



Application

ニラ単為生殖性識別DNAマーカーの検出

製品名 MyTaq DNA Polymerase (BIO-21105)

メーカー名 Bioline 社

下記のデータは、栃木県農業試験場 研究開発部 生物工学研究室 生井 潔様のご厚意により掲載させていただきました。

本アプリケーションノートでは、MyTaq DNA Polymeraseによりニラ単為生殖性連鎖マーカーおよび複相大孢子形成性連鎖マーカーをそれぞれPCR増幅し、単為生殖性の識別に応用している事例をご紹介します。

はじめに

ニラは、交配しても数%の個体にしか父親の遺伝子が伝わらず、残りの個体は母親と全く同じ遺伝子型となります(図1)。

この性質を単為生殖性といい、父親の遺伝子が伝わる確率(交雑率)は交配に用いる母親によって異なります。

この単為生殖性は、種子生産を行うには都合の良い性質ですが、交配しても得られる個体のほとんどが母親と同じ遺伝子型となるため、新品種を開発するには不都合な性質です。

これまでの研究から、単為生殖性を持たない(両性生殖性)ニラの開発に成功し、さらに単為生殖性が両性生殖性を識別するDNAマーカーを開発しました(図2)。

なお、ニラの単為生殖性は、単為生殖因子と複相大孢子形成因子との2つの因子により構成されるため(diplospory型)、2つの連鎖マーカーの検出が必要になります。

単為生殖因子はPCR後の電気泳動による目的バンド(マーカーA:148bp)の有無、複相大孢子形成因子はPCR後のフラグメント解析による目的ピーク(マーカーB:267nt)の有無で確認しました。

図1：ニラの単為生殖性

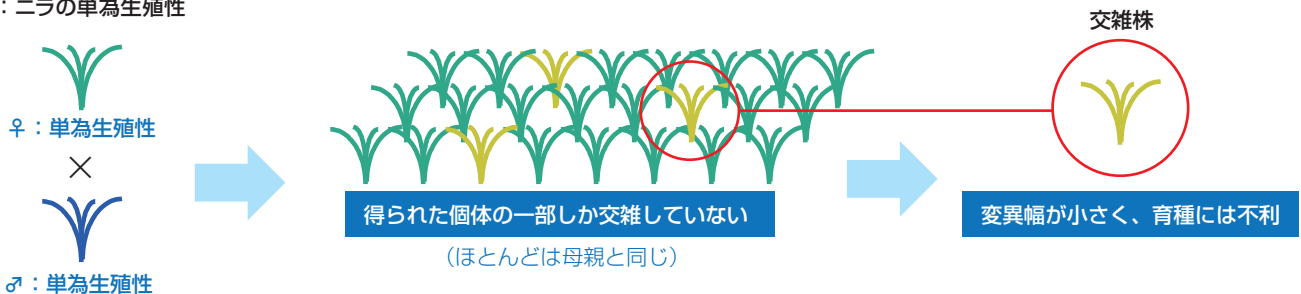
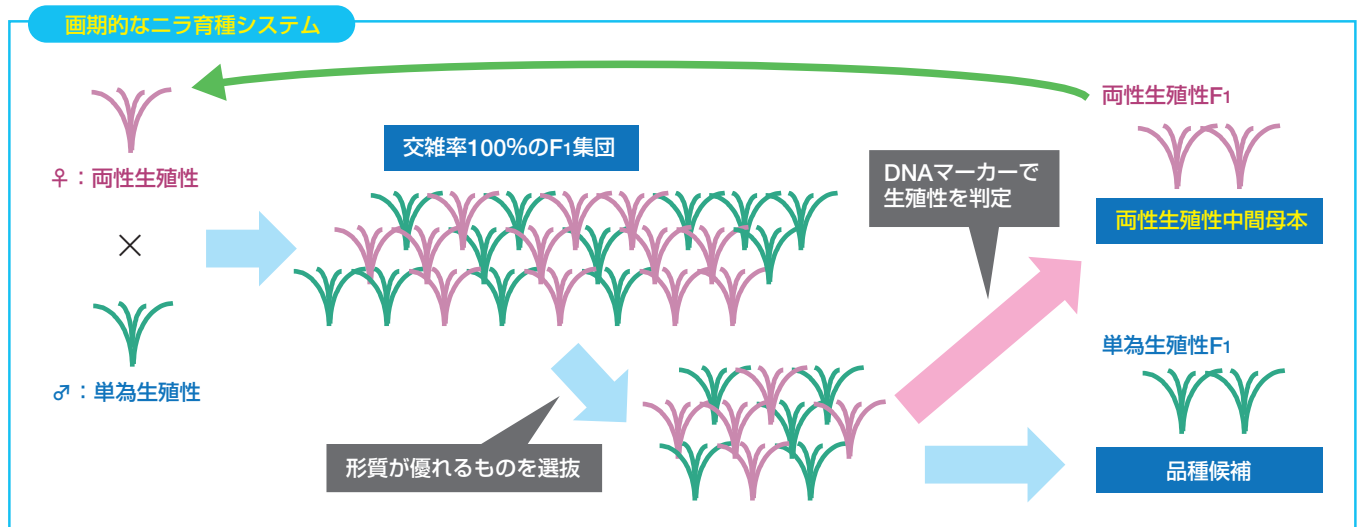


