

(技術名) ニガウリ種子の簡易DNA抽出において遺伝子型判別の成功率を高める条件							
(要約) ニガウリ種子の簡易DNA抽出において、種子(胚組織)の供試量 3 mg、PVPP (重量比0.5%) 添加、抽出DNAの希釈無しとすることで、PCR増幅および制限酵素処理の成功率が共に向上する。							
農業研究センター・研究企画班・野菜花き班					連絡先	098-840-8513	
部会名	野菜・花き	専門	育種	対象	ニガウリ	分類	研究
普及対象地域							

[背景・ねらい]

本県のニガウリ育種では、うどんこ病抵抗性などの有用形質を効率的に育成するため、種子(胚組織)を用いた遺伝子型判別法(令和4年度普及に移す技術)による播種前のDNAマーカー選抜を行っている。DNAマーカー選抜では、供試個体数が増えるほど多数の優良個体を得られるが、本判別法のDNA抽出においては作業工程の多さや所要時間の長さにより、供試可能な個体数は制限される。一方、簡易DNA抽出キットは作業工程が少なく短時間でDNAを抽出できるため、種子を用いた遺伝子型判別法と組み合わせることで、より多くの個体を効率的に処理可能になると期待される。しかし、本キットはPCR増幅や制限酵素処理を阻害する夾雑物の除去工程を含まないため、ニガウリ種子においては遺伝子型判別の成功率低下が課題となる。そこで本研究では、簡易DNA抽出キットを用いたニガウリ種子のDNA抽出において、遺伝子型判別の成功率を高める条件を検討する。

[成果の内容・特徴]

1. 種子を用いた遺伝子型判別法と簡易DNA抽出キットを単純に組み合わせると、PCR増幅および制限酵素処理による遺伝子型判別の成功率はともに低い(表1パターン1、図1a)。
2. 種子に含まれる夾雑物の影響を低減させるため、種子の供試量、PVPP(ポリビニルピロリドン)添加の有無、抽出DNA希釈の有無の条件を組み合わせると、簡易DNA抽出を行うと、複数のパターンで遺伝子型判別の成功率が高くなる(表1)。
3. PCR増幅の成功率は、種子の供試量3mgおよび6mgのとき、12mgと比較して向上する。また、成功率は3mgでより向上する(表2)。
4. 上記を踏まえた供試量3mgにおける制限酵素処理の成功率は、PVPP添加により向上し(表3、図1b)、抽出DNA希釈により低下する。
5. 以上より、簡易DNA抽出キットを用いたニガウリ種子のDNA抽出において、遺伝子型判別の成功率を高めるプロトコルは、図2のとおりである。

[成果の活用面・留意点]

1. 本成果は、ニガウリ育種におけるDNAマーカー選抜の効率化に活用できる。
2. 供試した種子はOHB61-5(うどんこ病感受性)と204-413(//抵抗性)のF₂種子である。
3. 簡易DNA抽出には、カネカ簡易DNA抽出キットversion2(株式会社カネカ)を用いる。
4. 表2、3の統計解析では、Firth法を用いたロジスティック回帰分析の係数推定値(説明変数が1単位増えたときの応答変数の変化量)から、種子の供試量とPVPP添加、DNA希釈が、PCR増幅および制限酵素処理の成功率に及ぼす影響を定量的に評価している。
5. 図2のプロトコルは、DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いた従来法と比べて、工程数を約3分の1の11工程、所要時間を約2分の1の52分(10検体あたり)に短縮する。

[具体的データ]

表1 パターンごとの PCR 増幅および制限酵素処理による遺伝子型判別の成功率

パターン	組み合わせ			成功率(%) ⁴⁾	
	供試量 ¹⁾	PVPP ²⁾	希釈 ³⁾	PCR 増幅	制限酵素処理
1	12mg	なし	なし	50	30
2	12mg	なし	あり	70	50
3	12mg	あり	なし	20	10
4	12mg	あり	あり	50	10
5	6mg	なし	なし	100	90
6	6mg	なし	あり	90	50
7	6mg	あり	なし	90	70
8	6mg	あり	あり	90	80
9	3mg	なし	なし	100	80
10	3mg	なし	あり	100	40
11	3mg	あり	なし	100	100
12	3mg	あり	あり	100	90
従来法 ⁵⁾	12mg	-	-	100	100

