

# カイアシ類 1 個体からの DNA 抽出方法の改良とホルマリン固定期間がミトコンドリア遺伝子の PCR 増幅に与える影響

小林真輝<sup>1)</sup>、高山佳樹<sup>2)</sup>、下出信次<sup>3)</sup>、戸田龍樹<sup>1)</sup>、黒沢則夫<sup>1)\*</sup>

1) 創価大学大学院理工学研究科 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

2) 創価大学プランクトン工学研究所 〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

3) 横浜国立大学大学院環境情報研究院附属臨海環境センター 〒259-0202 神奈川県足柄下郡真鶴町岩 61

## Improvement of the extraction of DNA from single copepod samples and the effect of formalin fixation time on the PCR amplification of a mitochondrial gene

Maki Kobayashi<sup>1)</sup>, Yoshiki Takayama<sup>2)</sup>, Shinji Shimode<sup>3)</sup>, Tatsuki Toda<sup>1)</sup>, Norio Kurosawa<sup>1)\*</sup>

1) Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

2) Institute of Plankton Eco-Engineering, Soka University, 1-236, Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

3) Manazuru Marine Center for Environmental Research and Education, Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, 61 Iwa, Manazuru, Kanagawa 259-0202, Japan

\* Corresponding author: kurosawa@soka.ac.jp

2022 年 5 月 1 日受付, 2022 年 5 月 23 日受理

**Abstract** Considerable skill is required to identify copepods at the species level based on their morphological characteristics. However, DNA analysis does not require advanced microscopy techniques and provides objective data on the phylogenetic relationships between samples. Therefore, DNA analysis is useful as an alternative method for taxonomic studies of copepods. The lysis buffer method by Lee & Frost (2002) is a simple protocol for extracting DNA from single copepod samples. In this method, a fixative, such as formalin, is first replaced with ethanol and a buffer solution. Then, the copepod sample is lysed in the lysis buffer containing a proteolytic enzyme. Thus far, we have conducted DNA extraction of single copepod samples using this method and performed gene amplification by PCR. However, due to the low success rate of PCR amplification, genetic data could not be obtained for approximately 50% of the formalin-fixed samples. In this study, we improved the lysis buffer method with the aim of enhancing the success rate of DNA extraction and PCR amplification from single copepod samples. In addition, the effect of formalin fixation time on PCR amplification was also examined.

Zooplankton samples were collected from Manazuru Port, Sagami Bay on September 14, 2017, using a plankton net with a mesh size of 180  $\mu$ m and fixed with 5% neutralized formalin-seawa-

ter. Adult females of the calanoid copepod *Acartia japonica* were selected from these samples and stored individually in ethanol. DNA was extracted from these copepods via a modified ethanol removal method, with adjustments made to the dilution of the lysis buffer, and incubation time. The mitochondrial cytochrome b gene was amplified from these DNA samples by PCR. When the concentration of the PCR product was  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  or more, PCR amplification was considered to be successful. Based on the conditions optimized by the above studies, the effect of the formalin fixation time on the PCR amplification of copepods was also investigated.

A higher success rate was obtained when natural drying or vacuum drying was performed to remove ethanol during DNA extraction rather than removal by pipetting. Since there was no significant difference between the results of natural drying and vacuum drying, natural drying, which is easier to perform, was selected as the optimum method. We also confirmed that a high success rate was maintained without diluting the lysis buffer after the inactivation of proteolytic enzyme. Regarding the incubation time for lysis, changing from the conventional 60 minutes to 30 minutes did not result in a significant decrease in the success rate of PCR amplification. Thus, the success rate of PCR increased to approximately 90%. Additionally, compared with the conventional lysis buffer method, the number of steps was reduced by half, and the required time was shortened from 1.5 hours to approximately 50 minutes. Furthermore, we confirmed that this improved lysis buffer method can be applied to single cells of small protozoa such as flagellates and ciliates. The effect of formalin fixation time on PCR amplification of the mitochondrial cytochrome b gene after DNA extraction via this improved lysis buffer method was investigated. As expected, the success rate of PCR amplification decreased with the formalin fixation time. However, when the fixation period was within 1 month, PCR products with a concentration of more than  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  were obtained in 95% of the individual copepod samples. Furthermore, even after 3 months, similar concentrations of PCR product were obtained in 80% of individuals.

Genetic analysis of small zooplankton is increasingly important not only in taxonomy but also for biodiversity and phylogeographic studies. The data presented in this study will be very important and useful in such studies.

