フィールド&ラボ〜知って得する豆知識③~ 簡単、便利~ハダニ採集用小型吸虫管

京都大学大学院農学研究科

刑部 下博(おさかべ まさひろ)

はじめに

ダニやスリップス等微細な研究材料の取扱いには面相 筆などを使うことが多い。植物から植物へ移動させる場 合は、移動先でおとなしくしてくれるのでこれでいいの だが、例えば DNA や RNA の抽出のためにサンプルチ ユーブに集めようとすると、サンプルチューブ内でなか なかじっとしていてはくれない。実際に筆者は、RNA 抽出のためにハダニの雌成虫 200 匹を 1.5 ml のサンプ ルチューブに集めたりするが、筆を使ってこの作業をや ろうとすると、先に入れたハダニがサンプルチューブか ら這い出てきて埒が明かない。

筆者がハダニの DNA 研究を始めた 1990 年代始めに はまだPCRも十分普及していなかった。そのため、 DNA 変異を解析するために当時の職場 (農林水産省果 樹試験場安芸津支場)の設備でも比較的手軽にできる方 法として、抽出した DNA をそのまま制限酵素で処理し て電気泳動とブロッティング, 化学発光 (ECL) による 制限酵素多型 (RFLP) の検出を行っていた (OSAKABE and Sakagami, 1994)。しかし、DNA を増幅できないため に、カンキツ苗で増殖したミカンハダニを毎回 $10 \sim 30$ mg といった量で採集して実験用の DNA を大量に抽出 し、確保する必要があった。MITCHELL (1973) によれば ナミハダニの成熟した雌成虫の平均体重は 24.5 µg であ る。ミカンハダニはナミハダニに比べてやや小さい印象 があるが、この体重をそのまま当てはめて単純計算して も 400~1,200 個体の雌を集めていたことになる。これ では筆を使った収集はほとんど不可能である。

そこで、効率よくハダニを採集するために、小型の吸 虫管を作成してハダニを集める方法を考えた。

Easy Use and Convenience—Insect Suction Pipes for the Collection of Spider Mites. By Masahiro Osakabe

(キーワード: DNA 分析, RNA 分析, 核酸抽出)

Ⅰ 吸虫管の構造

現在、私達の研究室ではテフロンチューブ製の吸虫管 を用いている。これは、大阪府食と緑技術センターで起 こされた設計図を元にメーカーで制作されたものである (CR-1410. コスモ理研)。実際に使用している吸虫管の 構造とサイズは図-1の通りである。これを 1.5 ml のポ リプロピレン製サンプルチューブにセットし、エアーポ ンプ (ミニポンプ MP Σ 300, 柴田科学) を使って吸引 している (図-2)。

最初に筆者がハダニ採集用の吸虫管を手作りした際に は、テフロンチューブではなく、細いガラス管を使って いた。また、もう少し大きめのゴム栓に穴をあけて同様 の装置を作り、直径 15~20 mm、長さ 40 mm 程度の ガラス管にダニを集めていた。当時は、ガラス管の先端

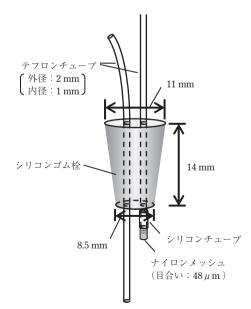


図-1 ハダニ・微小昆虫用吸虫管の構造



図-2 吸虫管とエアーポンプの組合せ

や途中の屈曲部位にハダニの吐糸が張り付いて管が詰まりやすく、しばしば紙縒りを作って掃除しながらの作業であった。しかし、テフロンチューブの場合はそのような問題はないようで、これまでのところ掃除を必要とする詰りは経験していない。また、ガラス管にハダニを集めた場合は、後にハダニを取り出す際に、ハダニをガラスから簡単に外すことができずに大変な思いをしていた。この点については吸虫管を小型化して 1.5 ml のサンプルチューブを使うことで相当程度改善された。

Ⅱ ハダニの収集に適した吸虫管の調整

ハダニを集める場合、ハダニがよく増殖したリーフディスクから顕微鏡で観察しながら集めるのが効率的である(図-3)。このとき例えば雌成虫を集めようとすると、他の発育ステージの個体や卵、脱皮殻や糞、吐糸等様々な供雑物がリーフディスク上に存在するため、これらの混入を避けたい。そこで、筆者は吸い口のテフロンチューブをライターの火で少し炙って柔らかくなったところを引き延ばして、適当なところでカットすることにより吸い口を細くし、先端の内径がハダニの雌成虫がちょうど通る程度(0.5 mm 前後)になるように調整して使用している(図-4)。

この状態にした吸虫管を使って、0.6 I/分程度の流速で使用することにより、増殖したリーフディスクから雌成虫や様々な発育ステージを個別に吸い取ることができる。ハダニを集めて DNA や RNA を抽出しようとする場合にはカビなどのコンタミも大変気になるところであ



図-3 吸虫管によるハダニ収集風景

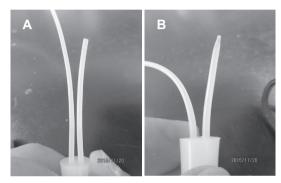


図-4 吸虫管先端部の加工 A:加工前,B:加工後.

