

DNAによる雌雄判別の確立

4年B組 米田 江里奈
4年A組 吉田 彩乃
指導教諭 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。そのため、昨年はピスタチオからのDNA抽出にむけ、まず、イチョウからDNAの抽出を試み、DNAの抽出を安定的にできるようになった。今年は、DNAの判別に必要であるPCR法、電気泳動法の確立に向け、実験を進めていった。

キーワード ピスタチオ、アスパラガス、PCR法、DNA、抽出

2. 研究の背景と目的

ピスタチオは、雌雄異株であり、実をつけるためにはどちらの木も必要となる。また成長が遅く、実をつけるまで成長するのに約10年かかり、成木となるのに約20年かかると言われている。つまり、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らない苗木の間に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、研究を始めることにした。そこで、この方法を確立するのにあたり、雌雄判別法が確立されているイチョウのDNAによる雌雄判別の研究を行い、ピスタチオに応用しようと考えた。そして昨年は、雌雄判別に必要なDNAの抽出方法の確立を目指し、イチョウの葉からのDNA抽出を試みることとした。結果、安定的な抽出を可能

にすることができた。今年は、DNAからの雌雄判別に必要なPCR法と電気泳動法の確立を目標に、実験を行うことにした。そこで、論文検索を再度行ったが、イチョウの雌雄判別法の詳細を見つけることができなかった。しかし、DNAによるアスパラガスの雌雄判別法の詳細を見つけることが出来た。そこで、アスパラガスに研究材料を切り替え、そこからピスタチオへの応用を検討することにした。

3. 研究内容

3.1 DNAの抽出実験

アスパラガスからのDNA抽出実験

3.1.1 目的

イチョウで確立したDNAの抽出法を利用し、アスパラガスからのDNAを安定的に抽出する方法を確立する。

3.1.2 仮説

イチョウと同じ DNA 抽出キットを用いることで、アスパラガスからも DNA の抽出ができる。

3.1.3 実験方法

<材料>

アスパラガスの葉

DNA キット (2 種類使用)

・ Plant Genomic DNA Extraction System

・ Dneasy Plant Mini Kit

<事前準備>

TE(10mM Tris-Hcl,1mM EDTA pH8.0) の作製

・ 1M Tris-Hcl(pH8.0) 2mL — (i)

・ 0.5M EDTA(pH8.0)400 μ L — (ii)

(i)と(ii)混ぜ、200mLに純水でメスアップする。その後、オートクレーブで滅菌し、4°Cで保存。

<抽出方法>

アスパラガスの葉をすりつぶし、DNA 抽出キットを用い、DNA を抽出。DNA の抽出確認は、分光高度計によって測定した。

3.1.4 実験結果

表1のような結果が得られた。①は 6/14、②は 12/16、③は 10/29、④は 12/14 に実施したことを表している。抽出量は $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ である。純度は、260nm/280nm の値であり、2.0 に近いほど良いと判断される。

3.1.5 実験の考察

昨年度までは、DNA 抽出量の値が大きかったため、DNA 以外の不純物を測定してしまっているのではないか、という疑いがある。

った。しかし、アスパラガスでは、純度の値も 2.0 に近く、安定的に抽出できたといえる。このため、抽出した DNA を用いて、PCR 法による DNA 断片の増幅を試みることにした。

表1 アスパラガスからの DNA 抽出結果

DNA抽出Kit	サンプル	抽出量	純度
Plant Genomic DNA Extraction System	①-1	54.7	1.73
	①-2	6.8	1.67
	①-3	8.3	1.59
	②-1	36.5	1.43
	②-2	56.9	1.43
	②-3	33	1.48
Dneasy Plant Mini Kit	③-1	×	1.23
	③-2	0.3	2.21
	③-3	-0.1	0.33
	③-4	1.6	0.84
	③-5	0.1	1.02
	③-6	0.2	0.39
	③-7	2.1	0.93
	④-1	3.4	2.05
	④-2	2.7	1.52
	④-3	1.6	1.44
	④-4	1.9	1.96
	④-5	1.6	2.2
	④-6	3.1	2.13
	④-7	0.1	0.81

3.2 アスパラガスの DNA を用いた雌雄判別実験

3.2.1 目的

アスパラガスから抽出した DNA を用いて、PCR 法、電気泳動法を利用した、アスパラガスの雌雄判別を行う。

3.2.2 仮説

先行研究の論文に従い、実験を再現することでアスパラガスの雌雄判別を行うことができる。

3.2.3 実験方法

3.2.3.1 PCR法を用いたDNA断片の増幅方法

1つのサンプルにおける、PCRを行うための各溶液の濃度は以下の通りとした。

Genomic DNA	25ng
dNTPs	2.5mM
Primer(forward)	5pmol
Primer(reverse)	5pmol
10×PCR buffer	2.5 μL
<i>Taq</i> DNA polymerase	1.0U