**Keywords:** copepod, DNA extraction, formalin, lysis buffer, PCR amplification

---

## 1. 序論

カイアシ類は、甲殻亜門カイアシ亜綱に属する体長が0.3 mmから10 mmほどの小型甲殻類である。現在9目8000種以上が記載され、浮遊性や底生性種の他、魚類や無脊椎動物に寄生する種も存在する (Boxshall & Halsey 2004)。極域を含む世界中の海洋と淡水域のほか、一部は陸上の土壌中など幅広い環境中に生息し

ている (Razouls et al. 2005-2022)。また、海洋に生息するカイアシ類の生物量は、海洋動物プランクトン全体の約8割を占めていると言われており (Mauchline 1998)、魚類や肉食性動物プランクトンの主要な餌となっている。同時に多くのカイアシ類は植物プランクトンを摂餌することから、食物連鎖において一次生産者と高次消費者をつなぐ重要な役割を担っている (Mauchline 1998)。さらに前述の寄生性カイアシ類は養殖魚の健康に悪

影響を与える一方で (Johnson et al. 2004)、仔稚魚の優れた餌として注目されているカイアシ類も存在する (Støttrup 2003)。このようにカイアシ類は、水圏生態学および水産学両分野で重要視される生物として、分類学的研究や生態学的研究が盛んに行われている。

一般に、カイアシ類の分類学的研究は顕微鏡を用いた形態観察によって行われてきた (Bradford-Grieve 2010)。しかしながら、小型な種が数多く存在し、そのような種では特徴的な部位を判別し難い (Hirai et al. 2013) ことや、形態がよく似た種も多く存在することから、種レベルの同定や分類を行うには相当の経験を必要とし、研究者によって結果が異なる可能性も含んでいる。一方 DNA 解析は高度な手技を必要とせず、個人差が生じ得ない塩基配列に基づいて評価を行うためより客観的である。また、属や種間ではもとより種内の進化系統関係を定量的に推測することも可能である。これらのことから、DNA 解析はカイアシ類の新たな分類方法として近年広く利用されるようになってきた (Goetze 2005, Hirai et al. 2015, Cornils et al. 2017)。

DNA 解析を行うためにはまず DNA を抽出する必要があるが、この方法の 1 つとして Lysis buffer 法がある (Lee & Frost 2002)。この方法は、カイアシ類 1 個体から DNA を抽出する方法として報告されたもので、まずホルマリンなどの固定液をエタノールに置換し、次にエタノールをピペッターで取り除く。その後タンパク分解酵素を含む Lysis buffer 中でカイアシ類の個体を部分的に溶解し、最後にタンパク質分解酵素を失活させて DNA 試料とする。当研究室ではこれまで、この Lysis buffer 法を用いてカイアシ類の DNA 抽出を行ってきた。しかしながら、PCR 増幅までの成功率が 50% 程度と低く、分析に使用した個体の多くが無駄になってしまうという問題があった。成功率が低い原因として、エタノールの残存や溶解効率の低さも考えられたが、ピペティング操作に伴う個体の喪失も大きな原因と考えられた。本研究では、カイアシ類 1 個体からの DNA 抽出と PCR 増幅までの成功率を 100% に近づけることを目的として、Lysis buffer 法における各工程の条件について再検討を行うとともに

に、工程全体の簡略化を試みた。加えて、試料採集から DNA 抽出までの期間を様々に設定することにより、ホルマリン固定期間がカイアシ類の遺伝子の PCR 増幅に及ぼす影響についても検証した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 試料採集

2017 年 9 月 14 日に相模湾真鶴港 (35°09'N, 139°10'E) において目合 180  $\mu\text{m}$ 、口径 30 cm のプランクトンネットを用いて動物プランクトンを採集し、5% 中性ホルマリン海水で固定した。このバルク試料から、実体顕微鏡下で *Acartia japonica* (Calanoida 目、Acartia 科、*Acartia* 属、*Odontacartia* 亜属) の雌成体を選別した。DNA 抽出方法の改良に用いた個体は、シャーレに取った少量の純水に短時間浸漬した後、あらかじめ 0.2 mL の PCR 用チューブに分注された 99.5% エタノール 50  $\mu\text{L}$  中に 1 個体ずつ浸漬し、DNA 抽出を行うまで 4°C で保存した。ホルマリン固定期間の影響を調べた実験では、設定した固定期間 (2-4 参照) が経過した後純水洗浄とエタノール置換を行い、同様の方法で保存した。

### 2-2. DNA 抽出方法の検討

Lysis buffer 法 (Lee & Frost 2002) をもとに、エタノール除去方法および Lysis buffer の量と溶解時間を変えて DNA を抽出し、得られた DNA を鋳型として PCR 増幅を行い、その結果に基づいて各工程の最適条件を決定した。併せて行程の簡略化を行った。Lysis buffer の組成は、原報と同じく 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5% Tween 20、50 mM KCl、20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Proteinase K とした。1 実験区につき 20 個体を用いた。

#### 2-2-1. エタノール除去方法

エタノール浸漬試料から、ピペッターを用いてエタノールを除去した。この時、*A. japonica* 個体を誤って吸い取ってしまうことを避けるため、完全にエタノールを除去せず、5  $\mu\text{L}$  程度のエタノールはチューブに残し

