

短 報
Note

DNA マーカー選抜に利用可能な レタスからの簡易なゲノム抽出方法の確立

関 功 介^{*†}

(平成 30 年 11 月 5 日受付/平成 31 年 1 月 25 日受理)

要約: 農作物の育種現場で DNA マーカーを利用した個体選抜を行うには、PCR に必要なゲノムを多検体から迅速に抽出する必要がある。検体数が少ない場合には実績ある市販のゲノム抽出用キットを利用すれば PCR に用いるゲノムを確実に抽出できるが、検体数が多い場合には実験労力やコストが問題となるため、多検体から簡易にゲノムを抽出できる方法が必要である。そこで、DNA が二酸化ケイ素に結合しやすい性質を利用して、より簡易なゲノム抽出の方法を検討した。供試植物には、ゲノムを抽出するのが難しい植物として知られているレタスを用いた。その結果、ガラス繊維濾紙をピペットチップ内に入れてゲノムの粗抽出液および 2 種類の洗浄液をそれぞれ数回ピペッティング操作するだけで、簡易にゲノムを抽出できることが確認できた。また、この方法で抽出したゲノムを用いて PCR を行ったところ、増幅産物を安定して得られることが明らかとなった。本研究により、PCR に用いるレタスのゲノムを簡易に抽出し、安定的に PCR 産物が得られる方法を確立した。

キーワード: ゲノム抽出, DNA マーカー, ガラス繊維濾紙, レタス, ピペッティング操作

1. 緒 言

次世代シーケンサの普及に伴い、農作物のゲノム解析が急速に進展し、一塩基多型 (SNPs) や挿入および欠失 (Indel) などのゲノム多型情報が容易に利用できるようになった。すでに、農作物の品種改良においても耐病性等の農業上重要な形質と相関の高い DNA マーカーの開発が次々となされており、実際の育種現場において Marker Assist Selection (MAS) による個体選抜法が実用化の段階に突入している。農作物のなかには、ゲノムを抽出するのが難しいものが多数存在する。その様な農作物からゲノムを抽出する方法が開発されているものの¹⁾、1 個体あたりのゲノム抽出に時間とコストを要することが育種上の問題となっており、ゲノムを抽出する工程の簡素化が強く求められている。

レタス (*Lactuca sativa* L.) は、キク科で乳液を植物体全体に有することもあり、ゲノムを抽出するのが難しい植物の一つとされている。実績ある市販のゲノム抽出キットを用いれば、質的および量的に信頼できるレタスゲノムの抽出が可能であるが、選抜規模によってはランニングコストおよび実験労力の問題から市販キットの導入は難しい場合がある^{2,3)}。そこで、安価で迅速かつ簡易なゲノム抽出方法として、イネで実績のあるガラス繊維濾紙法⁴⁾に注目し、レタスへの適用性について検討した。

2. 材料および方法

供試材料は新鮮重 100 mg 程度のレタス品種「シナノグリーン」の葉を 5 枚用いた。ゲノム抽出液および洗浄液の組成は、Fukami と Sassa の報告を参考にした^{4,5)}。各溶液の基本組成は、ゲノム抽出液: 4 M Guanidine thiocyanate, 0.1 M Tris-HCl pH8.0, 1% Polyvinylpyrrolidone, 洗浄液 1: 60% Ethanol, 60 mM Potassium acetate, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 洗浄液 2: 70% Ethanol とした。ゲノム抽出液は 65°C に温めた蒸留水を用いた。洗浄液 1 と洗浄液 2 は、あらかじめ 96 穴プレートに各々 200 μ L と 100 μ L を分注した。65°C に温めたゲノム抽出液は、直前に 100 μ L を分注した。ガラス繊維濾紙は、ワットマン社製の Glass microfiber filter GF/F 25 mm をハサミで 8 分割して容量が 200 μ L のマイクロチップ内にピンセットで挿入した (図 1)。

