

室内塵埃中のダニ類・真菌類ゲノムDNA抽出法の比較検討

青木 俊介*, 加瀬谷泰介*

Methods of Genomic DNA Extraction of Mites and Fungi in House Dust

Shunsuke Aoki* and Taisuke Kasetani*

Allergenic mites and fungi were focused on as an index of biological contaminants and examined method of their genomic DNA extraction from house dust sample and PCR amplification with specific primer for each other. Genomic DNA was extracted by QuickGene® method from collected dust sample (fine dust fraction of 250 µm or less) from a paper bag of a vacuum cleaner. However, the brown material thought to be humus in genomic DNA solution inhibited PCR amplification. The humus influence were reduced by diluting the genomic DNA solution (10~100 times), or by using soil DNA extraction kit "ISOIL", or by "SoilMaster™". Then, ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the mites and fungi could be amplified.

Key words : mites, fungi, house dust, genomic DNA, PCR, humus, QuickGene®, ISOIL, SoilMaster™, ITS.

環境中の生物的汚染状況を把握するために、細菌や真菌、衛生害虫などの生息数を測定し、評価することが頻繁に行われている。器物や建築物内装表面の拭き取り、自然落下菌やエアサンプリングなどで回収した細菌および真菌試料は、培養した後、さらに単離し、拡大培養による生理的特徴や専門家による顕微鏡観察などによって同定する。しかしながら、前培養に時間と煩雑な操作と技術が必要で、顕微鏡観察や評価には専門知識が必要であることから、このような検査には多くの時間と費用がかかってしまう。細菌用には、簡易検出キットやATP（アデノシン三リン酸）を用いた迅速検出キット¹⁾などが提案されているが、真菌ではほとんどない。また、従来法では同定が困難な場合があることも事実である。

そこで、近年、対象となる生物種から抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCR増幅反応を行い、得られた増幅産物の塩基配列を解析して種を同定する手法や、対象の生物種を判別するために適切に構築されたプローブを搭載したDNAマイクロアレイを用いて種を同定する手法^{2, 3)}が開発されている。いずれの手法でも、PCR増幅は必須であるが、環境中から採取された試料にはPCRを阻害する物質が含まれていることが知られている。そこで、本報では、環境中の生物的汚染の原因生物としてダニと真菌に焦点をあて、実環境から採取された試料を用いてゲノムDNA抽出法およびPCR増幅について検討した。

実験方法

1. 材料および試験装置

1-1 掃除機塵埃

鉄筋コンクリート3階建ての集合住宅の1室（3LDKに大人2名、子供2名が居住）で使われていた電気掃除機から紙パックを回収し、試料とした。

1-2 ダニ標品3種

継代飼育し、エタノール浸漬標本（それぞれ約1,000匹）とした下記3種のダニを標品として用いた。コナダニ亜目（Astigmata）チリダニ科（Pyroglyphidae）のコナヒョウヒダニ（*Dermatophagoides farinae*）、ヤケヒョウヒダニ（*Dermatophagoides pteronyssinus*）、同亜目コナダニ科（Acaridae）のケナガコナダニ（*Tyrophagus putrescentiae*）である。本標品は大阪製薬株式会社（<http://www.osaka-seiyaku.co.jp/>、〒577-0066 大阪府東大阪市高井田本通3-2-4）より分譲を受けた。

1-3 自動核酸抽出装置QuickGene

富士写真フイルム㈱の「自動核酸抽出装置QuickGene-810」とその専用キット「組織抽出用DT-S」を用いた。

1-4 土壌DNA抽出キット

掃除機塵埃には砂と思われる微小な物質が含まれていること、および懸濁液が褐色になることから、試料中には屋外から持ち込まれた土壌成分が含まれると推測した。一般に、土壌成分（フミン酸など）はPCR増幅反応を阻害することが知られているため⁴⁾、これの除去が期待できる土壌微生物DNA抽出キットを使用した。「ISOIL」（㈱ニッポンジーン316-06211）、「SoilMaster™ DNA Extraction

