

DNAによる雌雄判別法の確立

6年A組 米田江里奈

指導教諭 櫻井 昭

1. 要約

私は、DNAを用いた植物の雌雄判別に興味を持ち、研究を始めることにした。雌雄異株の植物には、実をつける植物や、雌雄によって成長させたほうが好ましい雌雄の異なる特徴をもつ植物があるので、DNAを用いて雌雄判別をして、成長し始めた早い段階に雌雄で育てたい方を選び育てる方法を見つけようと考えた。そこで、雌雄異株であるピスタチオのDNAによる雌雄判別を行おうと考え、ほかの植物の雌雄判別法を試みることにした。

キーワード ピスタチオ、アスパラガス、PCR法、DNA、抽出、プライマー

2. 研究の背景と目的

植物の雌雄判別をDNAから行う先行研究において、多く試みられている種はアスパラガスであった。そこで、先行研究の追実験を行うことで、雌雄判別法を知る手掛かりを得られないかと考えた。また、アスパラガスの雌雄判別で用いている方法を他の植物に応用できないかと考え、アスパラガスとは異なる雌雄異株の植物のDNAを抽出し、雌雄判別に応用しようと考え、まずはDNA抽出の検討を行うことにした。

いて行った(表1)。結果より、(1)の方が精度よく抽出しやすいことが分かった。

表1 DNA抽出結果

アスパラガス	抽出量 ($\mu\text{g/ml}$)	純度
2015/11/14①	3.4	2.05
②	2.7	1.52
③	1.6	1.44
④	1.9	1.96
⑤	1.6	2.2
⑥	3.1	2.13
⑦	0.1	0.81
2016/10/13	261.5	64
山椒		
2017/6/23 雌株	24.9	1.65
雄株	1	0.55
メダカ		
2017/7/13 雌株	2.6	1.06
雄株	8.4	0.99

3. 研究内容

3-1 DNA抽出の検討

以下に示す、2種類のDNA抽出キットを用い、植物からのDNA抽出の検討を行った。

(1) Plant Genomic DNA Extraction System

(2) Dneasy Plant Mini Kit

材料はアスパラガスの葉を用いた。抽出したDNAの純度や収量は、分光光度計を用

3-2 PCR法を用いた雌雄判別

3-2-1 実験目的

3-1で抽出したDNAを用い、アスパラガスの雌雄判別に利用されているDNAの塩

基配列を、PCR 法により増幅させ、電気泳動法を用いて確認する対実験を行った。

3-2-2 実験方法

PCR reaction Mix の各溶液の割合は以下の通りである。

Genomic DNA 24ng、dNTPs 10μL、primer R 2.5μL、primer F 2.5μL、10×PCR Buffer 2.5μL、Taq ポリメラーゼ 0.1μL、Total 25μL

また Primer は先行研究で示されていた 4 種類を用いた(表 2)。そして、PCR 法は、先行研究で示されていたプログラムに従って行った(表 3)。

実験はプライマーと Agalose Gel の濃度の組み合わせを変えて、3 回行った(2016/1/28、2016/7/13、2016/8/17)。その 3 回の組み合わせは、表 4 に示した。

表 2 用いたプライマーの塩基配列

プライマー名	アニーリング時間	DNAの塩基配列
Asp1-T7-F	59°C 30s	CTTGGCGTGAATACGTTGC
Asp1-T8-R	59°C 30s	TCTCTTGTCAATATACTC
Asp2-SP6-F	59°C 30s	GCTCTTTGAGGGTGTTF
Asp2-SP6-R	59°C 30s	TGCTCCTCCACTCTCA
Asp4-SP6-F	60°C 30s	AGGCCTCTCAAGTTTCA
Asp4-SP6-R	60°C 30s	AGCAGATCCCACATTGA
Asp8-T7-F	50°C 30s	AGATCTGAGATCCGGTTCC
Asp8-T7-R	50°C 30s	AATAGTTTCATGGAGGAAGG

表 3 PCR プログラム

94°C	30 秒	32 cycles
94°C	30 秒	
50°C - 60°C (表 2 参照)	30 秒	
72°C	40 秒	
72°C	5 分	

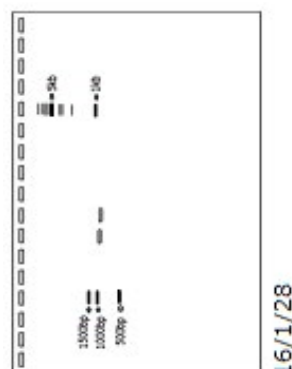
表 4 実験で用いたプライマーの種類

	Genomic DNAs	Marker	Agalose Gel
2016/1/28	②④	Asp1-sp6, Asp2-sp6, Asp4-6, Asp8-T7	1%
2016/7/13	②	Asp1-sp6, Asp2-sp6, Asp4-6, Asp8-T7	3%
2016/8/17	②④	Asp4-6	3%

