

## ギニアグラスにおけるアポミクシス遺伝子の解析：RNA抽出とcDNAライブラリー作製

陳 蘭荘・小島昭夫・加藤清正・小園照雄(九州農業試験場)

Lanzhuang CHEN, Akio KOJIMA, Seisho KATO and Teruo KOZONO :  
Analysis of Apomixis Gene in Guinea Grass (*Panicum maximum* JACQ) :  
Isolation of RNAs and Construction of cDNA Libraries

前報(九州農研56:143)において、子房長を指標としたアポスポリー性胚嚢始原細胞の出現時期をもって、アポミクシス遺伝子の発現時期を推定できると報告した。本報では、それらの結果に従って、発現時期と非発現時期のつぼみや花をサンプリングして、RNA抽出し、 $\lambda$ ZAP IIベクターを利用したcDNAライブラリーの作製を試みた。

## 1. 材料及び方法

第1表に示したギニアグラス6系統を用いて、子房長を指標として3つのステージに分けてサンプリングした。ステージ1：アポスポリー性胚嚢始原細胞出現前のつぼみ；ステージ2：アポスポリー性胚嚢始原細胞が最も盛んに出現している時期のつぼみ；ステージ3：開花当日～開花後2日目の花。トータルRNAの抽出はTotal RNA Separator Kit (CLONTECH社)に、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAの精製はOligotex<sup>TM</sup>-dT30(宝酒造株)によって、それぞれ行った。cDNA合成及びcDNAライブラリー作製はZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATA GENE社)に従って、行った。

## 2. 結果及び考察

サンプリングしたつぼみや花を液体窒素で凍結して-80℃に保存した(第1表)。そのうちの4系統よりステージ別にトータルRNAを抽出した(第2表)。抽出効率はサンプル1g当たり約1mgのRNAを得た。A260/A

280=1.80から純度の高いトータルRNAであることが分かった。次にポリ(A)<sup>+</sup>RNAを精製した。精製効率はトータルRNA500 $\mu$ g当たり約15-20 $\mu$ gを得た。RNAチェックには、アガロースMupid電気泳動を行った結果、1Kbp以上の数本しかも鮮明なrRNAバンドが検出されたので、抽出したRNAが分解されていないことが分かった(第1図)。

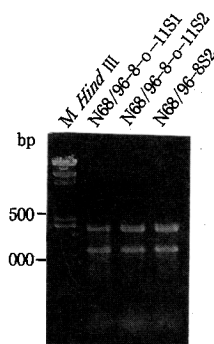
一方、N68/96-8-o-11系統の発現時期のポリ(A)<sup>+</sup>RNAを使って、cDNAライブラリー作製を試みた。cDNAの収量はEthidium Bromide Agarose PlateのUV照射法によって、測定したところ、5 $\mu$ gポリ(A)<sup>+</sup>RNAより約1 $\mu$ gのcDNAを得た。ライゲーション反応物のQualityをテストするため、プレーティングしたところ、pfu、つまり、プラーク形成することのできるファージの個数がファージベクターDNA1 $\mu$ g当たり、 $1 \times 10^6$ pfuとなったので、スクリーニングに使えることが分かった。

第2表 トータルRNAとポリ(A)<sup>+</sup>RNAの収量

系統名	ステージ	トータルRNA	純度	ポリ(A) <sup>+</sup> RNA
N68/96-8-o-11	1	5741 $\mu$ g	1.88	51.60 $\mu$ g
	2	5419 $\mu$ g	1.92	39.48 $\mu$ g
	3	1318 $\mu$ g	1.80	16.04 $\mu$ g
N68/96-8	1	1518 $\mu$ g	1.80	
	2	6984 $\mu$ g	1.81	51.04 $\mu$ g
ナツカゼ	1	1894 $\mu$ g	1.80	11.52 $\mu$ g
	2	2852 $\mu$ g	1.80	6.36 $\mu$ g
	3	800 $\mu$ g	1.80	2.40 $\mu$ g
グリーンパニック	1	1170 $\mu$ g	1.80	8.28 $\mu$ g
	2	1644 $\mu$ g	1.80	9.00 $\mu$ g
	3	1190 $\mu$ g	1.80	13.32 $\mu$ g

第1表 供試材料及びサンプリング

系統名	倍数性	アポミクシス率	ステージ <sup>a)</sup>	重さ
N68/96-8-o-11	4 × (32)	94%	1	17.22 g
			2	39.99 g
			3	9.61 g
N68/96-8	2 × (16)	0%	1	6.74 g
			2	12.80 g
			3	5.77 g
グリーンパニック	4 × (32)	95%	1	7.22 g
			2	20.14 g
			3	10.40 g
ナツカゼ	4 × (32)	68%	1	18.16 g
			2	35.14 g
			3	6.60 g
ナツユタカ	4 × (32)	90%	1	9.95 g
			2	25.40 g
			3	3.65 g
ガットン	4 × (32)	89%	1	4.50 g
			2	18.10 g
			3	3.40 g

注) <sup>a)</sup> [材料及び方法]に参照。第1図 アガロースMupid電気泳動像  
注) S1:ステージ1; S2:ステージ2。