

DNA による雌雄判別法の確立

3年A組 米田 江里奈 3年A組 吉田 彩乃 3年B組 米田 奈央
指導教員 櫻井 昭

1. 要約

私たちは、ピスタチオの DNA による雌雄判別に向けて、研究を行っている。そこで、すでに確立されている雌雄異株のイチョウの雌雄判別方法をピスタチオへ応用できないかと考えた。そして、ピスタチオからの DNA 抽出にむけ、イチョウから DNA の抽出を試みた。その結果、イチョウの葉から安定的に DNA を抽出することができた。

キーワード ピスタチオ、DNA、抽出

2. 研究の背景と目的

ピスタチオは、雌雄異株で実をつけるためには、どちらの木も必要となるが、成長が遅く、実をつけるまで成長するのに約 10 年かかり、また、成木となるのに約 20 年かかると言われている。だから、実をつけてから、雄株、雌株の判断をしていたら、生産の効率が悪い。そこで、私たちは、ピスタチオがまだ実のない苗木の間に DNA を利用し雌雄の判別を行い、雌株を多く育てることで多くの実を得られるのではと考え、効率の良い生産を目指し、研究を始めることにした。そこで、同じように雌雄異株であるイチョウは DNA による雌雄判別の方法が確立されているため、私たちは、イチョウの DNA による雌雄の判別の研究を行い、ピスタチオに応用できないかと考えた。そして、DNA からの雌雄判別に必要な DNA 抽出するため、まず、入手しやすい、イチョウの葉からの DNA 抽出を試みることにした。

3. 研究内容

3-1 イチョウの DNA 抽出実験

3-1-1 実験の仮説

DNA 抽出キットを用いることで DNA の抽出ができる。

3-1-2 実験方法

DNA 抽出キット

キット 1「Plant Genomic DNA Extraction System」。

材料

檜原市で採取したイチョウの葉、キット、ウォーターバス、チビタン、アイスボックス、チューブ

事前準備

・TE の作製

(10mM Tris-Hcl, 1mM EDTA
ph8.0)

TE-①1M Tris-Hcl(ph8.0) 2ml

②0.5M EDTA(ph8.0)400μl

1. 純水を①+②+純水で 200ml にメス
2. オートクレーブで滅菌し 4℃で保存
ウォーターバスを 65℃に温める。

抽出方法(Plant Genomic DNA Extraction System)

1. イチョウの葉の茎をはぶき、乳鉢と乳房で粉状になるまで、すりつぶす。その後、0.1g 以下量りチューブに入れる。
2. 1 に PX1*1 を 400 μ l 入れる。
Rnase*2 20 μ l 入れる。
3. 温めておいたウォーターバスに 2 をフローターに入れ、10 分浮かす。(途中にボルテックスで混合する)
・新しいチューブと Shearing Tube*3 を 1 本ずつ用意
4. 10 分後、チビタンで溶液を落とす。
5. 4 に、PX2*4 を 130 μ l 加える。その後、ボルテックスで混合する。
6. 氷中に 5 分入れ冷やす。この間に TE1ml はかり、新しいチューブに入れる。それを 65°C ウォーターバスに浮かす。ウォーターバス後、チューブはチビタンを行い、溶液を落とす。
7. Shearing Tube に 6 をできるだけ移す。
8. 7 を遠心分離機 (13000 \times g) に 2 分かける。
9. Shearing Tube の下に出た溶液の量を量りながら、予め用意した新しいチューブに移す。
10. 9 の溶液と同量のエタノールと半量の PX3 を加え 3~5 分置く。
(11.エタノールを 650 μ l 量り入れる。)
12. Plant Genomic DNA Mini Column へできるだけ入れる。残った溶液はおいておく。
13. 遠心分離機(10000 \times g)に 1 分かけ、下の溶液を捨てる。700 μ l の WS Buffer*5 を加え、同じように遠心分離機にかけ、下の溶液を捨てた後、もう一

度遠心分離機に 3 分かける。

14. 13 の上を新しいチューブにのせ、TE を 200 μ l 加え 5 分おく。その後、3 分遠心分離機にかけ、下のチューブを 20°C のフリーザーで保存する。

尚、この実験では、雌雄の別々の葉を用意し、実験を行った。

キットによって方法は少しことなる。

*1 Storage at room temperature For research use only

*2 VIOGENE(20mg/ml)

*3 キットに含まれていたチューブ

3-1-3 実験の改善

3-1-3-1 I, II

	実験 I	実験 II
シリカゲル	×	○
エタノール	○	×

・実験 I

・エタノールを途中加えた。

Plant Genomic DNA Mini Column に移す前に入れたが、移す際に溶液が多すぎて、すべてうつすことができなかったことからこれを要因と考えた。

・実験 II

・シリカゲルを加えてすり潰す。

粉末にする時に、すり潰しやすいようになぜ加えたか？

3-2 抽出の確認

3-2-1 方法

分光高度計を用いて、抽出した DNA の確認を行う。

3-2-2 結果

抽出が以下のように確認できた。

3-3 実験結果

実験 I・II

	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280
I 雄株	72.3	1.72
雌株	59.4	1.70
II 雄株	9.3	1.73
雌株	12.7	1.46

このキットを用いたことで、DNA を抽出することができた。

I と II を比較して

II の改善した方が、抽出の濃度が低かった。

4. 考察、改善点

今まで、DNA の抽出ができたことが少なかったがこのキットを用いたことで低濃度ではあったが、安定的な DNA の抽出を可能にすることができた。しかし、より高濃度にしようと思い、改善に挑戦したが、うまくいかなかったので、今後、実験をして改善し、高濃度の DNA を抽出したいと思う。また、アスパラで確立されている DNA による雌雄判別法で用いられているプライマーをイチョウの DNA に用いたいと思う。また、様々な実験を通して、学んだことをもとにピスタチオの雌雄判別に応用していきたいと思う。

5. 今後の課題

5-1 高濃度の DNA 抽出

5-1-1 エタノールの有無の対照実験と移す際の量の多さの要因を探す。

5-1-2 シリカゲルの有無の対照実験

5-2 確立されたアスパラの雌雄判別法に用いられているプライマーをイチョウに応用する。

5-3 ピスタチオの葉の入手

6. 参考文献

[1] 「Plant Genomic DNA Extraction System」

7. 謝辞

植野先生、櫻井先生、色々なアドバイスを頂き有り難うございました。