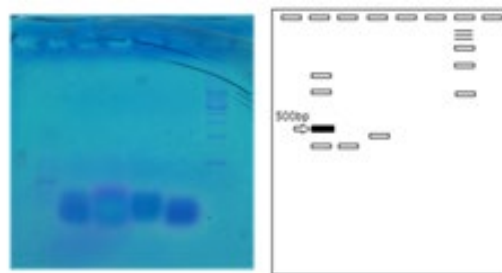
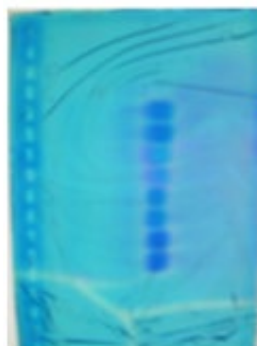
AgaloseGel 濃度

3-2-2 実験結果

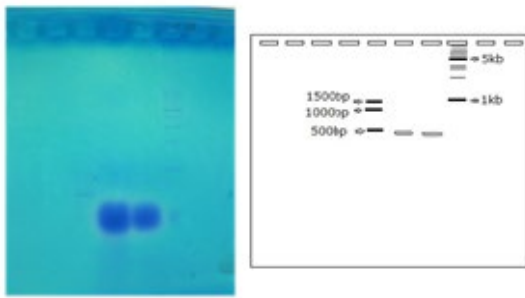
以下のように、電気泳動法によりバンド (DNA 断片)が確認できた (左; 写真、右; バンドの値)。



結果1 2016/1/28



結果2 2016/7/13



結果3 2016/8/17

Asp4-6 のバンドが 1,000bp に見られた。
中央のあたりにマーカーが見られた。

これはいずれも Asp4-SP6 のプライマーで増やした DNA で鋳型 DNA が異なるものである。

3-2-3 アスパラガスの雌雄判別の考察

このことから、アスパラガスの雌雄判別が一部のプライマーではできたが繰り返しできなかつた。ほかの植物への応用性が低いと考えられる。また、PCR によって DNA が増幅されたのかが、電気泳動がうまくいっていないので少し疑問がある。(2004 Jamsari A¹)

3-2 他の方法での試行

雌雄異株で研究がなされていて雌雄が分かっているものには、他にもイチョウ、カキ、などがある。植物と動物の DNA の雌雄の違いの関連性を調べた研究が進んでいる。このことから、以前に行っていたアスパラガスにある DNA の塩基配列を用いて構築したプライマーを用いた実験から、動物雌雄で異なる DNA の塩基配列との関連性があると考えられる植物の DNA の塩基配列を利用して実験を行うことにした。この実験においては、雌雄異株がはっきりわかっている山椒を用いて実験を行った。また、動物との関連性を知るため、身近に

あるメダカを動物と植物の比較として用いた。

3-2-1 実験仮説

どんな植物においてもプライマーを用いることで雌雄判別ができる。また、動物にも共通しているので動物の雌雄判別もできる。

3-2-2 実験方法

材料

山椒(雌雄わかっている)、ヒメダカオス、メス、以前抽出したアスパラガスの DNA

方法
DNA の抽出を以前と同様の方法で植物から行った。

PCR reaction Mix の各溶液の割合は以下の通りである。

DW 6 μ l, 2 \times Buffer 25 μ l, 2mM dNTPs 10 μ l, Primer F 1.5 μ l 10 pmol/ml, Primer R 1.5 μ l, KOD FX 1 μ l, Sample 5 μ l, Total 50 μ l

動物にも汎用性があるとされるプライマーを用い(表 5)、PCR プログラムもその先行研究に従って設定した(表 6)。

表 5 用いたプライマーの塩基配列

DMY-F	CCGGGTGCCCAAGTGCTCCCGCTG
DMY-R	GATCGTCCCTCCACAGAGAAGAGA

表 6 PCR プログラム

98°C	2分	30 cycles
98°C	10秒	
55°C	30秒	
68°C	60秒	
78°C	5分	

3-2-3 実験結果

なにも結果が得られなかった。メダカの DNA 抽出においては、分光光度計で DNA が確認できていたので、PCR か、電気泳動での操作に問題があったと考えられた。しかし、コントロールをしっかりと設定できていなかったため、どちらに原因があるのか検証はできなかった。

難うございました。

4. 考察、今後の課題

DNA の抽出が出来ているか、電気泳動法によって確認したところ、ラダーが現れなかった。これは、電気泳動に使用した DNA 量が少なかったため確認できなかった可能性もある。よって、DNA 抽出が出来ているのか確認するための方法を検討したい。

DNA を抽出後、PCR で増やしたが再度確実に実験できなかったため、繰り返し実験が行えるようにしたい。DNA の抽出から確認まで時間がかかるので、短時間で容易に雌雄判別できる方法を模索したい。また、電気泳動後に染色する方法を DNA がどのくらい含まれているかを考えて方法を変えて実験を行い、PCR ができているのか調べ、新しい方法への応用をしたい。

5. 参考文献

- [1] 「Plant Genomic DNA Extraction System」
- [2] 「Dneasy Plant Mini Kit」
- [3] 「メダカ幼魚の簡易・迅速な性別判断方法」西口慶一 著 医学と生物学 第 155 巻 第 2 号(2011.2)

6. 謝辞

櫻井先生、色々なアドバイスを頂き有り