*：東洋食品研究所 食品資源研究室

Kit] (EPICENTRE® Biotechnologies SM02050) の2種である。抽出のプロトコルは界面活性剤含有溶液中で加温するもので、QuickGene法 (SDS) と本質的には変わらないが、粗抽出液中に含まれる腐植酸、フミン酸などの有機性PCR阻害物質を精製除去するための試薬が含まれる。前者のキットにはDNAのみを沈殿回収する試薬が含まれる。後者にはゲルろ過法を原理としてPCR阻害物質を遠心除去するための「Inhibitor Removal Resin」という白い微粒子状の樹脂及びフィルタ付き小型遠沈管であるスピнкаラム (Spin Columns) を付属しており、DNA粗抽出液を充填後、遠心器での短時間遠心で除去が可能となる。

1-5 PCR試薬

PCR増幅には、酵素、緩衝液、ヌクレオチド一式を含む TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (タカラバイオ㈱ RR006A) を用いた。

1-6 PCRプライマー

文献より⁵⁾、ダニ類のPCR増幅にはAcari-ITS1; CAA-GGT-TTC-CGT-AGG-TGA-AC及びAcari-ITS2; GCT-TGA-TCT-GAG-GTC-GAを用いた。

真菌類のPCR増幅にはITS1-F; CTT-GGT-CAT-TTA-GAG-GAA-GTA-A及びFO514; TAT-GCT-TAA-GTT-CAG-CGG-GTA-GTC-Cを用いた。

2. 実験方法

2-1 ゲノムDNA抽出

2-1-1 試料回収

電気掃除機の紙パックを開封し、大きなごみを取り除き、ボルテックスミキサ (大洋科学工業, S-50) で振動を与えながら多段階の標準篩で分画した。最下段は孔径250 µm篩とし、それを通り抜けた微細画分を実 (未知) 試料とした (以後、塵埃試料と略す)。この試料は実体顕微鏡で観察し、チリダニ類と見られるダニが生息していることを確認し、また滅菌水に一部を投入して室温に静置し、また懸濁液をPDA平板培地に接種、培養して複数の真菌 (糸状菌・酵母) が含まれることを確認した。

2-1-2 抽出前処理 (添加回収試験)

この塵埃試料にはチリダニ類と見られるダニが生息していることは確認できたが、必ずしもPCRで増幅できる3種 (コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、ケナガコナダニ) とは限らない。そこで塵埃試料0.2 gに対して、予め分取してエタノール除去処置をしたコナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、ケナガコナダニ標品50匹をそれぞれ添加した試料を調製した。加えて、無添加の塵埃試料と標品各50匹も秤量し用いた。前処理として、φ1.5 mmガラスビーズ2個と共にミニビードピータ (BioSpec Products 3110BX) を用いて4,800往復/分・30秒の条件で凍結破碎を行った後、2-1-3に示すQuickGene法でゲノムDNAを抽出精製した。

2-1-3 QuickGene法

本手法の概要を次に示す。抽出前処理を施した試料に、キット付属の試料溶解液であるMDT (界面活性剤SDS)

180 µl, EDT (蛋白質分解酵素Protease K) 20 µlを添加し、途中で攪拌しつつ55℃・1時間保持した後、遠心分離で上清を回収する。次いで、LDT180 µl, エタノール240 µlを添加、短時間高速攪拌 (ボルテックス) 15秒、内壁に付着した反応液を短時間遠心回転で容器底部に回収 (スピンドウン) して、ライセート (溶解液) を完成する。引き続き、QuickGene-810のDNA TISSUEモードで専用のカラムを用いて自動精製し、最終的に200 µl (変更可能) の精製ゲノムDNA溶液を得る。

