075 μ lおよび鋳型DNAが0.75 μ lの合計10.0 μ lとした。プライマーは7つのSNP領域(SNP1, SNP2, ..., SNP7)ごとに異なる配列を使用した。PCRのサイクル数は30で、アニーリング温度が38-63 $^{\circ}$ Cの範囲で、8段階の異なる条件で、それぞれ2個体ずつDNA増幅を行った。

マルチプレックスPCRでDNAが増幅したか確かめる手段としてアガロースゲル電気泳動を行った。1.2%のアガロースゲルを使用し、電気泳動装置で30分間電気泳動した。その後、ゲルドックでPCR産物が検出されるか確認した。PCR産物が検出される塩基長は、SNP1が350bp, SNP2が258bp, SNP3が203bp, SNP4が282bp, SNP5が239bp, SNP6が312bp, SNP7が593bpであった。

3. 結果および考察

3-1 タンパク分解酵素の濃度と反応時間の最適化

攪拌ペッスルを使用して蚊をすりつぶした方法とすりつぶさなかった方法、Proteinase Kの濃度およびタンパク分解の反応時間に変化を与えた方法には、DNA濃度と不純度に有意差は見られなかった(有意水準0.05)。しかし、Elution Bufferの量に変化を与えた方法では、300 μ lで溶出するとDNA量が多くなった。また、エタノール沈殿を行った場合にDNA濃度が高くなり、不純度が低くなった。したがって、DNA抽出の最適条件は、攪拌ペッスルで蚊をすりつぶさない、Proteinase Kの量は20 μ l、タンパク分解の反応時間は3時間、DNA溶出Bufferは300 μ l、エタノール沈殿を行うとなった。

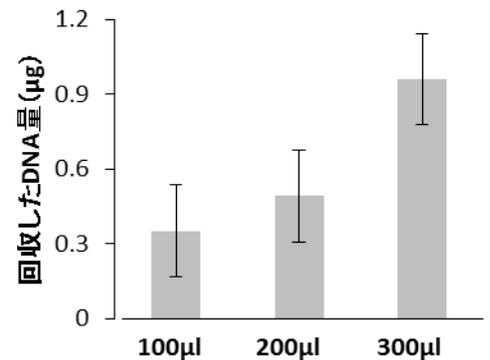


図3. DNA溶出Bufferで回収したDNA量の比較

3-2 アニーリング温度の最適化

SNP1は50.7-61.5 $^{\circ}$ C, SNP2は38.8-48.9 $^{\circ}$ C, SNP3は45.6-58.0 $^{\circ}$ C, SNP4は44.0-48.0 $^{\circ}$ C, SNP5は46.0-53.0 $^{\circ}$ C, SNP6は45.0-50.0 $^{\circ}$ C, SNP7は48.0-52.6 $^{\circ}$ CでPCR産物が検出された。したがって、SNP3とSNP5の46.0-53.0 $^{\circ}$ C, SNP3とSNP7の48.0-52.6 $^{\circ}$ CでマルチプレックスPCRができる可能性が高い。

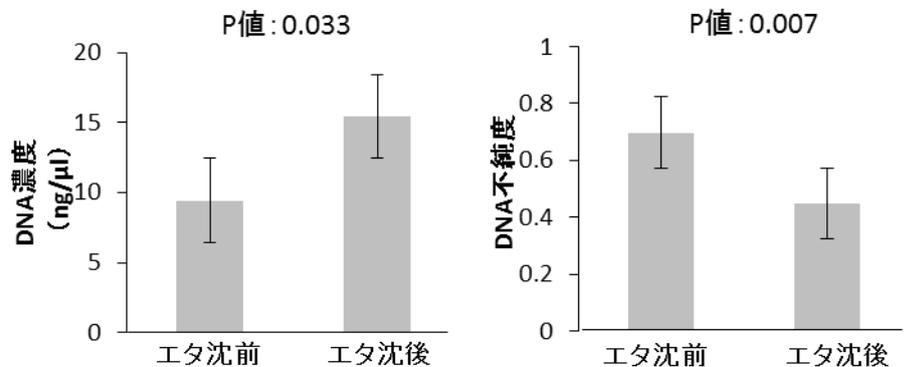


図4. エタノール沈殿で得られたDNA濃度および不純度

4. 終わりに

今後は得られた最適なDNA実験条件を使って、マニラとその周辺都市で採取されたネッタイシマカを解析し、移動パターンや移入発生源の強さを対立遺伝子頻度の類似性に基づいて評価する。

5. 参考文献

- 1) Massamba Sylla *et. al* (2009)PLoS Neglected Tropical Diseases e408

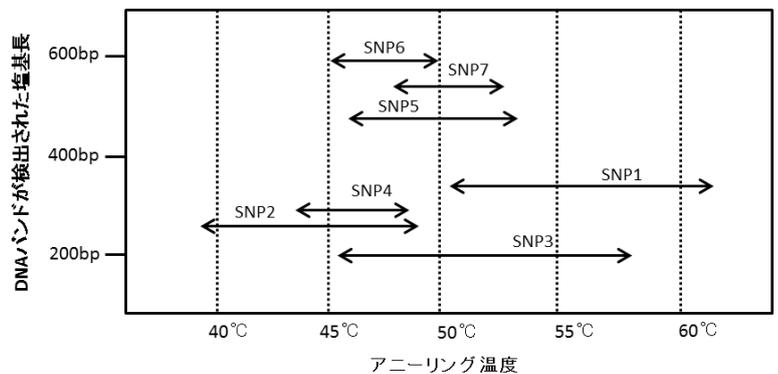


図5. 7つのSNP領域のPCRアニーリング温度の最適範囲