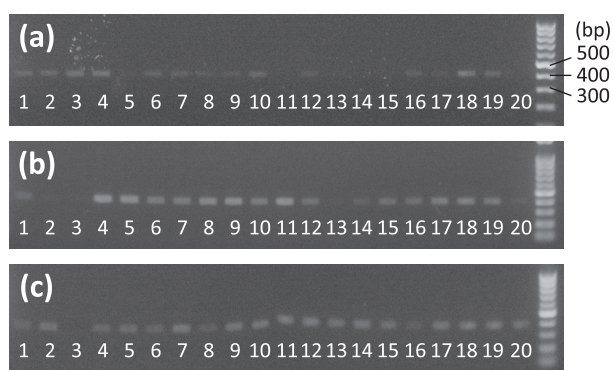
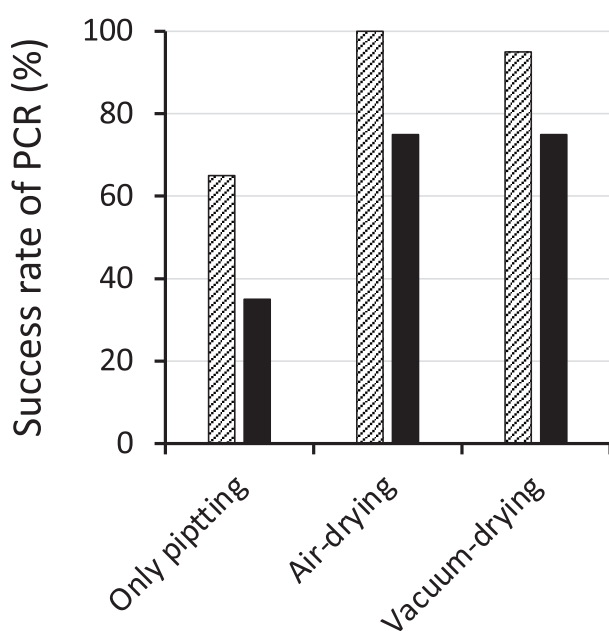


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products in the study of ethanol removal methods. Ethanol was removed from the ethanol-soaked copepod samples by (a) pipetting only, (b) pipetting and natural drying, and (c) pipetting and vacuum drying. Twenty *A. japonica* individuals were used for each condition. After the PCR amplification of mitochondrial cytochrome b gene, 2  $\mu$ L of the reaction solution was electrophoresed.



### Etanol removal method

Figure 2. Success rate of PCR amplification in the study of ethanol removal methods. The proportion of individuals with confirmed PCR products are shown in hatched columns, and with PCR product concentrations of 20 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> or higher are shown in black columns.

た。この試料を3つの条件、すなわち1)そのまま、2)クリーンベンチ内で10分風乾、3)遠心濃縮機を用いて10分真空乾燥した。Lysis bufferを20  $\mu$ L加え、65°Cで60分保温して個体を溶解した後、95°Cで15分保温してProteinase Kを失活させた。最後に滅菌水で5倍希釈したものをDNA抽出液としてPCR増幅の鋳型に用いた。

### 2-2-2. Lysis buffer 量と溶解後の希釈の効果

エタノール浸漬試料から、ピペッターを用いてエタノールを9割程度除去した後、チューブのふたを開けた状態で10分風乾しエタノールを完全に揮発させた。この試料について次の2つの条件でDNA抽出を行った。1)2-2-1に記載した条件で冷凍保存まで行った。2)Lysis bufferを100  $\mu$ L加え、65°Cで60分保温して個体を溶解した後、95°Cで15分保温してProteinase Kを失活させた。これを滅菌水による希釈無しにDNA抽出液としてPCR増幅の鋳型に用いた。

### 2-2-3. 溶解時間

エタノール浸漬試料から、ピペッターを用いてエタノールを9割程度除去した後、チューブのふたを開けた状態で10分風乾しエタノールを完全に揮発させた。Lysis bufferを100  $\mu$ L加え、65°Cで0～60分保温して個体を溶解した後、95°Cで15分保温してProteinase Kを失活させた。これをDNA抽出液としてPCR増幅の鋳型に用いた。

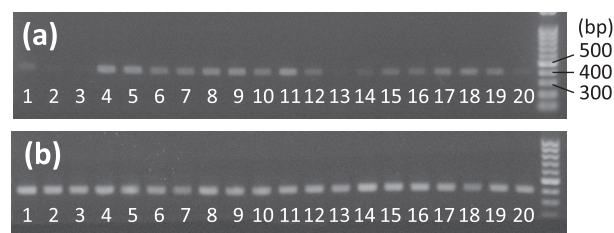


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products in the study of volume and dilution of lysis buffer. Twenty *A. japonica* individuals were lysed in (a) 20  $\mu$ L of the lysis buffer and diluted 5 times with sterile water, or (b) 100  $\mu$ L of the lysis buffer (no dilution). After the PCR amplification of mitochondrial cytochrome b gene, 2  $\mu$ L of the reaction solution was electrophoresed.