ただし、塵埃試料中の繊維類が水分を吸収してしまうので、通常の5倍量の試薬を用い、2回に分けて濾過精製した。

2-1-4 土壌DNA抽出キットの単独使用およびQuickGene法との併用

市販の土壌DNA抽出キット「ISOIL」 (㈱ニッポンジーン316-06211), 「SoilMaster™ DNA Extraction Kit」 (EPICENTRE® Biotechnologies SM02050) を用い、高純度抽出を試みた。

「ISOIL」については、ダニ標品を添加しない塵埃試料を0.5 g, 0.2 g, 0.05 g, 0.01 g各々を試料に用いて付属のプロトコルに従いゲノムDNAの抽出、精製を行った。

「SoilMaster™ DNA Extraction Kit」については、塵埃試料0.1 g及び0.05 g (各2試料) を用いて付属のプロトコルに従いゲノムDNAを精製、抽出を行った。

これとは別に、予め超純水で洗浄した塵埃試料 (0.05, 0.02, 0.01 g dry), 70%エタノールと超純水で洗浄した塵埃試料 (0.05 g dry) をそれぞれQuickGene法で抽出、精製して得たゲノムDNA溶液に対し、「SoilMaster」付属のスピнкаラム (Inhibitor Removal Resin充填済み) を用いて残存するPCR阻害物質を除去を試みた。

2-2 PCR処方と条件

各種試料から抽出したゲノムDNA溶液を鋳型 (Template) として、反応液組成 (Table 1) 及び条件 (Table 2) で増幅した。

Table 1 Formula of PCR reaction mixture

10× PCR buffer	2.0 µl
2.5 mM dNTP mixture	2.0 µl
Fw primer (Acari-ITS1 or ITS1-F, 10 pmol)	0.5 µl
Rv primer (Acari-ITS2 or FO514, 10 pmol)	0.5 µl
Taq Polymerase	0.1 µl
Template DNA (10ng/µl)	1.0 µl
H ₂ O	13.9 µl

Table 2 PCR thermal cycling protocol

35 cycles	{	94 °C	5 min
		94 °C	30 sec
		50 °C	30 sec
		50 °C	30 sec
		72 °C	60 sec
		4 °C	

加算して含まれる計算となる。この過程では、溶液が塵埃由来の何らかの成分で褐色に着色するのが観察された (Fig. 1)。この着色は、QuickGeneで精製した後も僅かに残り、標品のように無色透明にはならなかった。

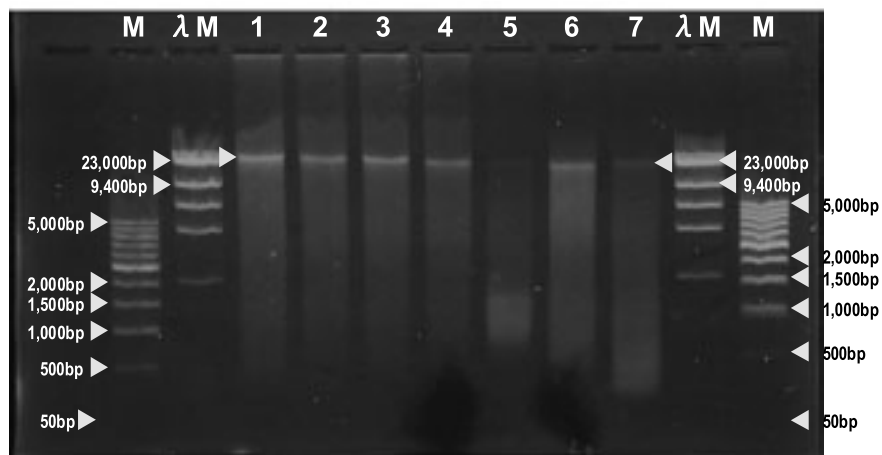
抽出したゲノムDNAをアガロース電気泳動に供したところ、ダニ添加塵埃及び無添加の掃除機塵埃のいずれからでも、約23 kbpの位置に明瞭なバンドが得られ、ゲノムDNAの抽出に成功したと考えられた (Fig. 2)。

