

(技術名) クビレズタ及びヒトエグサのDNA抽出における前処理法の検討							
(要約) クビレズタ(海ぶどう)とヒトエグサ(あーさ)において、藻類のDNA抽出で一般的に行われる試料の前処理方法を省略したCTAB溶液を用いたフェノール・クロロホルム抽出法によりDNAを抽出することができる。							
海洋深層水研究所					連絡先	098-896-8655	
部会名	水産業	専門	養殖	対象	クビレズタ、ヒトエグサ	分類	研究
普及対象地域							

#### [背景・ねらい]

クビレズタやヒトエグサは、本県水産業における重要な養殖品目である。しかしながら、その安定生産には様々な課題を抱えており、その対策の一つとして、養殖に使用する種苗の遺伝的特性の解明が求められている。そのためには、まず DNA を安定的かつ効率的に抽出できることが不可欠であるが、藻類の DNA 抽出における前処理法は、多種多様な手法が用いられており、クビレズタやヒトエグサにとって有効な手法を検討した例は見当たらない。そこで、クビレズタとヒトエグサの前処理法の検討を行い、安定的かつ効率的な手法を明らかとする。

#### [成果の内容・特徴]

1. 前処理における冷凍の必要性を確かめるために、試料と乳鉢を常温で処理した区と冷凍で処理した区で DNA 抽出を行い、PCR により評価を行った(表1)。クビレズタとヒトエグサの両方とも、常温・冷凍関係なく、DNA 抽出および PCR 増幅が可能であった(表2)。
2. 前処理におけるタンパク質分解酵素(プロテイナーゼ K)の有効性を調べた。クビレズタでは、添加区・無添加区ともに DNA 抽出、PCR 増幅まで確認できた。ヒトエグサでは、添加区において DNA 抽出物がゲル状になってしまい、PCR 増幅効率も低下したため、添加しない方が良かった(表3)。
3. 藻体試料をすり潰すには労力と時間を要するが、シリカゲル粉末を用いることにより、労力を削減し、粉碎に要する時間は 1/5 程度に短縮することができる。また、PCR 増幅も添加区と無添加区で変わりなく、増幅産物が確認された(表4)。
4. 上記のとおり、両種では、液体窒素及びタンパク質分解酵素を用いることなく、常温のまま、シリカゲルを添加して効率的に藻体をすり潰す方法で前処理が可能となり、CTAB 溶液を用いたフェノール・クロロホルム法(図)によって DNA 抽出から PCR 反応を行うことができた。

#### [成果の活用面・留意点]

1. 本手法は、常温の試料から DNA 抽出を行うことが可能なので、藻類の前処理法で用いられることが多い液体窒素の入手や保管が必要なく、DNA 抽出サンプル収集作業の低コスト化と簡素化ができる。
2. シリカゲルを用いた場合、DNA 抽出物が薄桃色になる。蛍光色素を伴うシーケンス反応では、シリカゲル添加区では、シーケンスの成功率が 3～4 割程度に減少するため、注意が必要である(表5)。

[具体的データ]

表1. PCR増幅を行った遺伝子領域とプライマーに関する情報

対象種	増幅領域	プライマー名	プライマー配列	引用元論文
クビレズタ	5.8S-ITS2	ITSF	CCTCTGAACCTTCGGGAG	Jousson et al., 1998
		ITSR	TTCACCTCGCCATTACT	Jousson et al., 1998
ヒトエグサ	ITS1-5.8S-ITS2	Ent18SA	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	Blomster et al., 1998
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990

表2. 常温区と冷凍区におけるPCR効率の比較(それぞれ20サンプル中)

	常温区	冷凍区
クビレズタ	100%	100%
ヒトエグサ	100%	100%

表4. シリカゲルの有無によるPCR効率の比較(それぞれ20サンプル中)

	添加区	無添加区
クビレズタ	100%	100%
ヒトエグサ	100%	100%

表3. タンパク質分解酵素の有無によるPCR効率の比較(それぞれ20サンプル中)

	添加区	無添加区
クビレズタ	100%	100%
ヒトエグサ	60%	100%

表5. シリカゲルの有無によるシーケンス成功率の比較(それぞれ14サンプル中)

	添加区	無添加区
ヒトエグサ	36%	100%

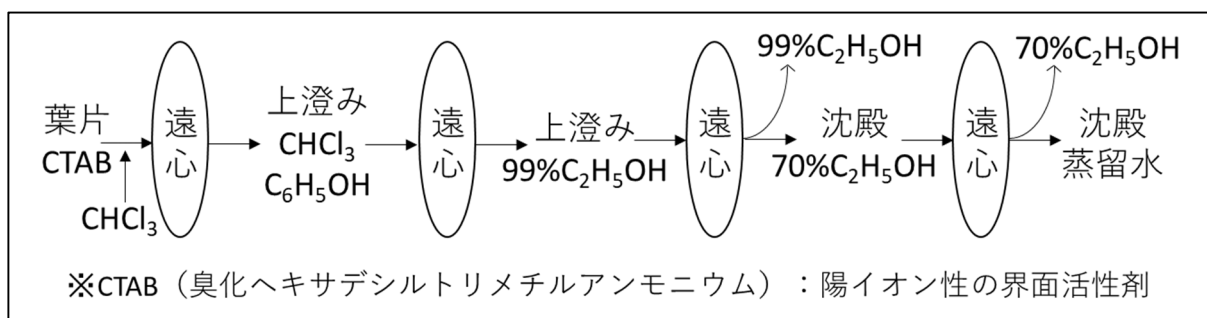


図. CTAB溶液を用いたフェノール・クロロホルム法によるDNA抽出

[その他]

課題ID: 2019深002、2019深003

研究課題名: クビレズタ(海ぶどう)の株保存技術および品質管理技術の開発、ヒトエグサ(あーさ)の系統解析と系統保存技術開発

予算区分: 県単

研究期間(事業全体の期間): 2019~2020年度 (2019~2021年度)

研究担当者: 照屋清之介

発表論文等: 照屋清之介・寺本沙也加(2020) 沖縄深層水研報、No. 20 (投稿準備中)