- 1) 12mg: 種子を用いた遺伝子型判別法 (令和 4 年度普及に移す技術) における、種子 2mm 採取に相当する。
- 2) なし: PVPP の添加無し、あり: カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2 の試薬 A に重量比 0.5% の PVPP を添加。
- 3) なし: 抽出 DNA の希釈無し、あり: 抽出 DNA を滅菌蒸留水で 2 倍希釈。
- 4) PCR 増幅産物または制限酵素断片により遺伝子型を判別可能な検体数/10 検体×100。
- 5) 種子を用いた遺伝子型判別法の結果を示す。DNA 抽出には DNeasy Plant Mini Kit を使用。

a: 表1パターン1

b: 表1パターン11

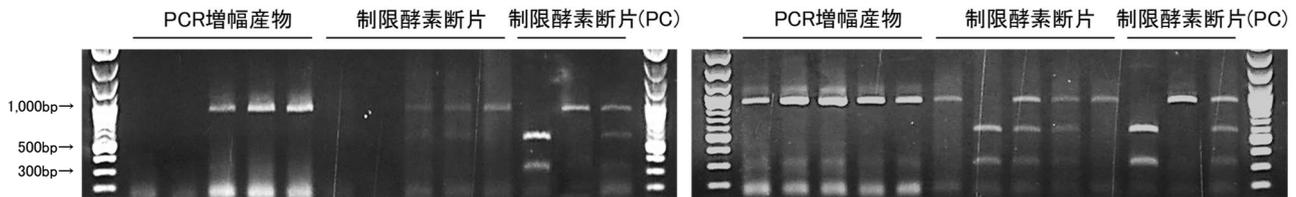


図1 PCR 増幅産物および制限酵素断片のアガロースゲル電気泳動図の例

- 1) パターン 1 では、バンドの見られないサンプルや、バンドが不明瞭なため遺伝子型判別の困難なサンプルが生じる。
- 2) PC はポジティブコントロール (従来法による DNA 抽出) を示す。
- 3) PCR 反応液は 12.5μl 容量 (鋳型 DNA 1μl) で、DNA ポリメラーゼに KOD FX (TOYOBO)、プライマーにニガウリうどんこ病抵抗性判定マーカー-PMR80 を用いた。また、PCR 増幅産物のバンドサイズは 898bp である。
- 4) 制限酵素処理の反応液は 25.0μl 容量 (PCR 増幅産物 3μl) で、制限酵素に TspRI を用いた。また、制限酵素断片のバンドサイズは感受性ホモで 577bp と 321bp、抵抗性ホモで 898bp、ヘテロで 898bp と 577bp と 321bp である。

表2 PCR 増幅の統計解析結果¹⁾

説明変数	係数推定値 ²⁾	標準偏差	Wald χ^2	p値
切片	0.15	0.50	0.09	n.s.
6mg	2.50	0.66	19.19	<0.001
3mg	4.55	1.43	32.06	<0.001
PVPP あり	-1.09	0.56	3.75	n.s.
希釈あり	0.79	0.56	1.95	n.s.

- 1) 応答変数: PCR 増幅成功率、説明変数: 種子供試量、PVPP 添加有無、DNA 希釈有無、二項分布、リンク関数: logit。
- 2) 係数推定値の絶対値が大きいほど、説明変数の応答変数に及ぼす効果は大きくなる。また、説明変数は係数推定値の符号が+のとき正の効果、-のとき負の効果を示す。

表3 制限酵素処理(供試量3mg)の統計解析結果¹⁾

説明変数	係数推定値	標準偏差	Wald χ^2	p値
切片	1.29	0.70	4.03	<0.05
PVPP あり	2.38	0.97	7.51	<0.01
希釈あり	-1.70	0.88	4.04	<0.05

- 1) 応答変数: 種子供試量 3mg における制限酵素処理の成功率、説明変数: PVPP 添加有無、DNA 希釈有無、二項分布、リンク関数: logit。

- ニガウリ種子から種皮を除去して胚を取り出し、胚の子葉側末端から組織を3mg採取する。
- ↓
- バイオマッシャーで胚を破碎し、重量比0.5%のPVPPを加えた試薬Aを100μl添加してボルテックスで攪拌する。
- ↓
- 遠心分離で胚を洗める (13,000rpm, 2分)。
- ↓
- 上澄みをPCRチューブに回収し、98°C8分、以降25°Cに設定したサーマルサイクラーにて加熱する。
- ↓
- PCRチューブをサーマルサイクラーから取り出し、試薬Bを14μl添加してボルテックスで攪拌する。
- ↓
- PCRの鋳型DNAとして使用する。

図2 ニガウリ種子の簡易 DNA 抽出プロトコル

[その他]

課題 ID : 2022 農 001

研究課題名 : 野菜類の簡易 DNA 抽出法の開発

予算区分 : 沖縄振興特別推進交付金 (労働力不足と環境負荷軽減に対応する沖縄型園芸農業技術開発事業)

研究期間 (事業全体の期間) : 2022~2024 年度 (2022~2026 年度)

研究担当者 : 友寄敬太、伊礼彩夏、儀間康造

発表論文等 : なし