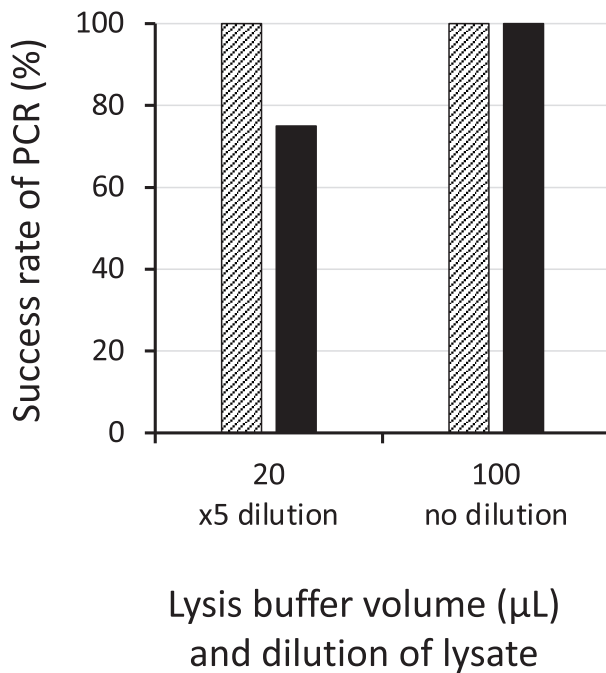


Figure 4. Success rate of PCR amplification in the study of volume and dilution of lysis buffer. The proportion of individuals with confirmed PCR products are shown in hatched columns, and with PCR product concentrations of  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  or higher are shown in black columns.

### 2-3. PCR 増幅と塩基配列解析

#### 2-3-1. PCR 増幅

2-2. で得られた DNA 抽出液を鋳型として、PCR 法によりミトコンドリアの cytochrome b 遺伝子 (mt-cytb) の部分領域を増幅し、2% アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の確認と定量を行った。PCR プライマーには、151F (5'-TGTGGRGCNACYGTWATYACTAA) および 270R (5'-AANAGGAARTAYCAYTCNGGYTG) (Milligan et al. 2011) を用いた。PCR 反応液 (全量  $25 \mu\text{L}$ ) の組成は、鋳型 DNA  $1 \mu\text{L}$ 、 $2 \times$  PCR プレミックス試薬 (EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix、タカラバイオ株式会社)  $12.5 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{M}$  Forward および Reverse プライマーをそれぞれ  $2.5 \mu\text{L}$ 、滅菌水  $6.5 \mu\text{L}$  とした。反応液をサーマルサイクラーにセットし、初期変性 ( $94^\circ\text{C}$ 、3 分)、[変性 ( $94^\circ\text{C}$ 、30 秒)、アニーリング ( $50^\circ\text{C}$ 、30 秒)、伸長 ( $72^\circ\text{C}$ 、1 分)] を 35 サイクル、最終伸長

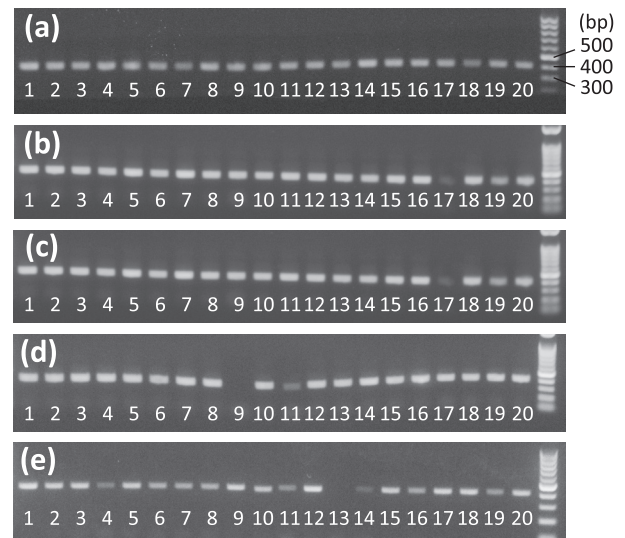


Figure 5. Agarose gel electrophoresis of PCR products in the study of incubation time for lysis. Twenty *A. japonica* individuals were lysed in  $100 \mu\text{L}$  of the lysis buffer for (a) 60, (b) 45, (c) 30, (d) 15, and (e) 0 min. After the PCR amplification of mitochondrial cytochrome b gene,  $2 \mu\text{L}$  of the reaction solution was electrophoresed.

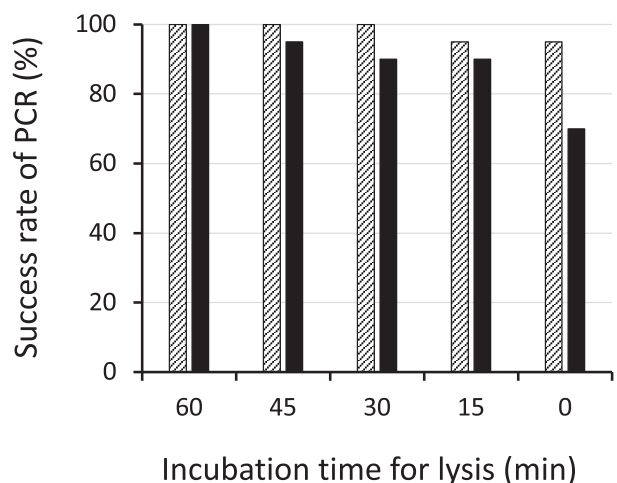


Figure 6. Success rate of PCR amplification in the study of incubation time for lysis. The proportion of individuals with confirmed PCR products are shown in hatched columns, and with PCR product concentrations of  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  or higher are shown in black columns.

