

カメ目（カメ類）用ユニバーサルプライマーの開発

大阪府立園芸高等学校バイオサイエンス科バイオ研究部 二年 比嘉ことこ

【研究の経緯】

- 外来生物の繁殖が進み、環境DNAによる検出技術がすすんできた。
- 2020年バイオ研究部で環境DNA分析による池田市の生物環境調査のためのプロジェクトがスタートし、NCBIデータベースを利用した外来等異種共通検出プライマーの検討を行い、複数の分類群についてユニバーサルプライマーを設計した。
- このプロジェクトの一環としてクサガメやアカミガメなどの外来種と在来種であるニホンイシガメの検出のために爬虫綱カメ目（カメ類）のCOI領域を対象としたユニバーサルプライマーが設計された。

【研究の目的】

- カメ目用に設計したユニバーサルプライマーの性能を検証するとともに、環境DNAに対する作用について検証する。
- 環境DNA分離法として考案したガラスフィルターやアルコールを使用しない高速遠心分離法を試行し、その有用性を検証する。

【材料】

環境緑化科ピオトープ部が飼育するニホンイシガメ、クサガメおよびその飼育水槽水を使用した。

カメ目用に設計したユニバーサルプライマー
 F側プライマー 5' atagtaggcacagcattaagtatt3'(Tm 59)
 R側プライマー 5' gtagtatttagttctgctgt3'(Tm 59)



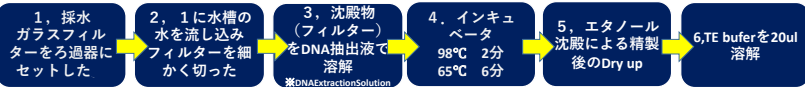
図1. 本実験に供試したニホンイシガメとクサガメ

【方法】

- カメ体表からのDNA抽出
 前後肢付け根に綿棒をすりつけ、DNA Extraction Solution (Lucigen社)を使用し、抽出した。(65°C 6分、98°C 2分、on ice 5分、エタノール沈殿精製)

- カメ飼育水槽水からの環境DNA抽出

【ガラスフィルター濾過法】



【高速遠心分離法】



- PCR増幅

KOD FX(東洋紡株式会社)のDNA合成酵素を使用した。反応液の組成を右の表に示した。温度サイクルは、「94°C2分、<98°C30秒、55°C60秒、70°C60秒> 2.5 サイクル、80°C7分」で行った。

表1. PCR反応液の構成

反応液材料	X1
H ₂ O	5 uL
2xbuf	12.5uL
KOD FX	0.5uL
プライマー-F	0.5uL
R	0.5uL
dNTPs	5 uL
テンプレート	1uL

- アガロースゲル電気泳動

TAE x1bufを用い調整した1.5%アガロースゲルを使用し、100V30分電気泳動で行った。

- シーケンス分析

PCR産物をEDTAとエタノールを用いて精製し、蛍光標識反応液調整し、オートシーケンサーで塩基配列を分析した。得られた塩基配列は、NCBIのCLUSTALWを用いて整理、比較した。

【結果】

カメ飼育水槽水からのDNA抽出について抽出原液のDNA濃度を図2に示した。

シーケンス分析の結果、得られた配列を比較したところ、クサガメとニホンイシガメの間に変異箇所が23箇所あった(図3)。

変異箇所の蛍光標識シグナルの比較を図4に示した。

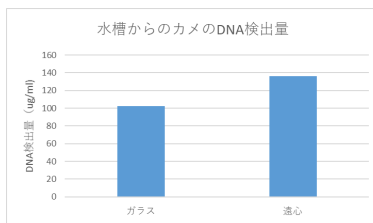


図2. 飼育水槽水から得られたDNA抽出原液のDNA濃度

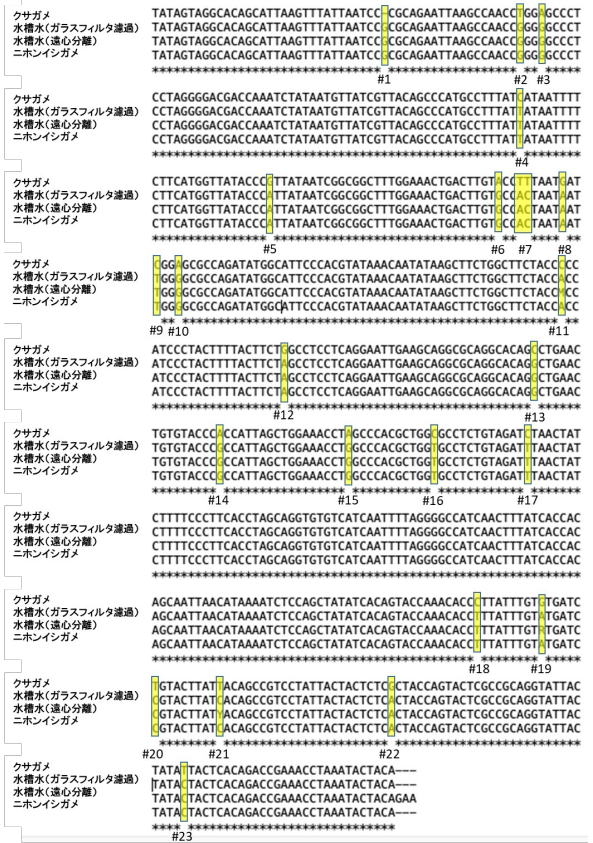


図3. 本研究で開発したカメ目COI領域ユニバーサルプライマーを用いたダイレクトシーケンシングで分析したイシガメ、クサガメ、同飼育水槽水(環境DNA)の塩基配列と23の変異箇所

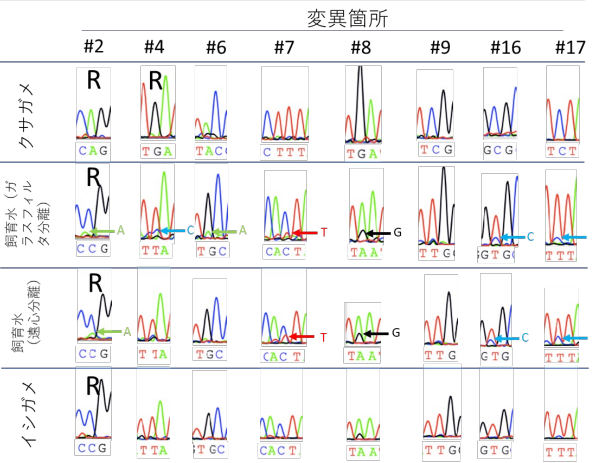


図4. 本研究で開発したカメ目COI領域ユニバーサルプライマーで検出されたイシガメ、クサガメ、水槽水(環境DNA)のCOI領域8変異箇所の検出波形
 R: リバース側検出波形
 ←: 飼育水のクサガメ型配列微弱シグナル

【まとめ】

- 開発したユニバーサルプライマーは有効に機能した。
- 高速遠心機を用いた環境DNAの抽出は、ガラスフィルター法よりも効率的にDNAを収集できた。
- DNAが混在する環境DNA分析には、ユニバーサルプライマーを用いたカメ類の生息確認後、種識別プライマーを適用することで効率的な調査が実現するといえる。

【参考文献】

環境DNA分析技術の外来種対策への応用印旛沼カミツキガメを例として、山川央・宮正樹