

遺伝子型別によるマダニ種同定方法

調査報告書記載の文献 (Takano A., *et al.*, 2014.) を参考とし、以下の手順で検体からの DNA 抽出および増幅を行った。

DNA 抽出

使用キット : DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

使用機器 : ヒートブロック (AS ONE : HOT DRY BATH, HDB-2N)

遠心分離機 (eppendorf : Centrifuge 5415 R)

ボルテックスミキサー (IKA : VORTEX Genius 3)

○DNA 抽出

1. Buffer ATL 180 μ L にマダニ検体を入れ、ペッセルを用いて破碎する。
2. Proteinase K 20 μ L を添加し、Vortex 後 56°C で一晩インキュベートする。
3. Vortex 後、Buffer AL 200 μ L を添加し、再度 Vortex し、70°C で 10 分インキュベートする。
4. 99.5% エタノールを 200 μ L 添加し、Vortex する。
5. Filter cup に 4 のサンプルを入れる。
6. 室温、8,000 $\times$ g で 1 分間遠心操作。
7. 濾液を捨て、Filter cup を新しいチューブに移し、Buffer AW1 を 500 μ L 加え、室温、8,000 $\times$ g で 1 分間遠心。
8. 濾液を捨て、Filter cup を新しいチューブに移し、Buffer AW2 を 500 μ L 加え、室温、15,000 $\times$ g で 3 分間遠心。
9. 濾液を捨て、Filter cup を新しいチューブ 1.5ml に移し換え、室温 15,000 $\times$ g で 1 分間遠心し、エタノールを完全に除去する。
10. Filter cup を新しいチューブに移し、Buffer AE を 100 μ L 加える。
11. 70°C、10 分間インキュベート後、室温 15,000 $\times$ g で 1 分間遠心。抽出完了。

マダニ *mt-rrs* 配列の検出

使用試薬 : DNA 増幅酵素 (TOYOBO : KOD plus Neo)

電気泳動用アガロースゲル (日本ジエネティクス : FastGene NE-AG01 Agarose)

電気泳動用蛍光色素 (日本ジエネティクス : Midori Green Direct)

電気泳動用 DNA マーカー (日本ジエネティクス : FastGene 100bp DNA Ladder)

使用機器 : PCR 装置 (Thermo Scientific : PIKO REAL96)

電気泳動装置 (ADVANCE : Mupid-exU)

イルミネーター (日本ジエネティクス : Fas-Digi Blue/Green LED イルミネーター)

プライマー： Forward； mt-rrs1 5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3'
Reverse； mt-rrs2 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGTA-3'

○PCR

以下の組成および条件で PCR（DNA 増幅）を行う。

反応組成

試薬		濃度	量(μl)	
KOD plus Neo buffer	※1	10×	2.0	
dNTPs	※1	2mM	2.0	
MgSO ₄	※1	25mM	1.6	
Forward Primer		10μM	2.0	
Reverse Primer		10μM	2.0	
抽出したマダニDNA		—	1.0	
精製水			9.0	
KOD plus Neo	※1	1U/μl	0.4	※1：KOD plus Neo に付属
反応液合計			20.0	

PCR 条件

94℃	10sec	} ×30cycle
94℃	10sec	
55℃	30sec	
72℃	30sec	

○電気泳動（DNA 増幅確認）、精製

1%アガロースゲル、蛍光色素、DNA ラダーマーカースを使用し、100V、30 分間で増幅した DNA を電気泳動し、確認。450～500bp のバンドが見られたサンプルを以下のキットを使用し、生成する。

精製キット：QIAamp DNA Mini Kit、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen）

○シーケンシング（配列決定）

精製した DNA について、ユーロフィンジェノミクス(株)へ外注し、DNA 配列を決定した。シーケンシングには Forward Primer mt-rrs1 を用いた。

系統解析

参考文献の著者が提供しているマダニのレファレンス配列とシーケンシングで得られた検体の DNA 配列を比較、種同定を行う。

使用ソフト：MEGA-X (<http://www.megasoftware.net/>)

レファレンス配列：以下リンクからダウンロード（山口大学）

<http://www.vet.yamaguchi-u.ac.jp/doc/140116.txt>

上記ソフトを用いて、近接接合法により分子系統樹を作成。併せて **Bootstrap** 値も計算し、検体の種同定を行う。ソフトを用いた詳細な解析方法は、上記の高野愛准教授（山口大学）の **HP** リンクを参照とする。

以上