(72℃, 3分) でPCR増幅を行った。PCR反応液2  $\mu$  Lを2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、増幅の有無とPCR産物の濃度を確認した。

### 2-3-2. 塩基配列解析

本実験で得られたPCR産物が塩基配列解析可能であること、ならびにカイアシ類の *mt-cytB* であることを確認するために、DNA抽出方法の検討における各実験区のサンプルから無作為に選んだ計6サンプルについて、PCR産物の塩基配列をサンガー法により解析した。得られた塩基配列について、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いてDNAデータベースに対する相同性検索を行った。

### 2-4. ホルマリン固定期間がPCR増幅に与える影響

試料採集後に5% 中性ホルマリン海水で固定したバルクサンプルを、2週間から12週間4℃で保存し、2週間毎に実体顕微鏡下で *A. japonica* の雌成体を20個体選別した。2-2.により最適化された改良Lysis buffer法を用いて1個体ごとにDNAを抽出し、前項に記載した方法にしたがって *mt-cytB* 遺伝子のPCR増幅と生成物の確認を行った。

## 3. 結果

### 3-1. DNA抽出方法の検討

Lysis buffer法によるDNA抽出条件の最適化を目指して、エタノール除去方法、Lysis bufferの量と溶解後の希釈、および溶解時間について検討した。評価の基礎データとしたPCR増幅産物の電気泳動写真をFig. 1, 3, 5に示した。またこの結果に基づいて計算した検討項目毎のPCR増幅の成功率をFig. 2, 4, 6に示した。

*Acartia japonica* 個体を浸漬したエタノールの除去方法について、ピペッターによる除去のみと、10分間の風乾または遠心濃縮乾燥を比較した結果をFig. 2に示した。ピペッターによる除去のみの場合、PCR産物が電気泳動により確認できたのは20個体中13個体(65%)で、そのうち20 ng  $\mu$  L<sup>-1</sup>以上のPCR産物が得られた

のは7個体(35%)であった。それに対して、風乾または遠心濃縮乾燥では、ほぼすべての個体においてPCR産物が確認され、いずれも15個体(75%)で20 ng  $\mu$  L<sup>-1</sup>以上のPCR産物が確認された。

Lysis bufferの量と溶解後の希釈の効果に関する検討の結果、Lysis buffer 20  $\mu$  L中でカイアシ類個体を溶解し蒸留水で5倍希釈した場合、20個体すべてにおいてPCR産物が確認されたが、20 ng  $\mu$  L<sup>-1</sup>以上のPCR産物が得られたのは15個体(75%)であった。それに対して、Lysis buffer 100  $\mu$  L中でカイアシ類個体を溶解し、蒸留水による希釈をしなかった場合は、20個体すべてにおいて20 ng  $\mu$  L<sup>-1</sup>以上のPCR産物が得られた (Fig. 4)。

Lysis bufferによる溶解時間の検討の結果、溶解時間が30分以上の場合、すべての個体においてPCR産物が確認された。そのうち20 ng  $\mu$  L<sup>-1</sup>以上のPCR産物が得られたのは、溶解時間60分で20個体(100%)、45分で19個体(95%)、30分で18個体(90%)であった。溶解時間を15分または0分にした場合は、19個体(95%)でPCR産物が確認され、20 ng  $\mu$  L<sup>-1</sup>以上のPCR産物が得られたのはそれぞれ18個体(90%)および14個体(70%)であった (Fig. 6)。

以上の結果から、Lysis bufferを用いたカイアシ類1個体からのDNA抽出の最適条件(改良Lysis buffer法)を次の通りとした (Fig. 7)。1) 個体を浸漬していたエタノールをピペッターで9割程度除いた後、10分風乾することによりエタノールを完全に揮発させる。2) Lysis bufferを100  $\mu$  L加え、65℃で30分保温することによりカイアシ類個体を溶解する。3) 95℃で15分保温することによりProteinase Kを失活させる。これをDNA試料として-25℃以下で冷凍保存する。

### 3-2. 塩基配列解析

DNA抽出方法の検討において得られたPCR産物6サンプル [Fig. 1 (b) 19、20、Fig. 5 (a) 4、11、(b) 11、12] について、サンガー法によりそれぞれ273 bpの塩基配列を決定した。6つの塩基配列は互いに100%

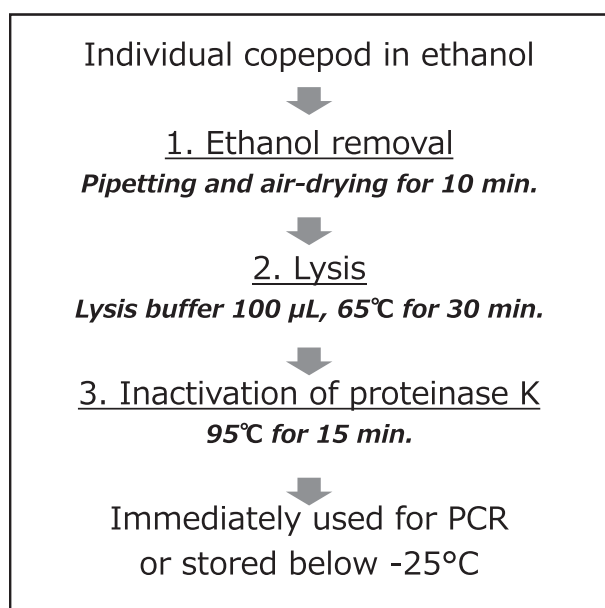


Figure 7. The protocol of improved lysis buffer method.

