

Notice on Plankton Seminar

#19003

09:30-12:00, 20 May (Mon.) 2019 at room # W103

国立科学博物館筑波研究施設植物研究部において開催された DNA 解析勉強会の報告

私の博士研究では、動物プランクトン食物網の詳細な解明というサブテーマを設けている。このサブテーマでは、北極海の動物プランクトン食物網を安定同位体、胃内容物の環境 DNA および顕微鏡観察を行い詳細に解明することを目的とする。私は 2019 年 5 月 12 日-5 月 17 日にかけて国立科学博物館筑波研究施設植物研究部の辻彰洋博士および仲村康秀特別研究員の下に滞在し、DNA 解析勉強会に参加することで、胃内容物の環境 DNA 解析に必要な手法である DNA メタバーコーディングについて学んだ。本勉強会では試料の単離、DNA 抽出、PCR、電気泳動を行った。またアライメント、種同定は、すでにシーケンスにより得られているデータを用いて行った。本勉強会で行ったことを簡潔に以下に示す。

【単離および DNA 抽出】

この過程は試料中から目的の生物を選び、コンタミネーションが発生しないように DNA を抽出することが目的である。エタノール固定試料中のカイアシ類を数個体選び、各個体の片方の触角をピンセットで取り外した後、滅菌ナイフで小さな一片にした。カイアシ類の本体は MQ で脱塩を行い、エッペンチューブに入れて凍結保存した。触角片はマイクロピペットを用いて吸引し、MQ で数回洗浄を行った後に、GITC バッファー入りのエッペンチューブに添加した。このエッペンチューブは -80°C で 1 晩放置した後に、ヒートブロックで 70°C まで過熱し、温度ショックによって細胞破碎を行った。その後、遠心分離器にかけて内容物を沈殿させ、上澄みをマイクロピペットで静かに取り除き新しいエッペンチューブに移した。この上澄みにイソプロパノールを添加し、攪拌後、簡易遠心を行い -20°C で 1 晩保存した。エッペンチューブを遠心分離し、マイクロピペットにて上澄みの除去を行った後に、70% エタノールを静かに添加し、再び遠心分離を行った。再度上澄みの除去を行い、エッペンチューブの蓋を開けたままタッパーに入れて放置し、完全にエタノールを揮発させた。後に TE を添加し、攪拌後に簡易遠心を行い室温で 1 時間ほど放置した。

【PCR および電気泳動】

PCR では抽出した DNA を増幅させることが目的である。エッペンチューブに MQ、バッファー、プライマーおよび酵素をそれぞれマイクロピペットで規定量添加し、8 連チューブにそれぞれ分注した。8 連チューブそれぞれに DNA 抽出を行ったゲノムを添加しピペッティングをよく行った。これを PCR 装置にセットし、DNA の増幅を行った。電気泳動は PCR にて DNA が正確に増幅されているかを確認することが目的である。TAE とアガロースを混ぜ合わせて電気泳動用の型に流し込み、電気泳動用ゲルを作成した。泳動プレミックスと PCR 産物を混ぜ合わせ、マイクロピペットを用いてアガロースゲル上の穴に静かに流し込んだ。これを 100 V にて電気泳動を行い、PCR 産物が精製されているかを確認した。

【アライメントおよび種同定】

この過程ではシーケンスにより得られた様々な断片的な塩基配列をつなぎなおす作業を PC 上で行った。そこから得られた塩基配列を NCBI にて塩基配列検索を行い、種同定を行った。

今回の勉強会では DNA 解析における操作方法や原理、用語など基本的なものを学ぶことができた。また最終日に遺伝子分野のセミナーに参加し、内容を理解することができ勉強会の成果を感じた。さらに同所で研究を行っている他分野の先生方や大学院生と意見交換などの議論ができ非常に有意義な時間を過ごすことができた。今後は DNA 分野に関して、乗船時の研究計画を綿密に練るとともに、理論などをさらに深く理解するために勉強を行う予定である。

徳弘航季