

[成果情報名]キレックス法による寄生蜂からの非破壊 DNA 抽出法

[要約] 寄生蜂個体をキレックス溶液中で 24 時間以上加温した後、短時間加熱することにより、塩基配列が解読可能な DNA を抽出できる。この処理による個体の触角、翅などの形態的な変化はほとんど認められず、DNA 抽出した個体をそのまま乾燥標本として保存できる。

[キーワード] 寄生蜂、キレックス法、DNA 抽出、非破壊、種同定

[担当] 西日本農業研究センター・生産環境研究領域・虫害管理グループ

[代表連絡先] 電話 084-923-4100

[分類] 研究成果情報

[背景・ねらい]

環境保全型農業の推進には、天敵寄生蜂による害虫防除技術の向上が重要な課題となる。天敵寄生蜂は種や系統によって性質が異なる。そのための確な同定を必要とする。しかし、微小な寄生蜂は形態による同定が難しい。現在 DNA バーコードプロジェクトでは解読した塩基配列を GenBank に登録し、簡便な同定を行うシステムを開発している。また、DNA を抽出した標本をそのまま保管すれば、誤同定が起こりにくい。しかし、標本を破壊しないで簡単に DNA を抽出する方法はほとんどない。そこで、寄生蜂を用いてキレックス法を利用した非破壊 DNA 抽出法を確立する。

[成果の内容・特徴]

1. 非破壊で DNA を抽出したい寄生蜂一匹をそのまま 5%の Chelex® 100 レジン（バイオラッド社 143-2832）20 μ l とプロテナーゼ K1. 4 μ l の混合溶液中に入れ、少なくとも 24 時間 56 $^{\circ}$ C に保った後に 99.9 $^{\circ}$ C で 3 分加熱して DNA を抽出する（図 1）。
2. DNA 抽出後の寄生蜂を取り出した後に、溶液をテンプレートとして PCR および塩基配列のダイレクトシーケンスを行うと、キレックス法では他の簡便な DNA 抽出法に比べ PCR バンドの検出率が高く、塩基配列も良好に解読できる（表 1）。
3. 取り出した寄生蜂は、DNA 抽出後でも触角、前翅、頭部および脚の同定に重要な形態もよく保存されており、サンプルの形態的な変化はほとんど観察されない（図 2、表 2）。

[成果の活用面・留意点]

1. 本方法は DNA バーコードによる簡易な種同定に有効であり、各種の小型昆虫に応用できる。
2. DNA 抽出後の昆虫サンプルは、乾燥標本にするためヘキサメチルジシラザン (HMDS) 処理が適切である。
3. DNA バーコードシステムについては、現在データ集積中であり、実用化には至っていない。
4. キレックスは粒子状でありため水に沈殿するので個別のチューブに分注する際にはよく攪拌する。また、ピペットのチップによってはキレックス粒子が分注できないこともあるので注意する。

[具体的データ]