ゲノム抽出液 200 μ L とレタス葉を破砕用チューブに入れ、Multi-beads shocker (安井機械) を用いて 1500 rpm で 15 秒の条件で破砕した。上澄み液をガラス繊維濾紙が入ったマイクロチップで吸い上げ、ガラス繊維濾紙にゲノム抽出液が吸収されたのを目視で確認した後、洗浄液 1 を 5 回ピペッティング、洗浄液 2 を 5 回ピペッティングしてマイクロチップ内のガラス繊維濾紙の洗浄を行った。65°C に温めておいたゲノム抽出液を 5 回ピペッティングしてゲノムの溶出を行い、ゲノム粗抽出液とした (図 2)。

PCR は、KOD FX (TOYOBO) を用いて行った。プライマーは、WF25-42-SCAR⁶⁾を用いた。PCR のテンプレ

* 長野県野菜花き試験場 育種部

† Corresponding author (E-mail: seki-kosuke@pref.nagano.lg.jp)

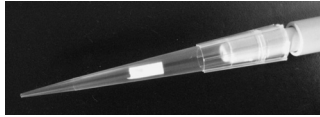


図 1 マイクロチップ (容量: 200 μ L) 内に挿入したガラス繊維濾紙 (GF/F 25mm)

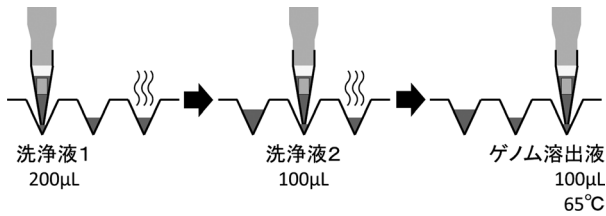


図 2 ガラス繊維濾紙を入れたマイクロチップでゲノムを抽出する操作手順

トとしてゲノム粗抽出液を 0.5 μ L 用いて、10 μ L の容量で PCR を行った。反応条件は Aruga の報告を参考に 2 ステップサイクルに改良した。94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、58 $^{\circ}$ C で 30 秒間を 35 サイクル行った。

ゲノム粗抽出液は 1% のアガロースゲル、PCR 産物は 3% のアガロースゲルを用いて各 10 μ L を電気泳動した。泳動後にエチジウムブロマイドを用いて染色し、UV トランスイルミネーターを用いて目視で確認した。

3. 結果および考察

ピペッティング操作で抽出したゲノム粗抽出液を 1% アガロースゲルで電気泳動した結果、5 反復のいずれもバンドがややスメアな状態で検出された。このことから一部が分解されているものの、ゲノムが抽出されていることが示された (図 3)。

次に、このゲノム粗抽出液を用いて PCR を行った。PCR の酵素は、夾雑物が多い試料でも増幅可能な KOD FX (TOYOBO) を用いた。3% アガロースゲルで電気泳動した結果、明瞭なバンドが確認できた (図 4)。

このことから、ガラス繊維濾紙を入れたマイクロチップを用いてのピペッティング操作のみでレタスのゲノムを抽出可能で、KOD FX (TOYOBO) を PCR の酵素として用いることで安定して増幅産物を得られることが示された。

育種工程に新技術を導入するには、再現性、簡便性およびランニングコストが課題となる。MAS には、植物体からのゲノムの抽出、PCR、電気泳動の 3 工程がある。このうち PCR と電気泳動の工程ではそれぞれ、夾雑物の多いサンプルでも安定して増幅産物が得られる KOD FX (TOYOBO) などの酵素、マイクロチップを利用した MultiNA (Shimadzu) などの全自動電気泳動装置が開発されている。したがって、PCR と電気泳動の 2 工程ではかなりの簡素化が進められているといえる。一方、ゲノム抽出の工程には煩雑な作業