**Fig. 1** Stained DNA solution

結果と考察

1. ゲノムDNA抽出 (QuickGene法)

通常の5倍量約1,000 µlの試薬を用い、遠心回収で上清400 µlを分取し、濾過精製を経て、最終的に200 µlのゲノムDNA抽出液を得た。全体から40%の上清を回収していることから、添加した標品の約20匹分が、塵埃試料分に



1 ~ 3: Fine house dust fraction added fifty individuals of

1: *D. pteronyssinus*

2: *T. putrescentiae*

3: *D. farinae*

4: Fine house dust fraction only

5 ~ 7: Fifty individuals of each mite specimen

5: *D. pteronyssinus*

6: *T. putrescentiae*

7: *D. farinae*

Electrophoresis: 1.0 % w/v agarose gel, 100 V - 30 min.

LANE 2 & 12: OneSTEP Ladder 500

LANE 3 & 11: λ *Hind*III

50 bp: Loading Dye

The amount of DNA loaded in each lane (1-7) was 480 ng.

Fig. 2 Total DNA extracted from fine house dust samples

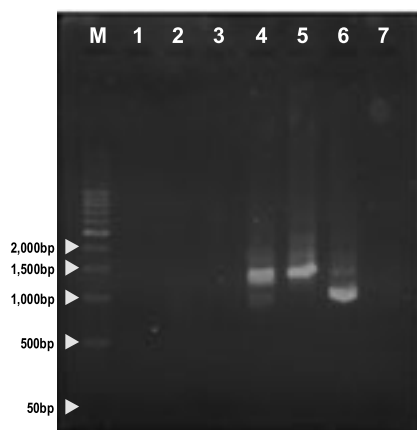
2. PCR増幅

QuickGene法で得られたゲノムDNAを鋳型とし、PCR増幅を行った (Fig. 3)。結果、対照の標品ではPCR産物の形成が確認できるが、ダニ標品の添加、無添加に関わらず塵埃試料区ではPCR産物は確認できなかった。

文献¹⁾などによると、土壌中に含まれる植物遺体等が分解を受けて変化した腐植質がPCR増幅を強く阻害することが知られている。塵埃中に植物と見られる断片が観察されること、腐植質の一種である腐植酸やフルボ酸の水溶液は褐色を呈するが、塵埃試料のゲノムDNA溶液も同様に褐色に着色していることから、土壌由来の腐植質が混入していることが推定された。

この問題を解決するために、鋳型となるゲノムDNA溶液を希釈して阻害物質の影響を低減させる、別途何らかの方法で精製して阻害物質を除去する (土壌DNA抽出キット、後述)、という二つの方法を試みた。

ゲノムDNA溶液を希釈した結果、阻害物質の影響が低減し、Fig. 4, 5に示すようにPCR産物が確認された。原液から100倍まで希釈してPCR増幅をした結果の一覧をTable 3に示す。標品 (ケナガコナダニ) 以外の塵埃試料を含む実験区では、PCR産物が得られた場合は、ほとんどで複数本のバンドが観察された。これは対象となるダニ3種のPCR産物の鎖長が異なるためと考えられる。ヒョウヒダニ2種はほとんど変わらないが、ケナガコナダニはそれよりも鎖長がやや大きいため、2本のバンドとなって現れるものと考えられる。3本のバンドが現れることについては、アガロースゲルの状態によって分解能が高く、わずかの鎖長の違いでヒョウヒダニ2種のバンドが分離する可能性と、目的とする3種以外の近縁なダニ種のゲノムDNAを同時に増幅している可能性が考えられる。



1 ~ 3: Fine house dust fraction added fifty individuals of

1. *D. pteronyssinus*

2: *T. putrescentiae*

3: *D. farinae*

4 ~ 6: Fifty individuals of each mite specimen

4. *D. pteronyssinus*

5: *T. putrescentiae*

6: *D. farinae*

7: Fine house dust fraction only

Electrophoresis: 1.0 % w/v agarose gel, 100 V - 30 min.

