

Lindque, P. K, R. P. Harris, M. B. Jones and G. R. Smerdon (1999)
Simple molecular method to distinguish the identity of *Calanus* species (Copepoda:
Calanoida) at any developmental stage
Marine Biology 133: 91-96

全発育段階における *Calanus* 種 (Copepoda: Calanoida) を査定する簡単な分子生物学的手法

カイアシ類 *Calanus* 属 4 種 (*C. helgolandicus*, *C. finmarchicus*, *C. glacialis*, *C. hyperboreus*) は北大西洋において動物プランクトンバイオマスの大部分を占めており、海洋食物網の一次生産者の消費者として、また、魚類等の餌生物として重要な役割を果たしている。これら *Calanus* 属 4 種は形態学的に互いに類似しており、特に幼生、コペポダイト初期の個体について種査定は非常に困難である。形態学的に種の識別が困難な場合、遺伝的な特徴が有効となる場合がある。これまでの研究で、これら *Calanus* 属 4 種のミトコンドリア DNA 遺伝子 16S rDNA の塩基配列に明確な種間差があることが知られている。本研究は、これらの結果を基礎として、これら *Calanus* 属 4 種の全発育段階の個体や体の一部を用いて種査定の有効性を検討し、より簡単で低コストの分子生物学的手法を開発したものである。

ネット曳きにより採集した *C. helgolandicus*, *C. finmarchicus*, *C. glacialis*, *C. hyperboreus* の 4 種の個体を、12 時間以内に無水エタノールで保存した。チューブに蒸留水 0.5ml と個体を入れ、脱エタノール後蒸留水を捨て、超純水 34 μ l と、10 \times Dynazyme Buffer 5 μ l を入れた。個体を擦り潰し、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした後、2mM dNTPs を 5 μ l、16SAR、16SB2R をそれぞれ 2.5 μ l、Dynazyme を 2 U 加えた。自動遺伝子サーマルサイクラーを用いて 16S rDNA の増幅を行った。増幅反応産物 10 μ l を反応の有効性を検定するため、1.5% アガロースゲルで電気泳動を行った。制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析のための最適な酵素を決定するために、増幅した 16S rDNA 断片を *Calanus* 属 4 種それぞれにおいてシークエンスした。制限塩基地図から、4 種それぞれに特異的に反応する適切な酵素を選択した。増幅産物 15 μ l に 15 M NaCl 0.5 μ l、牛血清アルブミン 2 μ l、制限酵素 5 U 添加し制限反応を行った。反応生成物を 2% アガロースゲルで電気泳動にかけ、ゲルを UV イルミネーターで観察し、写真を撮影した。

16S rDNA 増幅は 4 種全ての成体、コペポダイト期、ノープリウス期、卵、体の一部について成功し、16S rDNA のこの増幅領域における塩基配列を決定した。16S rDNA の増幅と RFLP 分析から、おのこの種の特徴パターンを作成し、確実に種を識別することが可能となった。この手法は、卵を含む全発育段階の個体だけでなく、その触角、付属肢、尾部など、体の一部分でも種の識別が可能である。また、この分子生物学的手法は低コストで簡単に行うことができ、信頼性が高いと結論づけられている。

阪本之暢

次回 (9/19) は西部・松山・山本の三氏にお願いしています。