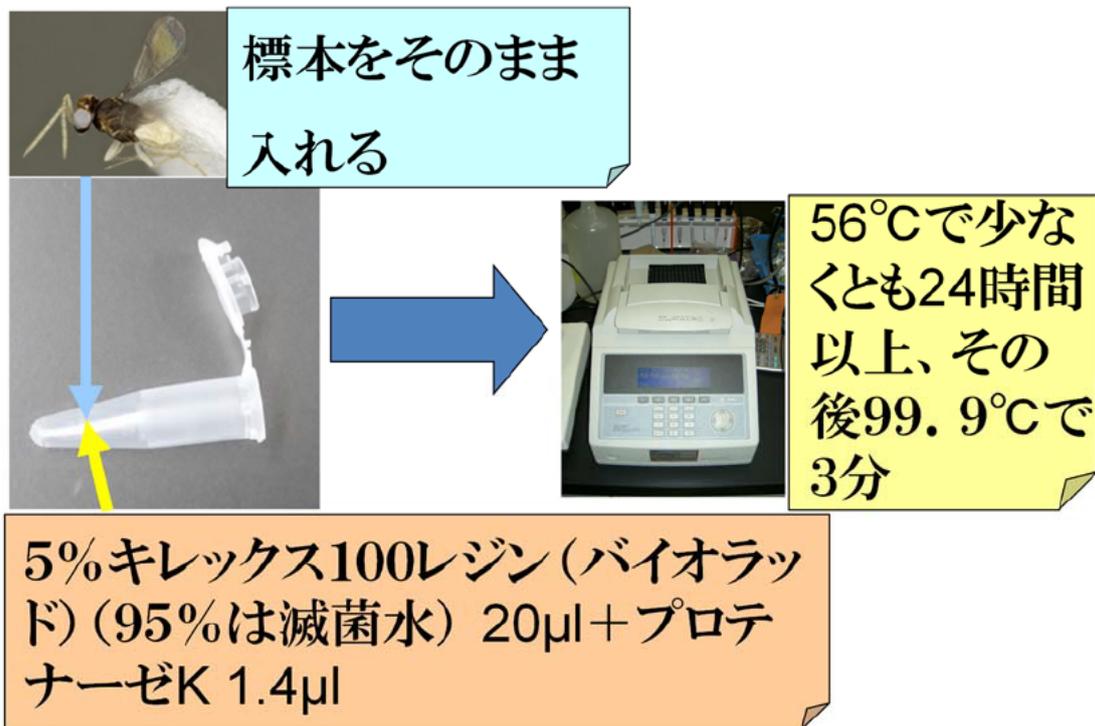


図1 キレックス法による寄生蜂からの非破壊 DNA 抽出

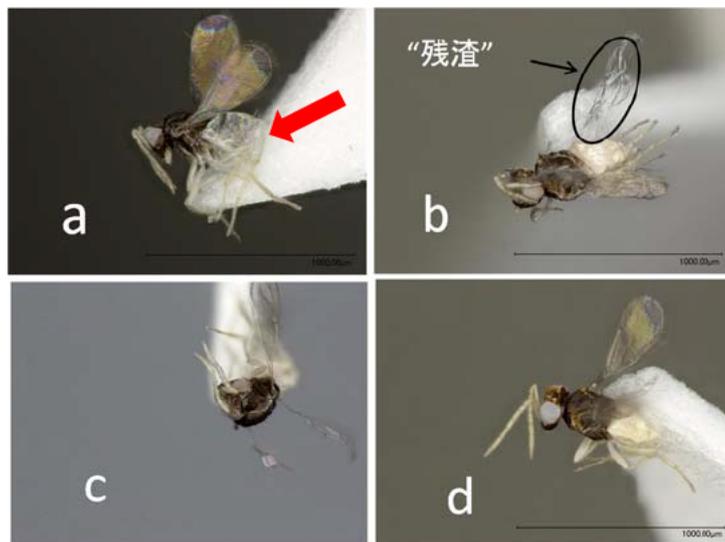


図2 3通りのDNA抽出法によるオンシツツヤコバチの形態変化。
(a)キレックス法(腹部が透明化; 赤の矢印), (b)PrepMan® Ultra Reagent
(残渣; 標本以外の物質が付着, 触角と前翅の形態が変化), (c)DNeasy®
Blood and Tissue Kit および (d)対照 (HMDS 使用のみ)。

表1 簡便な3つの方法による非破壊DNA抽出の比較

DNA抽出法	n	PCRのバンド 検出率(%)	塩基配列解読	
			0(不可)	1(可)
キレックス法	12	100 a*	1	
PrepMan® Ultra Reagent	12	25 b	0	
DNeasy® Blood and Tissue Kit	12	66.7 ab	1	

*同一列の異なった文字は有意な差がある ($p < 0.05$, Fisherの正確確率検定後、Tukeyの多重比較法)

表2 3つのDNA抽出法による寄生蜂の形態評価**

方法	触角	頭部	前翅	腹部	脚
キレックス法	0.72 a*	0.73 a	0.76 a	0.00 a	1.00 a
PrepMan® Ultra Reagent	0.39 c	0.92 ab	0.53 b	1.00 b	1.00 a
DNeasy® Blood and Tissue Kit	0.44 c	0.54 ab	0.97 a	1.00 b	1.00 a
対照区**	1.00 b	0.96 b	0.97 a	1.00 b	1.00 a

*同一列の異なる文字は有意な差を示す ($p < 0.05$, ANOVA後、Tukeyの多重比較法)

**触角・前翅 (悪い=0、中間から悪い=1、中間=2、良い=3)

頭部 (悪い=0、中間=1、良い=2)、腹部・脚 (悪い=0、良い=1)

形態評価=($\sum i \times n_i$)/(最大形態評価値 $\times N$)、Nは全調査個体数、

n_i はそれぞれのランクでの標本数、iはカテゴリへ判定された標本数

(三浦一芸)

[その他]

予算区分：交付金、競争的資金 (科研費)

研究期間：2015～2017年度

研究担当者：三浦一芸、世古智一、安部順一郎、前藤薫 (神戸大)

発表論文等：Miura K. et al. (2017) Appl. Entomol. Zool. 52(2):349-352