一致し、BLAST 検索の結果、*Acartia amboinensis* の mt-cytB (GenBank 登録番号: LC027648) の相同領域と 75.9% の相同性を示した。以上の結果から、本研究により抽出した DNA を鋳型として PCR 増幅された DNA は *Acartia* 属の mt-cytB であり、塩基配列解析にも使用できることを確認した。なお、現時点で *A. japonica* の mt-cytB は DNA データベースに登録されていない。

### 3-3. ホルマリン固定期間が PCR 増幅に与える影響

ホルマリン海水中、2 ～ 12 週間 4℃ で保存した個体について、3-1. に記した改良 Lysis buffer 法により DNA を抽出し、それらを鋳型として mt-cytB を PCR 増幅したときの電気泳動写真を Fig. 8 に示した。またこの結果に基づいて計算した PCR 増幅の成功率を Fig. 9 に示した。ホルマリン固定期間が 2 ～ 12 週間では、PCR 増幅が確認された個体数は 19 個体 (95%) 以上で有意差は認められなかった。ただし、20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  以上の PCR 産物が得られた個体数は、固定期間が 2 週間の時の 20 個体 (100%) から徐々に減少し、12 週間後では 16 個体 (80%) であった。

## 4. 考察

### 4-1. Lysis buffer 法の改良

序論でも述べた通り、DNA 解析には熟練を要する特別な手技は必要としないが、カイアシ類のような生物 1 個体から確実に DNA を抽出する場合には、微少なサンプルを扱うがゆえの不確実さが伴う。この点で Lysis buffer 法は、操作が比較的簡単かつ少ない工程によって構成されている良い方法である。しかしそれでも DNA 抽出から PCR 法による遺伝子増幅までの成功率は、少なくともわれわれの研究室では 50% 程度と低かったため、今回、各工程の条件の最適化と更なる工程の簡略化を試みた。

Lysis buffer 法 (原法と略す) では、エタノールの除去はバッファー交換により行われるが、本研究により確立した改良 Lysis buffer 法ではピペッターによる除去と風乾とした。これは、原法において少なくとも 2 回必要だったピペッターによる吸引を 1 回とすることで、カイアシ類個体を誤って吸引し喪失するリスクを減らすことが目的であった。ただし、エタノールは PCR 反応を阻害することが知られており (Rossen et al. 1992)、本研究においてもピペッターによる除去のみの場合には PCR 増幅の成功率が低下した。

カイアシ類個体の溶解に用いる Lysis buffer の量については、原法の 20  $\mu\text{L}$  から 100  $\mu\text{L}$  に増やしたことで、十分な増幅量 (20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) の PCR 産物が得られる割合がほぼ 100% となった。これは、Lysis buffer 量を増やしたことで、カイアシ類個体が確実に溶解液中に浸漬されたためであると考えている。当初、溶解後の純水による Lysis buffer の希釈は、Lysis buffer の 1 成分である界面活性剤 Tween 20 を薄めるために必須であると考えていたが、予備実験の結果から薄めなくとも PCR 増幅を阻害しないことが確認され、結果として工程数の削減につながった。

Lysis buffer による溶解時間は、原法の 60 分から 30 分に減じても、PCR 増幅の成功率に変化は無かったが、PCR 産物の濃度は溶解時間の減少とともに徐々に低下した。DNA の塩基配列解析には 5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  程度の試

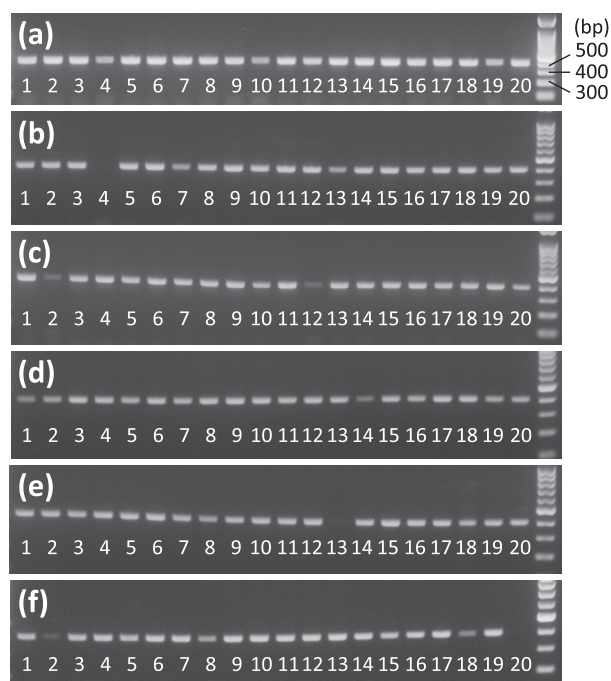


Figure 8. Agarose gel electrophoresis of PCR products in the study of the effect of formalin fixation time on PCR amplification. Zooplankton samples were collected and kept in 5% neutralized formalin-seawater for (a) 2, (b) 4, (c) 6, (d) 8, (e) 10, (f) 12 weeks. Twenty *A. japonica* individuals were selected from each fixed sample, and DNA was extracted by improved lysis buffer method.