る。吸い口が太過ぎる場合にはダニを吸い取るためにより高い流速が必要となる。しかし、流速を高くすることにより、周辺の個体や供雑物を一緒に取り込む危険性も高まる。よりよいサンプルの確保のためには流速を必要最小限にして供雑物の混入を防ぐとともに、ハダニ自身を傷つけないことが肝心である。このため、吸い口の内径はハダニ用吸虫管の重要なポイントになる。体のごく近くに吸いこみ口を近づけたときにはじめて雌成虫が吸いこまれるくらいが適当と思われる。ただし、ガラス管を使って吸虫管を作成した場合、吐糸が管の途中に付着しやすいため、流速を高めに設定する必要があるかも知れない。

III ハダニの収集と処理

図-3 のようにしてハダニを集める場合, 雌成虫 100 個体程度であれば, 通常, ほぼ5分以内に収集作業を終えることができる。また, サンプルチューブを使用しているので, 吸虫管を外してサンプルチューブの蓋をするだけで, ハダニを簡単に維持することができる。しかし, サンプルチューブをそのまま置いておくとハダニが中で

歩き回り、それによって内部に網が張られる。網が形成されると、後で DNA や RNA を抽出する際に、チューブの底に個体を集めるのが大変になる。場合によっては数分に渡って強い振動を与えてハダニをチューブの底に集めることになる。

そこで筆者は、ハダニを収集し終わったサンプルチューブを発泡スチロールの箱に入れた氷に挿しておくようにしている。冷やすことによりハダニの活動が抑制されて網が張られなくなるため、次の処理をする前に簡単にハダニをチューブの底に集めることができる。特に、多数のサンプルを扱う場合にはこのときの効率が馬鹿にならない。ただし、RNA分析の場合は冷やすことで遺伝子発現が変化する可能性もあり、目的とする研究においてそれが許容されるかどうかについては十分に検討する必要がある。ハダニを冷やしておいた場合、サンプルチューブの側面を指で1~2回程度指で軽く弾くなどしてハダニを底に集めている。その後、このサンプルチューブに直接 DNA 抽出用バッファーや RNA 抽出用の

ISOGEN (ニッポンジーン) を加え、ペレットミキサー (トーホー) を使ってホモジナイズして、そのまま核酸 抽出操作を行っている。当研究室では、核酸分析に限らず、酵素活性の検出や体内成分の分析等でもこの吸虫管が活躍している。

おわりに

今回思いがけず小型吸虫管について執筆する機会をいただき、ハダニに関する使用方法を紹介することができた。ラボで利用しているこのような手法のノウハウに関連する情報は、文献上に表れる機会は少ない。その一方で、実験の本質ではないにもかかわらず、わずかな手作業の違いが原因で実験がうまくいかないことはよくある。この吸虫管がどの程度の意味を持つかはわからないが、この記事が多少でも研究の役に立てば幸いである。

引 用 文 献

- 1) MITCHELL, R. (1973): Ecology 54: 1349 ~ 1355.
- 2) Osakabe, M. and Y. Sakagami (1994) : Insect Mol. Biol. $3:63\sim66$.

(登録が失効した農薬12ページからの続き)

●シクロスルファムロン・ダイムロン・フェントラザミド粒剤

20512: **ビッグシュア1キロ粒剤** (バイエルクロップサイエンス) 15/12/21

●ダイムロン・フェントラザミド・ベンスルフロンメチル粒割

- **剤** 20514 : **バイエルイノーバ 1 キロ粒剤 51**(バイエルクロップ

サイエンス)15/12/21

20515 : **イノーバ 1 キロ粒剤 51**(デュポン)15/12/21

20516: **クミアイイノーバ 1 キロ粒剤 51**(クミアイ化学工業) 15/12/21

●イマゾスルフロン・ダイムロン・フェントラザミド粒剤 20517:バイエルドニチ1キロ粒剤(バイエルクロップサイエンス)15/12/21

20519: SDS ドニチ1キロ粒剤 (エス・ディー・エス バイオテック) 15/12/21

●フェントラザミド・ベンスルフロンメチル粒剤

20521:**バイエルイノーバ1キロ粒剤 75** (バイエルクロップ サイエンス) 15/12/21

20522: イノーバ1キロ粒剤 75 (デュポン) 15/12/21

●フェントラザミド・ベンスルフロンメチル水和剤

20537:**バイエルイノーバフロアブル** (バイエルクロップサイエンス) 15/12/26

20538: イノーバフロアブル (デュポン) 15/12/26

●ダイムロン・フェントラザミド・ベンスルフロンメチル水 和剤 20541: **バイエルイノーバLフロアブル** (バイエルクロップサイエンス) 15/12/26

20542: **イノーバ L フロアブル** (デュポン) 15/12/26

●ピラゾスルフロンエチル・フェントラザミド水和剤

20552: ダブルスター顆粒(日産化学工業)15/12/26 20553: バイエルダブルスター顆粒(バイエルクロップサイエ ンス)15/12/26

●イソウロン・DBN・DCMU 粒剤

21127: ワイドウェイ E 粒剤(保土谷アグロテック)15/12/3 21128: ネコソギエース A 粒剤(レインボー薬品)15/12/3

●イソウロン・DBN 粒剤

21129: ロニー粒剤 (保土谷アグロテック) 15/12/3

●グリホサートカリウム塩液剤

21130: タッチダウン iQ(シンジェンタ ジャバン) 15/12/3

●オキサジクロメホン・クロメプロップ・ピリミノバックメ
チル・ベンスルフロンメチル剤

21151: パットフルエースジャンボ (クミアイ化学工業) 15/12/17

「殺そ剤」

●タリウム粒剤

6605:メリーネコタリウム (大丸合成薬品) 15/12/14

「誘引・誘殺・交尾阻害剤」

●チェリトルア剤

17152: スカシバコン(信越化学工業)15/12/22