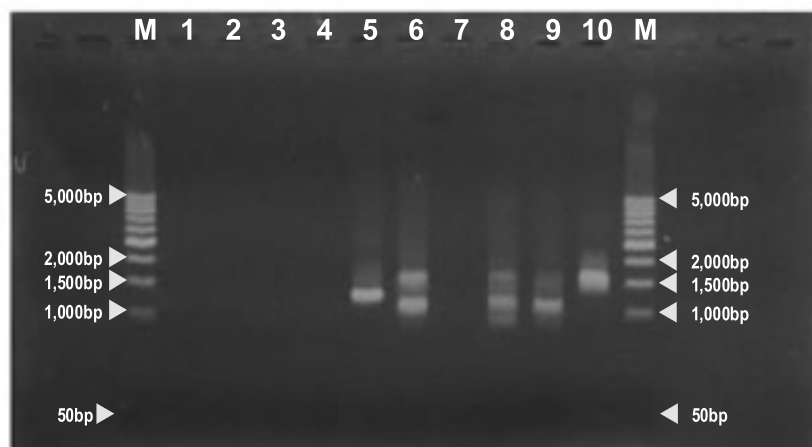
LANE 1: OneSTEP Ladder 500

50 bp: Loading Dye

The amount loaded in each lane (1-7)

was 2 µl.

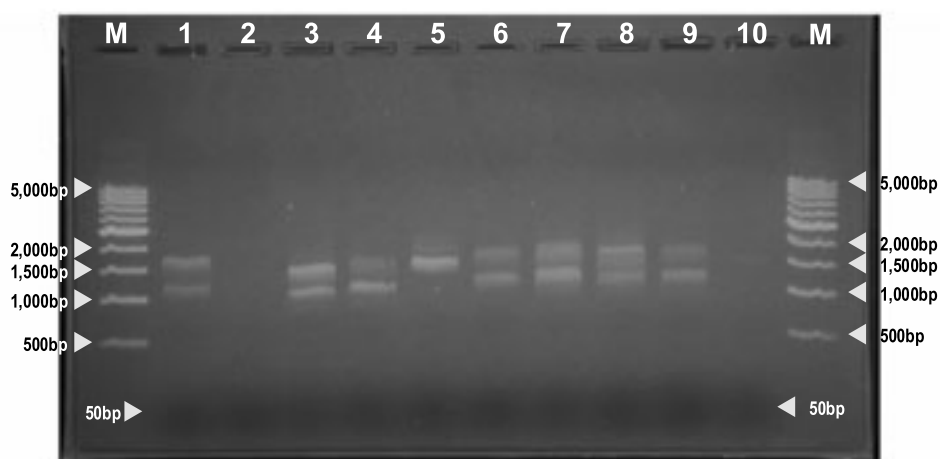
Fig. 3 PCR performed using mite specific primers on DNA from fine house dust



- 1 ~ 3: Fine house dust fraction added fifty individuals of
1. *D. pteronyssinus*
 - 2: *T. putrescentiae*
 - 3: *D. farinae*
- 4: Fine house dust fraction only
- 5: Fifty individuals of *T. putrescentiae*
- 6-10: Same sample of 1-5 with DNA template diluted eighty times each other.

Electrophoresis: 1.0 % w / v agarose gel,
100 V - 30 min.
LANE 1 & 12: OneSTEP Ladder 500
50 bp: Loading Dye
The amount loaded in each lane (1-7) was 2 µl.

Fig. 4 PCR performed using mite specific primers on DNA from fine house dust



- 1 ~ 3: Fine house dust fraction added fifty individuals of
1. *D. pteronyssinus*
 2. *T. putrescentiae*
 - 3: *D. farinae*
- 4: Fine house dust fraction only
- 5: Fifty mites of *T. putrescentiae*
- The templates above were diluted sixty times.
- 6-10: Same sample of 1-5 with DNA template diluted eighty times each other.