料が  $10 \mu\text{L}$  あれば十分であるため、PCR 産物を直接塩基配列決定に供する場合は、溶解時間は 30 分で十分であると考えられる。一方、PCR 産物をプラスミドベクターなどにクローニングするような場合には、原法通り 60 分の溶解を行った方がよい。

以上の検討により、DNA 抽出から PCR 法による遺伝子増幅までの成功率をほぼ 100% にすることができ、同時に原法では約 1.5 時間であった全行程時間が約 50 分に短縮された。また、本研究により確立した改良 Lysis buffer 法を用いて、これまでに *Acartia japonica* の以外のカイアシ類 *Acartia steueri*、*Calanus sinicus*、*Clausocalanus arcuicornis*、*Dioithona oculata*、*Oithona similis*、*Oncaea venusta*、*Paracalanus parvus* s.l.、*Pseudodiaptomus nihonkaiensis*、*Tigriopus japonicus* の他、渦鞭毛虫

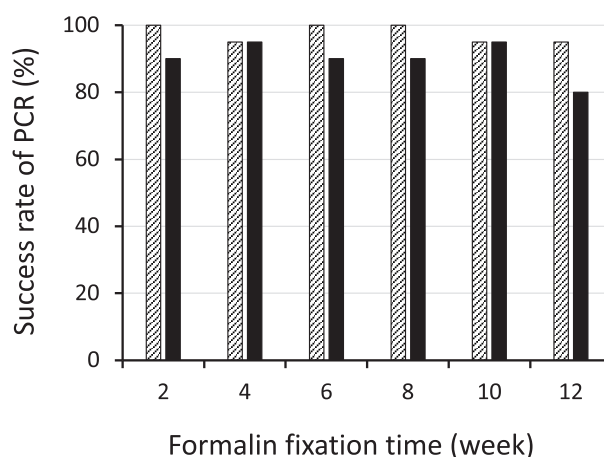


Figure 9. Success rate of PCR amplification in the study of the effect of formalin fixation time on PCR amplification. The proportion of individuals with confirmed PCR products are shown in hatched columns, and with PCR product concentrations of  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  or higher are shown in black columns.

*Gyrodinium rubrum*、*Gyrodinium heterogrammum*、*Noctiluca scintillans*、繊毛虫 *Euprotos vannus* についても、それぞれ 1 個体または 1 細胞からの DNA 抽出と PCR 法による遺伝子増幅に成功している。カイアシ類よりもさらに小さな単細胞原生生物においても適用できたことは、本法の汎用性と有用性を示すものである。

#### 4-2. ホルマリン固定期間が PCR 増幅に与える影響

ホルマリンは、生物個体や組織の形態を長期間保持する役割を担っているが、同時に DNA の構成単位であるヌクレオチドの共有架橋結合や不可逆的変性、修飾、断片化を起こすため (Chaw et al. 1980, Paäbo et al. 1989, Chang & Loew 1994)、DNA 解析のための生物試料の固定剤としては不向きであるとされてきた。また、DNA 自体の化学変化の他にも、DNA とタンパク質の架橋構造が形成され、その結果としてホルマリン固定試料からの DNA 抽出効率が著しく低下することも報告されている (Srinivasan et al. 2002)。このような問題を解決するため、ホルマリン固定試料からのさまざまな DNA 抽出方法が検討されてきた (Goelz



et al. 1985, Bucklin et al. 2004, Paireder et al. 2013)。中でも最近 Shiozaki ら (2021) は、長期間ホルマリン固定されたプランクトン試料から、DNA メタバーコーディングに用いることが可能な DNA の抽出方法を開発した。この方法は、試料を界面活性剤とタンパク質分解酵素を含む溶解液中でインキュベートし、その後、市販の DNA 抽出キットならびに DNA 修復キットを用いて精製 DNA を得るというものである。しかしながらこのような方法は、DNA メタバーコーディングのようにバルク試料を扱う場合には適用可能であるが、微小動物 1 個体あるいは原生生物 1 細胞から微量の DNA 抽出を行う場合には、その過程で個体や細胞、あるいは DNA を失うリスクが高い。したがって、本研究により確立した改良 Lysis buffer 法のような簡便な DNA 抽出法も依然として必要性が高く、そのような方法を用いた場合のホルマリン固定期間が PCR 増幅に与える影響を調べることは意味があると思われた。