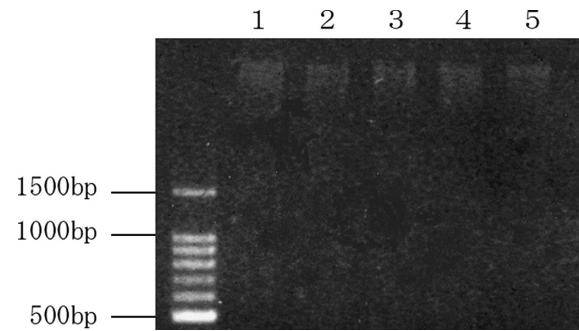


図 3 ゲノム粗抽出液 5 反復の 1% アガロース電気泳動図

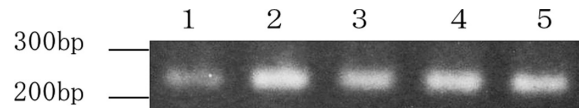


図 4 PCR 増幅産物の 3% アガロース電気泳動図

が多く、簡素化が進んでいなかったが、ガラス繊維濾紙を用いた抽出法により簡便性の改善を図ることが可能となった。また、本法を応用して 8 本のマイクロチップを装着できるマイクロピペットを利用すれば、一度の操作で 8 サンプル同時にゲノムを抽出することもできることから、さらに簡便性が向上するものと期待できる。

個体選抜では多検体を同時に扱う必要があり、ゲノムを抽出する工程が MAS の律速要因となっている。多検体を迅速・簡便に処理することが可能な本法は、ゲノムを抽出するのが難しい作物の育種においても、有用な手法といえる。

参考文献

- 1) KASAJIMA I, SASAKI K, TANAKA Y, TERAKAWA T, OHTSUBO N (2013) Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of *Cyclamen persicum* Mill. and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). *Sci. Hortic.* **164** : 65-72.
- 2) ABDEL-LATIF A, OSMAN G (2017) Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods.* **13** : 1-9.
- 3) MARTINES J (2017) Rapid and simple method for the extraction of genome DNA from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings. *Adv. Res. Life Sci.* 21-25.
- 4) FUKAMI M, MURAMOTO Y, OHKOSHI K (2008) Rapid and simple DNA extraction method from rice using a glass-fiber filter inserted pipette tip. *Plant Biotech.* **25** : 493-496.
- 5) SASSA H (2007) A technique to isolate DNA from woody and herbaceous plants by using a silica-based plasmid extraction column. *Anal. Biochem.* **363** : 166-167.
- 6) ARUGA D, TSUCHIYA N, MATSUMURA H, MATSUMOTO E, HAYASHIDA N (2011) Analysis of RAPD and AFLP markers linked to resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 2 in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica* **187** : 1-9.

Establishment of Simple Genomic DNA Extraction Method for Marker Assisted Selection in Lettuce

By

Kousuke SEKI*[†]

(Received November 5, 2018/Accepted January 25, 2019)

Summary : To use DNA markers for plant breeding, it is necessary to quickly extract genomes for PCR from multiple samples. If the number of samples is small, it is possible to reliably extract the genome to be used for PCR by using a proven commercial genomic extraction kit, but when the number of samples is large, experiment labor and cost will be a problem. By applying the glass fiber filter paper method which can extract the genome by utilizing the property that DNA is easy to bind to silicon dioxide, a simpler method of genome extraction was examined. Lettuce, from which it is difficult to extract the genome, was used for the test crop. As a result, it was confirmed that genome can be quickly extracted from multiple samples by placing the glass fiber filter paper in a pipette tip and pipetting the crude extract of genome and the two washing solutions several times respectively. PCR using genomes extracted by this method revealed that amplified products can be stably obtained using KOD FX. In this study, I established a method to rapidly extract the genome of lettuce used for PCR and stably obtain PCR products.

Key words : Genome extraction, DNA marker, Glass fiber filter paper, Lettuce, Pipetting operation

* Nagano Prefecture Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station

[†] Corresponding author (E-mail : seki-kosuke@pref.nagano.lg.jp)