Electrophoresis: 1.0 % w / v agarose gel,
100 V - 30 min.
LANE 1 & 12: OneSTEP Ladder 500
50 bp: Loading Dye
The amount loaded in each lane (1-10) was 2 µl.
LANE 1 & 12: OneSTEP Ladder 500

Fig. 5 PCR performed using mite specific primers on DNA from fine house dust

Table 3 Reduction of PCR inhibition by diluting the genomic DNA solution (1 ~ 100 times)

Dilution ratio	Fine dust fraction of 250 µm or less (0.2 g)			Mites not added (dust only)	Fifty mites of <i>T. putrescentiae</i>
	<i>Dermatophagoides farinae</i>	<i>D. pteronyssinus</i>	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>		
Not diluted	×	×	×	×	◎
5 fold	○ ₂	×	○ ₃	○ ₃	◎
10 fold	○ ₂	○	○ ₂	○ ₂	◎
20 fold#1	○ ₂	○ ₂	×	○ ₂	◎
20 fold#2	×	◎	○ ₃	×	◎
40 fold	○ ₂	×	○ ₃	○ ₃	◎
60 fold	○ ₂	×	○ ₂	○ ₂	◎
80 fold	○ ₂	○ ₂	○ ₂	○ ₂	○
100 fold	○ ₂	○ ₃	○ ₃	○	○

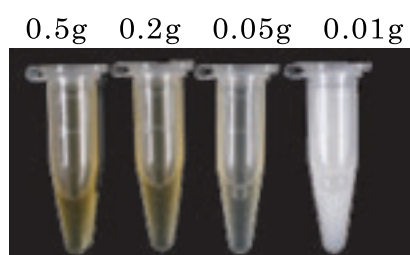
Band's shape ◎ : narrow single band, ○ : broad single band, ○_n : broad multiple bands (n),
 × : not detected

3. PCR増幅の改善：土壌DNA抽出キットの利用

塵埃試料からのゲノムDNA溶液が着色し、PCRが阻害されるのを防止するために希釈法を試み、一定の成果を得たが、腐植質を多量に含む土壌試料からゲノムDNAを抽出するための試薬キットが複数存在しており、その利用を検討した。

3-1-1 土壌DNA抽出キット「ISOIL」

2-1-4に示した方法でゲノムDNA抽出、精製を行い、ダニ用・真菌用のプライマーを用いたPCR増幅を試みた。その結果、抽出液の着色は試料量に比例して濃くなったが (Fig. 6)、最終的に精製が終了した時点では、特に懸濁や着色は見られなくなった。

**Fig. 6** Stained DNA solution in process of using ISOIL.

アガロースゲル電気泳動で確認したところ、0.01 g区ではバンドが見られなかったが、ほかの実験区は約23 kpbのゲノムDNAと推定されるバンドを確認できた (Fig. 7)。

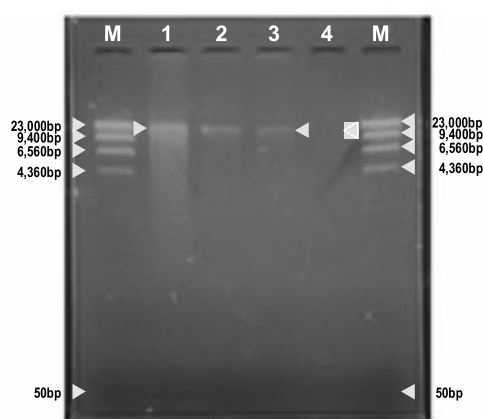
さらに、PCR増幅を試みたところ、いずれも成功して産物を確認できた (Fig. 8)。結果としてはPCR産物を増幅できたが、完全手作業のプロトコルであるため、検査法として常用するには作業効率の面で改善の余地があると思われる。