本研究において、ホルマリン海水中で 2～12 週間 4℃ で保存した *A. japonica* の雌成体について、改良 Lysis buffer 法による DNA 抽出と PCR 法による遺伝子増幅を試みた結果、固定期間が 10 週間までは PCR 増幅の成功率に有意差は無く、12 週目に僅かながら阻害が見られた。航海による調査において試料採集を行うような場合においても、3 ヶ月以内に実験室に持ち帰りその後の処理が行える場合には十分 DNA 解析が可能である。ただし今回の研究において、PCR 増幅の対象領域が 300 bp 程度と短かったことには留意すべきである。ホルマリンによって DNA 鎖状にランダムに化学修飾が生じることを考えれば、PCR 増幅の対象領域が長くなるほど成功率が低下することが考えられる。そのような場合には、ホルマリン海水中で保存できる期間が本研究結果よりも短くなることが予想される。

## 5. 結論

本研究により、ホルマリン固定されたカイアシ類 1 個体から、簡便かつ高い成功率で DNA 抽出を行う方法

を確立した。またこの方法は、カイアシ類のみならず、渦鞭毛虫や繊毛虫などの原生生物 1 細胞にも適用可能であった。本法を用いてカイアシ類の DNA 抽出を行う場合、ホルマリン固定期間が 3 ヶ月程度までであれば、十分 PCR 法による遺伝子増幅が可能であることも確認された。微小動物プランクトンの遺伝子解析は、分類学のみならず、生物多様性解析や系統地理学的研究においてもますます重要になっている。本論文で報告した改良 Lysis buffer 法は、そのような研究にとって非常に有用であると考えられる。

## 引用文献

- Boxshall GA & Halsey SH (2004) An introduction to copepod diversity. Ray Society, London, 966 pp.
- Bradford-Grieve JM, Boxshall GA, Ah Yong ST, Ohtsuka S (2010) Cladistic analysis of the calanoid Copepoda. *Invertebr Syst* 24: 291–321.
- Bucklin A and Allen LD (2004) MtDNA sequencing from zooplankton after long-term preservation in buffered formalin. *Mol Phylogenet Evol* 30: 879–882.
- Chang Y-T and Loew GH (1994) Reaction mechanisms of formaldehyde with endocyclic imino groups of nucleic acid bases. *J Am Chem Soc*, 116: 3548–3555.
- Chaw YFM, Crane LE, Lange P, Shapiro R (1980) Isolation and identification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids. *Biochem* 19: 5525–5531.
- Cornils A, Wend-Heckmann B, Held C (2017) Global phylogeography of *Oithona similis* s.l. (Crustacea, Copepoda, Oithonidae) - A cosmopolitan plankton species or a complex of cryptic lineages? *Mol Phylogenet Evol* 107: 473–485.
- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B (1985) Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human-tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 118–126.
- Goetze E (2005) Global population genetic structure and biogeography of the oceanic copepods *Eucalanus hyalinus* and *E. spinifer*. *Evolution* 59: 2378–2398.
- Hirai J, Shimode S, Tsuda A (2013) Evaluation of ITS2-28S as a molecular marker for identification of

- calanoid copepods in the subtropical western North Pacific. *J Plankton Res* 35: 644–656.
- Hirai J, Tsuda A, Goetze E (2015) Extensive genetic diversity and endemism across the global range of the oceanic copepod *Pleuromamma abdominalis*. *Prog Oceano* 138: 77–90.
- Johnson SC, Treasurer JW, Bravo S, Nagasawa K, and Kabata Z (2004) A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool Stud* 43: 229–243.
- Lee CE, Frost BW (2002) Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae). *Hydrobiologia* 480: 111–128.
- Mauchline J (1998) The biology of calanoid copepods. *Adv Mar Biol* 33: 1–710.
- Milligan PJ, Stahl EA, Schizas NV, Turner JT (2011) Phylogeography of the copepod *Acartia hudsonica* in estuaries of the northeastern United States. *Hydrobiologia*, 666: 155–165.
- Paäbo S, R. G. Higuchi RG, Wilson AC (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction: the emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem* 264: 9709–9712.
- Paireder S, Werner B, Bailer J, Werther W, Schmid E, Patzak B, Cichna-Markl M (2013) Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Anal Biochem* 439: 152–160.
- Razouls C, de Bovée F, Kouwenberg J et Desreumaux N (2005–2022) Diversity and Geographic Distribution of Marine Planktonic Copepods. <http://copepodes.obs-banyuls.fr/en/> (2022 年 5 月 1 日アクセス)
- Rossen L, Norskov P, Hoimstrom K, Rasmussen OF (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* 17:37–45.
- Shiozaki T, Itoh F, Hirose Y, Onodera J, Kuwata A, Harada N (2021) A DNA metabarcoding approach for recovering plankton communities from archived samples fixed in formalin. *PLoS One* 17;16(2):e0245936. doi:10.1371/journal.pone.0245936.
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161: 1961–1971.
- Støttrup JG (2003) Production and nutritional value of copepods. In: *Live Feeds in Marine Aquaculture* (eds Støttrup JG, Mcevoy LA). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 145–205.