図2：画期的なニラ育種システム(両性生殖性ニラおよびニラ単為生殖性識別DNAマーカーの利用)



【参考文献】

- 1) 中澤佳子・生井 潔・小島昭夫・小林俊一・田崎公久・天谷正行 (2006) 四倍体ニラにおける単為生殖性の遺伝様式. 育種学研究 8: 89-98.
- 2) 天谷正行・中澤佳子・松本紀子・飯村一成 (2010) バルクセグレガント法によるニラ四倍体 (Allium ramosum, syn. A.tuberosum 2n=4x=32) の単為生殖性連鎖マーカーの開発 育種学研究 12: 73-80

方法と結果

- 初発サンプルの種類と量：
葉身 約3～5mg (幅1mm強×5～6mm程度)
- DNA抽出方法：TPS法 (右フロー参照)
- 溶出液量：100μl
- 概ねのDNA濃度：10ng/μl
- 単為生殖性識別DNAマーカー：
 - ① マーカー A：単為発生性連鎖マーカー
 - ② マーカー B：複相大孢子形成性連鎖マーカー

ニラセル苗における簡易DNA抽出法 (TPS法)

- ① 96穴PCRプレートにステンレスビーズを入れる (1穴：2個)。
- ↓
- ② TPSバッファー [10mM EDTA (pH8.0), 1M KCl, 100mM Tris-HCl (pH8.0)] を125μlずつ加える
- ↓
- ③ ピンセットで葉身 (5mm×1mm程度、重さ約3～5mg) をサンプリングする。
- ↓
- ④ 96穴PCRプレート用マット (液が漏れない物) で蓋をする。
- ↓
- ⑤ ビーズクラッシャーで破碎する。
- ↓
- ⑥ 4,800rpmで10分間遠心する。
- ↓
- ⑦ 上清50μlとり、新しい96穴PCRプレートに移す。
- ↓
- ⑧ イソプロパノール50μlを加えて混和する。
- ↓
- ⑨ 4,800rpmで20分間遠心した後、上清を捨てる。
- ↓
- ⑩ 10分間エバポレーターで乾燥させる。
- ↓
- ⑪ TE・RNase 100μlを加え、37°Cで30分間インキュベートする。

ニラ生殖性判定

① 単為発生性連鎖マーカー (マーカー A)

1) PCR反応液組成

5x MyTaq Reaction Buffer	2.0	μl	
primerA-F (10μM)	0.333	μl	
primerA-R (10μM)	0.333	μl	
primerPC-F (10μM)	0.067	μl	*PC：ポジティブコントロール
primerPC-R (10μM)	0.067	μl	
MyTaq DNA Polymerase	0.05	μl	
DW	6.15	μl	
DNA 溶液	1.0	μl	
Total	10	μl	

2) PCR装置：GeneAmp®PCR system9700 (Applied Biosystems)

3) PCRプログラム

95°C	3分	} ×10 サイクル (*-0.2°C/サイクル)
95°C	15秒	
61°C*	15秒	
72°C	15秒	
95°C	15秒	} ×25 サイクル
59°C	15秒	
72°C	15秒	
72°C	30秒	

4) 増幅サイズ

単為発生性連鎖マーカー A (PLM4)：148bp

PC：約590bp (GelRedによるプレステインのため、泳動像ではサイズが大きく見える)