3-1-2 土壌微生物DNA抽出キット「SoilMaster™」

2-1-4に示した方法でゲノムDNAを抽出、精製した。真菌プライマーでPCR増幅を試みた結果、SoilMaster法はISOIL法と同じく抽出原液でPCR増幅ができ、阻害物質の影響が極めて小さい泳動パターンが得られた (Fig. 9, レーン1~4)。

また、QuickGene法で得たゲノムDNA溶液を「SoilMaster」付属のスピンカラムで遠心濾過精製して鋳型に用いたところ、PCR産物が得られた (Fig. 9, レーン5~7)。

このことから、QuickGene法でも抽出自体はできているが専用のDNA吸着メンブレンカートリッジを用いる過程では阻害物質が除去しきれていないこと、および「SoilMaster」のスピンカラム精製は阻害物質の吸着除去に有効であることが示唆された。



Extracted from

- 1: 0.5 g of fine house dust
- 2: 0.2 g of fine house dust
- 3: 0.05 g of fine house dust
- 4: 0.01 g of fine house dust

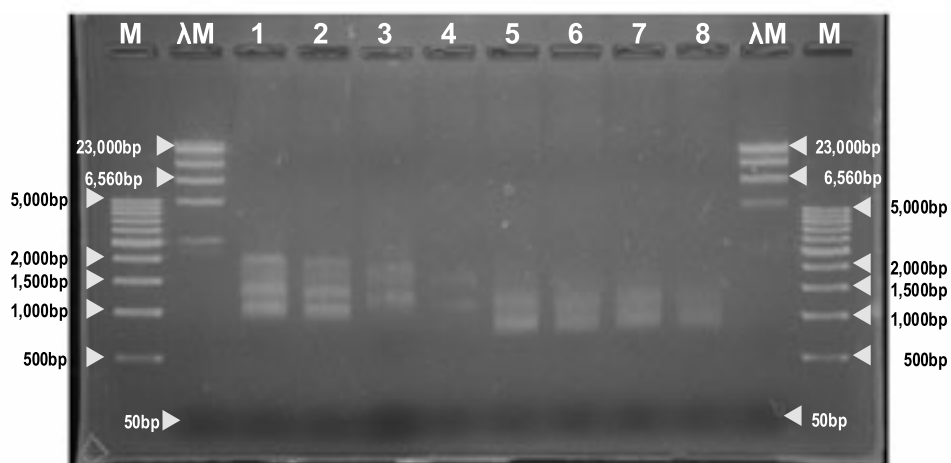
Electrophoresis: 1.0 % w / v agarose gel,
100 V - 30 min.

LANE 1 & 6: λ HindIII

50 bp: Loading Dye

The amount loaded in each lane was 2 μ l
(1-2) and 7 μ l (3-4).

Fig. 7 Total DNA extracted from fine house dust samples by ISOIL



PCR performed using templates as follows:

- 1, 5: Ten times diluted template from 0.5 g of fine house dust
- 2, 6: Ten times diluted template from 0.2 g of fine house dust
- 3, 7: Ten times diluted template from 0.05 g of fine house dust
- 4, 8: Ten times diluted template from 0.01 g of fine house dust
- 1-4: Amplified with mite specific primer
- 5-8: with fungus specific primer

Electrophoresis: 1.0 % w / v agarose
gel, 100 V - 30 min.

