

Title	ナノポア型シーケンサーを用いた、トキソプラズマ原虫のゲノム疫学解析技術の開発
Sub Title	Use of the Oxford Nanopore MinION sequencer for genotyping of <i>Toxoplasma gondii</i>
Author	三木田, 馨(Mikita, Kei)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2018
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.)
Abstract	<p>本年度は、トキソプラズマ原虫(<i>Toxoplasma gondii</i> RH-strain)を用いて、マウス腹腔内での継体培養、またヒト線維芽細胞を用いた安定的な培養方法の確立に成功した。培養して得られたトキソプラズマ原虫のtachyzoiteからgenomic DNAを抽出し、それを用いて<i>Toxoplasma gondii</i> cox1遺伝子をターゲットにしたreal-time PCR法を開発を行った。検出限界は、0.01pg/μLであり、他の遺伝子をターゲットにした既報告と検出感度は同等であったが、近年、地域によってはこれまで標的遺伝子とされていた529bpを欠損しているトキソプラズマ原虫の存在が確認されている。そのため、より保存された遺伝子であるcox1遺伝子を標的にした本方法は、地域・国を選ばない有用な遺伝子診断法であると考えられる。今後、当教室に依頼される、各種トキソプラズマ症疑いの臨床検体に応用し、実際の感度・特異度を明らかにしていく予定である。</p> <p>トキソプラズマの遺伝子型分類法については、本年度はNanopore Oxford technologiesのMinIONを用いて、preliminaryな検討を行った。培養した<i>Toxoplasma gondii</i> RH-strainのtachyzoiteからgenomic DNAを抽出して、Rapid sequencing kitを用いてトキソプラズマ原虫のシーケンスを行なった。しかしながら、今回の検討では、有意なデータを得ることができなかった。その理由についてであるが、先行論文を参したところ、おそらく抽出したDNAの純度に問題があったものと考えられる。そのため、次年度以降の検討では、DNA抽出にカラムを使用する、また抽出後に、DNAの純度を確認することが必須となる。また、一般的に、トキソプラズマ症の臨床検体中のトキソプラズマDNA量は微量であるため、遺伝子型分類の際の標的配列をPCR法、またはLAMP法で増幅することが必要となってくると考えられ、この点についても今後検討を行う。</p> <p>In this fiscal year, we succeeded in establishing a stable culture method of <i>Toxoplasma gondii</i> RH strain grown in monolayer of HFF and intraperitoneal infection using BALB/c mice. We extracted genomic DNA from tachyzoite of <i>T. gondii</i> obtained by cultivation and developed real-time PCR method targeting <i>T. gondii</i> cox1 gene. The detection limit was 0.01 pg/μL, and the detection sensitivity was the same as the reported cases targeting other genes. However, some toxoplasmosis cases deficient in 529 bp, previously regarded as the target gene, has been reported recently. Therefore, this method targeting the cox1 gene, is considered to be a useful genetic diagnostic method regardless of region or country. We plan to clarify the actual sensitivity and specificity by applying to clinical specimens of various toxoplasmosis.</p> <p>For developing genotyping method of <i>T. gondii</i>, we used MinION (Nanopore Oxford technologies) for preliminary study. <i>Toxoplasma gondii</i> sequencing was performed using MinION Rapid sequencing kit (Nanopore Oxford technologies). However, We could not obtain significant data. We considered the failure was due to the purity and the extract method of genomic DNA. Therefore, it is essential to use a column for DNA extraction and confirm its purity. Since the amount of <i>Toxoplasma</i> DNA in clinical specimens is generally small, it is necessary to amplify the target sequence in genotyping by PCR method or LAMP method before sequencing.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2017000001-20170300

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	専任講師	補助額	300 (A) 千円
	氏名	三木田 馨	氏名 (英語)	Kei Mikita		
研究課題 (日本語)						
ナノポア型シーケンサーを用いた、トキソプラズマ原虫のゲノム疫学解析技術の開発						
研究課題 (英訳)						
Use of the Oxford Nanopore MinION sequencer for genotyping of <i>Toxoplasma gondii</i>						
1. 研究成果実績の概要						
<p>本年度は、トキソプラズマ原虫(<i>Toxoplasma gondii</i> RH-strain)を用いて、マウス腹腔内での継体培養、またヒト線維芽細胞を用いた安定的な培養方法の確立に成功した。</p> <p>培養して得られたトキソプラズマ原虫の tachyzoite から genomic DNA を抽出し、それを用いて <i>Toxoplasma gondii</i> cox1 遺伝子をターゲットにした real-time PCR 法の開発を行った。検出限界は、0.01pg/μL であり、他の遺伝子をターゲットにした既報告と検出感度は同等であったが、近年、地域によってはこれまで標的遺伝子とされていた 529bp を欠損しているトキソプラズマ原虫の存在が確認されている。そのため、より保存された遺伝子である cox1 遺伝子を標的にした本方法は、地域・国を選ばない有用な遺伝子診断法であると考えられる。今後、当教室に依頼される、各種トキソプラズマ症疑いの臨床検体に応用し、実際の感度・特異度を明らかにしていく予定である。</p> <p>トキソプラズマの遺伝子型分類法については、本年度は Nanopore Oxford technologies の MinION を用いて、preliminary な検討を行った。培養した <i>Toxoplasma gondii</i> RH-strain の tachyzoite から genomic DNA を抽出して、Rapid sequencing kit を用いてトキソプラズマ原虫のシーケンスを行なった。しかしながら、今回の検討では、有意なデータを得ることができなかった。その理由については、先行論文を参したところ、おそらく抽出した DNA の純度に問題があったものと考えられる。そのため、次年度以降の検討では、DNA 抽出にカラムを使用する、また抽出後に、DNA の純度を確認することが必須となる。また、一般的に、トキソプラズマ症の臨床検体中のトキソプラズマ DNA 量は微量であるため、遺伝子型分類の際の標的配列を PCR 法、または LAMP 法で増幅することが必要となってくると考えられ、この点についても今後検討を行う。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>In this fiscal year, we succeeded in establishing a stable culture method of <i>Toxoplasma gondii</i> RH strain grown in monolayer of HFF and intraperitoneal infection using BALB/c mice. We extracted genomic DNA from tachyzoite of <i>T. gondii</i> obtained by cultivation and developed real-time PCR method targeting <i>T. gondii</i> cox1 gene. The detection limit was 0.01 pg / μL, and the detection sensitivity was the same as the reported cases targeting other genes. However, some toxoplasmosis cases deficient in 529 bp, previously regarded as the target gene, has been reported recently. Therefore, this method targeting the cox1 gene, is considered to be a useful genetic diagnostic method regardless of region or country. We plan to clarify the actual sensitivity and specificity by applying to clinical specimens of various toxoplasmosis.</p> <p>For developing genotyping method of <i>T. gondii</i>, we used MinION (Nanopore Oxford technologies) for preliminary study. <i>Toxoplasma gondii</i> sequencing was performed using MinION Rapid sequencing kit (Nanopore Oxford technologies). However, We could not obtain significant data. We considered the failure was due to the purity and the extract method of genomic DNA. Therefore, it is essential to use a column for DNA extraction and confirm its purity. Since the amount of <i>Toxoplasma</i> DNA in clinical specimens is generally small, it is necessary to amplify the target sequence in genotyping by PCR method or LAMP method before sequencing.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			