Genomic DNAには、表1のサンプル④-2と④-4を使用した。

Primersの名称と塩基配列は、以下の通りである。

表2 プライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列
Asp1-T7-F	CTTGGCGTGAATACGTTGC
Asp1-T7-R	TCTCTTGTTCAATATACTC
Asp2-SP6-F	GCTCTTTGAGGGTGTTT
Asp2-SP6-R	TGCTCCTCCACTCTCA
Asp4-SP6-F	AGGCCTCTCAAGTTTCA
Asp4-SP6-R	AGCAGATCCCACATTGA
Asp8-T7-F	AGATCTGAGATCCGGTTC
Asp8-T7-R	AATAGTTTCATGGAGGAAGG

PCRのリアクションプログラムは以下のように行った。

94°C	30秒	↕ 32回繰り返す ↕
94°C	30秒	
60°C	30秒	
72°C	40秒	
72°C	5分	

3.2.3.2 電気泳動法を用いたDNA断片の確認方法

1%アガロースゲルを作成し、PCR法に

より増幅したDNA断片を電気泳動法により、DNA長さにより分ける。このとき、100Vで30分泳動を行った。その後、DNAを染色し確認する。

3.2.4 実験結果

表3 ゲルのレーンと溶液の対応表

レーン	プライマー名	GenomicDNA
①	Asp1-T7-R/F	サンプル④-2
②		④-4
③	Asp2-SP6-R/F	サンプル④-2
④		④-4
⑤	Asp4-SP6-R/F	サンプル④-2
⑥		④-4
⑦	Asp8-T7-R/F	サンプル④-2
⑧		④-4

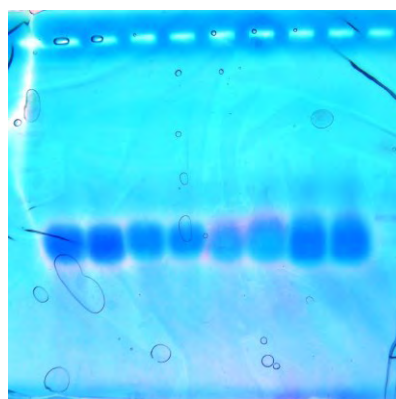


図1 電気泳動結果1

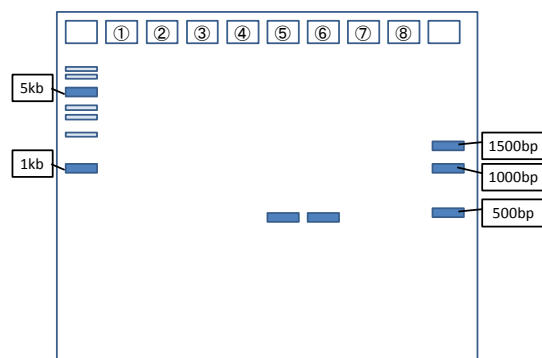


図2 電気泳動結果2

中央のレーン⑤と⑥のあたりにバンドが見られたが、ローディングバッファーが重なっていたため見えにくかった。よって、確実にバンドがでたとはいえない。レーン⑤と⑥はいずれも Asp4-SP6 のプライマーで増やした DNA で Genomic DNA が異なる。

論文によると Asp4-SP6 のプライマーは 389bp に現れ、ただし雌雄で現れるプライマーは同じである。

3.2.5 考察

前のキットで抽出した DNA を用いて先行研究をもとに行った実験では、確認できなかったが、先行研究で用いられていた DNA 抽出の新しいキットと新しい塩基配列のプライマー、そして PCR 法での増やし方も変えてみたところ、図 1、図 2 のように、Asp4-SP6(-R/-F)の部分のプライマーでバンドが確認されたことから、DNA 抽出は PCR を行えるだけの量と純度があることがわかった。

4. 考察および改善点

昨年の実験でイチョウから DNA の抽出を安定的にすることができるようになり、それをアスパラに应用することができた。また、抽出した DNA を用いて PCR 法を行い、一つのプライマーの増幅を行うことが出来た。しかし、他のプライマーでは確認できず、3 日後には消えてしまったため、再度実験を行う必要がある。PCR 法でうまくバンドが出なかったため、先行研究で用いられていた異なるキットを用いて抽出を行うことにした。新しく用いたキットでは、うまく値が出ないものもあったのでもう少し

正確に値が出るように改善が必要と考えられた。また、すり潰す際に、液体窒素を用いることで、すり潰す時間の軽減、細かく粉砕することができたが抽出量に変化は見られなかった。

5. 今後の課題

DNA を Dneasy Plant Mini Kit で抽出した際に値がうまく出なかったため、改善点を考える必要がある。また、抽出を雌雄判別したいのでアスパラガスの雌雄の違いを調べ、区別し DNA を抽出する。PCR で DNA を増やすことが可能なことがわかったので、再度考え直し、PCR を行い、アスパラガスの雌雄判別法の確立を目指す。その後、ピスタチオからの DNA 抽出を試み、PCR 法を用いた雌雄判別法を確立させたい。そのためには、新たにピスタチオの DNA の塩基配列を検索するとともに、ピスタチオと同属の植物において、調べられている DNA 断片を文献検索し、PCR 法に使えるようなプライマーを考案する必要がある。

6. 参考文献

- [1] BAC-derived diagnostic markers for sex determination in asparagus, A.Jamsari, 2003.
- [2] DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, John G.K.Williams, 1990.

7. 謝辞

植野先生、櫻井先生、いろいろなアドバイスを頂きありがとうございました。