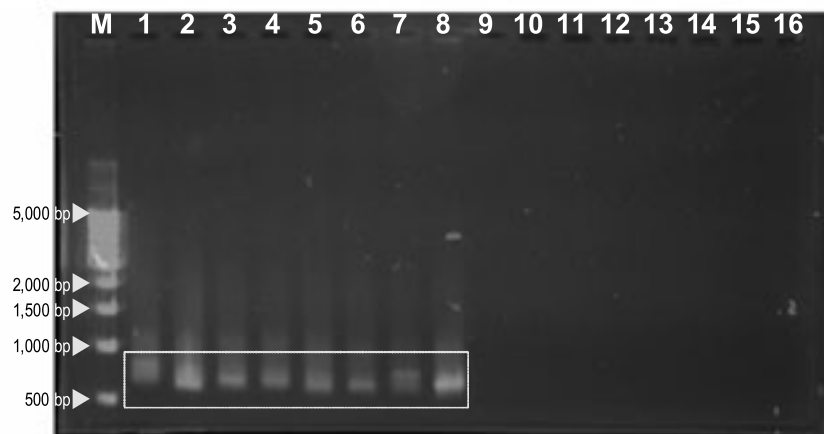
LANE 1 & 12: OneSTEP Ladder 500

LANE 2 & 12: λ HindIII

50 bp: Loading Dye

The amount loaded in each lane (1-8)
was 1 μ l.

Fig. 8 PCR performed using mite or fungus specific primers on DNA extracted from fine house dust by ISOIL



PCR performed using fungi templates as follows ;

- 1, 2: Template from 0.1 g of fine house dust (SoilMaster)
- 3, 4: Template from 0.05 g of fine house dust (SoilMaster)
- 5-7: Template from 0.05 g; 0.02 g; 0.01 g of fine house dust (pre-washed with sterilized water) purified by spin column of SoilMaster after extracting by QuickGene method
- 8: Template from 0.05 g of fine house dust (pre-washed with 70 % w / v ethanol) purified by spin column of SoilMaster after extracting by QuickGene method
- 9-12: Same sample of 1-4 and diluted fifty times
- 13-15: Same sample of 5-7 and diluted fifty times
- 16: Same sample of 8 and diluted fifty times
- 1-16: Amplified with fungus specific primer

Electrophoresis: 1.0 % w / v agarose gel, 100 V - 30 min.

LANE 1: OneSTEP Ladder 500

50 bp: Loading Dye

The amount loaded in each lane (1-16) was 8.1 µl.

Fig. 9 PCR performed using fungus specific primers on DNA extracted from fine house dust with a combination of SoilMaster and QuickGene or SoilMaster singly

まとめ

一般家庭（鉄筋コンクリート建築，集合住宅）の掃除機の紙パックから回収した塵埃中の250 µm以下の微細画分試料から，自動核酸抽出装置QuickGeneを用いてゲノムDNAを抽出できた．しかしながら，得られたゲノムDNA抽出液には，腐植質と見られる褐色物質が混入しており，そのままではPCR増幅反応が阻害された．そこで，ゲノムDNA抽出液の希釈（10～100倍），市販の土壌DNA抽出キット「ISOIL」，「SoilMaster」の使用もしくは部分的併用などの精製方法を適用することで，PCR阻害物質の影響が低減できた．検査法として常用するには，実験者の手技の影響を受けにくいことが重要であるため，スピнкаラムを用いてPCR阻害物質を簡便に除去できる「SoilMaster」の使用が望ましいと思われる．塵埃試料からダニおよび真菌のいずれでもPCR増幅産物が得られ，標品で確認したプライマーの機能を実試料でも確認できた．

文 献

- 1) Bautista, D. A., Vaillancourt, J. P., Clarke, R. A., Renwick, S. and Griffiths, M. W. : *Poult. Sci.*, **73**, 1673-1678 (1994).
- 2) 加瀬谷 泰介, 青木 俊介, 平山 幸一, 近藤 隆一郎, 堤 祐司, 須原 弘登: 日本ペストロジー学会誌, **23** (1), 27-30, (2008).
- 3) 青山 冬樹: 日本清涼飲料研究会 第18回研究発表会講演要旨集, **16**, (2008).
- 4) Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., Altavilla, N. & Veal, D. A. : *Lett. Appl. Microbiol.*, **25**, 303-307 (1997).
- 5) 堤 祐司, 近藤 隆一郎, 須原 弘登, 山崎 正敏, 中村 朋史, 森永 力, 上田 成一: 公開特許 特開2007-202462.