

レッチェのミキサーミルMM400を用いた難分解性寄生虫の細胞破碎法

ジアルジアとクリプトスポリジウムは、水中に生息し、ヒトに下痢を引き起こす可能性のある寄生虫です。これらは一般的な種であり、飲料水の処理が不十分な国々で問題となっています。どちらの寄生虫も、複雑な発育サイクルを経ています。ジアルジアのシストとクリプトスポリジウムのオーシストは、水中に存在し、環境の影響や消毒剤に耐性を持つ難分解性寄生虫です。寄生虫の検出と定量は、通常、ISO 15553「水質-水からのクリプトスポリジウム・オーシストおよびジアルジア・シストの分離と定量」に従って行われます。この規格では、様々なステップでの濃縮、免疫蛍光染色、顕微鏡下での計数が規定されています。別の分子生物学的アプローチとして、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）があります。この方法では、持続型の形態を破壊し、その後、量を決定するためにDNAを抽出する必要があります。安定したシストやオーシストを破壊するのは困難な場合があります。例えば、超音波の使用や、液体窒素による凍結と解凍を繰り返す方法など、さまざまな手法が文献に記載されています。ドイツの微生物研究所では、レッチェのミキサーミルMM400を用いた機械的なアプローチを試験しています。

ビーズ・ビーティングによる細胞破碎

いわゆるビーズ・ビーティングは、非常に効率的な技術です。小さなガラスビーズを使い、機械的效果によって反応瓶の中の細胞懸濁液を破壊するものです。通常、バイアルをボルトテックスサーにかざし、容器内で懸濁液とビーズを回転させ、最終的に細胞の破碎を行います。しかし、この方法は、高い試料排出や最大10分という長い破碎時間を必要とするので、非常に時間がかかり、エラーが発生しやすいという問題があります。

レッチェのミキサーミルMM400と2mlのディスポチューブを10本までセットできるアダプターを使用することで、プロセスが速くなるだけでなく、再現性も高くなります。微生物研究所では、1mlあたり 9×10^1 個のジアルジアシストと 1×10^6 個のクリプトスポリジウムのオーシストから、合計6つのアプローチを作成しました。各アプローチから1mlが破碎に使用された。最初の3サンプルはMM400で破碎しました。1mlの懸濁液を3.2gのガラスビーズ（サイズ0.75mmから1mm）とネジ付きNunc Cryo容器で混合し、30Hzで一度に10分間3回振とうを行いました。

その後、製造元の指示に従い、GenUp DNA/RNA キットを用いて、容量 400µm、溶出量 100µm で DNA の単離を実施した。サンプル4から6をネガティブコントロールに使用しました。したがって、400µlを直接溶解し、キットの助けを借りて精製した後、qPCRに供しました。その際、5 µl のサンプルと 20 µl のマスターミックスを使用し、定量は、既知の DNA 標準物質の 10 倍希釈系列で行いました。Giada cystsとCryptosporidium oocystsの特異的なプローブを使用し、BioRad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection Systemで測定を行いました。この結果は、ビーズビートと細胞溶解による細胞破砕が、溶解のみによる場合よりもはるかに効率的であることを明確に示しています。

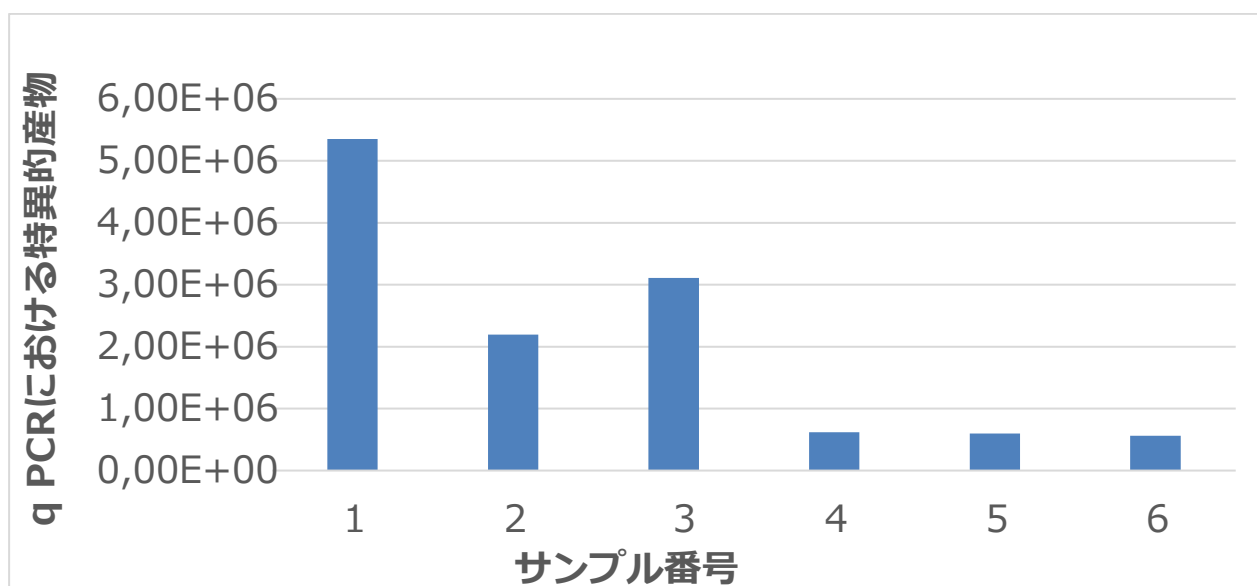


図1：1mLサンプル中の*Cryptosporidium parvum*の特異的なqPCR産物

レッチェのミキサーミル MM 400 - オールラウンドなボールミル

ミキサーミル MM400 (図2) は、豊富なアクセサリにより、最大8本の50mlファルコンチューブや各種エッペンドルフチューブなどの使い捨てバイアル内の細胞破砕など、幅広いアプリケーションに対応しています (一度に最大20本、図2)。典型的な試料としては、植物、羽毛、骨、組織、錠剤、木材、鉱物、化学物質などがあり、MM400は試料の均質化においてまさにオールラウンダーと言えます。MM 400は、最大5ミクロンの粉砕が可能で、硬質、中硬質、脆い試料だけでなく、軟質、弾性、繊維質の試料に適しています。ステンレス製の粉砕ジャーを使用すれば、凍結粉砕も可能です。オプションのクライオキットを使用すると、試料を充填した粉砕ジャーを液体窒素で冷却することができます。



図2：ミキサーミルMM400と50mlファルコンチューブ8本用アダプター（左）、エッペンドルフチューブ用アダプター（中）、粉碎ジャーとボール（右）などの各種アクセサリ類

まとめ

寄生虫は複数の細胞核を持つため、qPCRベースの結果が複数陽性になる可能性があります。つまり、最初に使用したシストよりも多くの寄生虫が検出されます。最良のqPCR結果が得られたのは、サンプルNo. 1~3でレツチェのMM400ミキサーミルでビーズビーティングを行い、細胞を破碎したものです。このミキサーの使用により、クリプトスポリジウムの検出率は大幅に向上しましたが、ごく少数しか検出されなかったジアルジアの検出率は向上しませんでした。

著者:

Dr. Tanja Butt
Product Management
t.butt@retsch.com