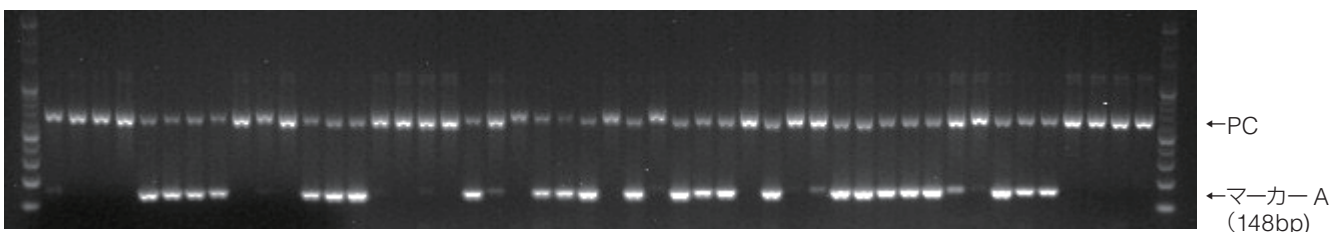
5) 電気泳動条件

マーカー：100bp DNA ladder

1xTBE buffer、1.5% agarose gel、3/100,000量のGelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (コスモバイオ社)、100v、45min.、

PCR産物5μlをアプライ

6) 電気泳動像





② 複相大孢子形成性連鎖マーカー (マーカー B)

1) PCR反応液組成

5x MyTaq Reaction Buffer	2.0 μ l
primerB-M13Rv-F (0.4 μ M)	1.0 μ l
primerB-R (1.6 μ M)	1.0 μ l
蛍光 primerM13Rv-Dye4 (8 μ M)	0.1 μ l
MyTaq DNA Polymerase	0.05 μ l
DW	4.85 μ l
DNA 溶液	1.0 μ l

Total	10 μ l
-------	------------

2) PCR装置: GeneAmp®PCR system9700 (Applied Biosystems)

3) PCRプログラム

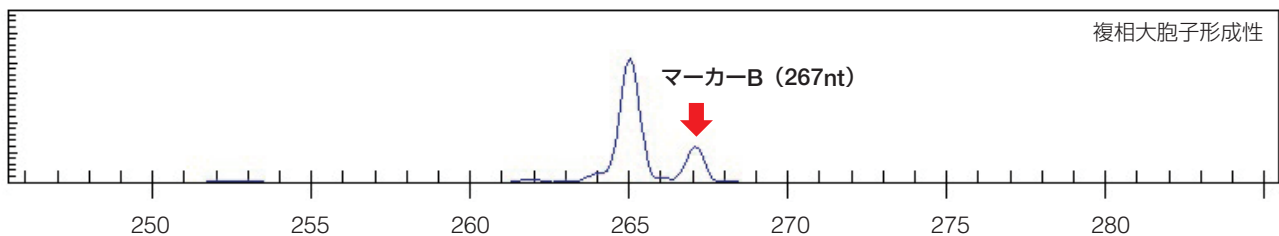
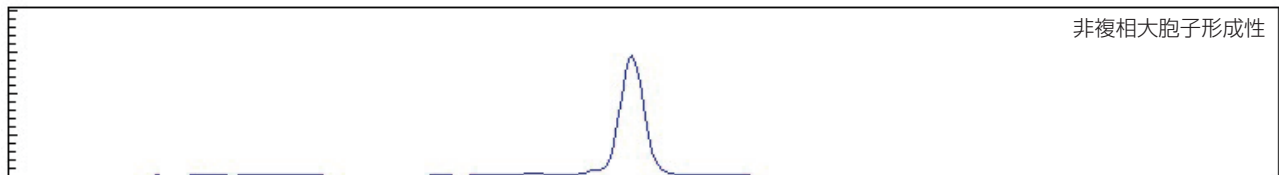
94°C	5分	} ×30 サイクル
94°C	30秒	
56°C	45秒	
72°C	45秒	
94°C	30秒	} ×8 サイクル
53°C	45秒	
72°C	45秒	
72°C	7分	

4) 増幅サイズ

複相大孢子形成性連鎖マーカー B (nr2902_267) : 267nt

5) マーカー検出例

シーケンサー: GenomeLab GeXP (BECKMAN COULTER)



お客様のコメント

我々の研究室では、MyTaq DNA Polymeraseを通常使いのPCR酵素として使用しています。本酵素を選定するに当たり、複数の酵素を比較し、増幅のしやすさや結果の安定性、操作性の良さ、価格等について考慮して総合的に判断しました。パート職員もPCRを実施するため、比較的熟練度が低い人でも安定して結果が得られることが重要となりますが、これまで問題無く、満足した結果が得られています。