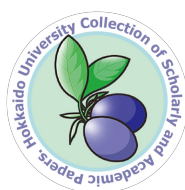




Title	イネDNA抽出における簡便な多検体破碎法の確立
Author(s)	長野, 宏則
Description	研究・技術発表（ポスターセッション）
Citation	北海道大学大学院農学研究科技術部研究・技術報告, 12, 7-10
Issue Date	2005-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35476
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_p7-10.pdf



イネDNA抽出における簡便な多検体破碎法の確立

応用生命科学専攻 育種工学講座 長野 宏則

＜目的＞

私の所属する育種工学講座では、有用な農業形質に関わる遺伝子の特定やそれらの相互作用、環境変動による集団内の遺伝子構成変化について研究を行っており、DNAマーカーを利用した遺伝子型判別は重要なツールの一つとなっている。遺伝子型判別自体は特別習熟した技術を要しないが、解析の種類によっては数千の検体からのDNAを必要とするため、抽出作業に費やす労力や時間により、学生は貴重なデータの検討や教官とのディスカッションの時間を奪われている。イネの葉は堅く、効率的に多検体のDNAを抽出するには速くて確実な細胞破碎が必須である。そのための破碎装置はメーカー各社から販売されているが、50～200万円と高価で(図2-1)、また、広い設置面積や専用の消耗品(図2-2)を必要とするなどいくつか問題がある。一方、安価な細胞破碎棒(図2-3)も存在するが、検体数が100を越えると抽出作業にかかる労力は現実的ではない。そこで「特殊な器具・装置は用いない」、「実験に利用可能なDNA品質を保つ」、「低コスト」であることを目的として、新たな破碎方法の確立を検討した。

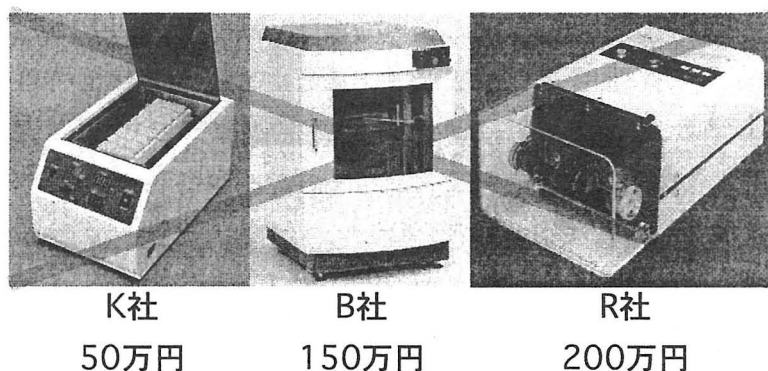


図2-1 専用細胞破碎装置

一般に高価で手が出せない



**図2-2 専用付属装置
および消耗品**
ランニングコストの問題

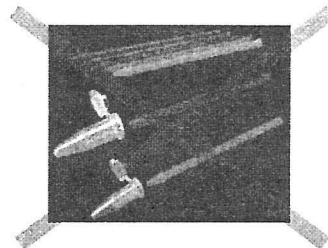


図2-3 細胞破碎棒
手作業のため疲れる

＜使用機器＞

メーカー各社より販売されている破碎機器の原理は細胞組織を直径5mmの金属球と共に容器内で、往復または遠心運動によって破碎するというものである。この原理をヒントに、本来液体試料の攪拌に用いられるマイクロチューブミキサー（トミー精工、定価125,000円、図2-4）が破碎機器として代用できないか試みた。サンプリングチューブには2mL容量のポリプロピレン製チューブ、金属球にはステンレス製ビーズ(図2-5)を使用した。

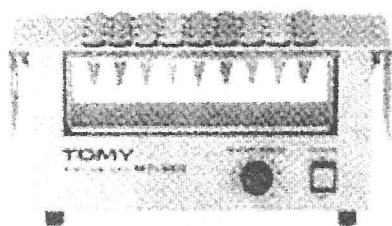


図2-4
トミー精工マイクロ
チューブミキサー、MT-360

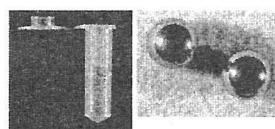


図2-5
サンプリングチューブと
ステンレス製金属球

＜細胞破碎およびDNA抽出方法＞

- 1) 約3cmのイネの葉を金属球と共にサンプリングチューブ内に入れ、液体窒素で1分間凍結する。
- 2) 凍結組織をミキサーの最大速度にて1分間攪拌し、細胞を破碎する。
- 3) 凍結組織が溶け出す前に金属球を取り出し、400 μ L のDNA抽出液 (200mM Tris-HCl(pH7.5), 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS)を加える。
- 4) よく懸濁し、室温に15分以上放置する。
- 5) 等量のクロロホルム：イソアミルアルコール (24：1) を加え、激しく混合した後、13000rpmで10分間遠心する。
- 6) 上清を新しいチューブに回収し、等量の2-プロパノールを加え、転倒混和する。
- 7) 13000rpmで10分間遠心する。
- 8) 上清を捨て、70%エタノールを加えた後、13000rpmで5分間遠心する。
- 9) 上清を捨て、DNA の沈殿を乾燥後、50 μ LのTEバッファー (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) で溶解する。

＜結果＞

以上の方法により抽出したDNA の品質をゲル電気泳動法を用いて検証したところ、従来法に比べてやや低分子化が見られるものの (図2-6) 、その後の遺伝解析実験に十分使用できる品質を保っていることが確認できた(図2-7)。この新手法により、一人の学生が5日間で600のイネ植物体からDNAを抽出できた。

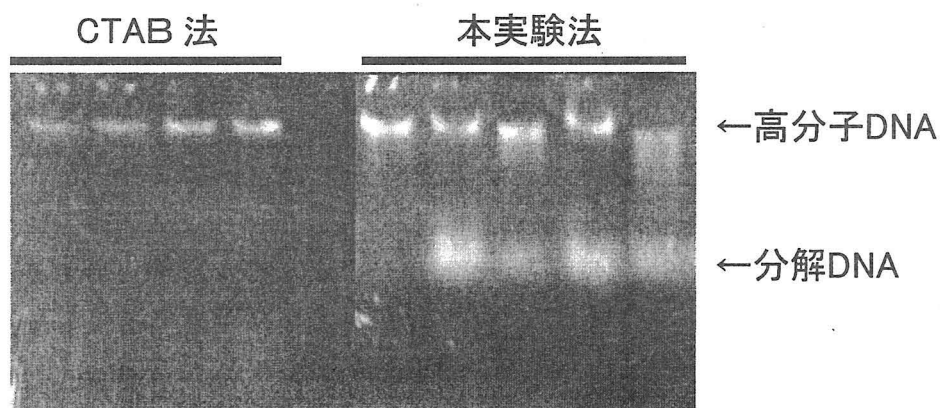


図2-6 電気泳動法によるDNA品質の検証

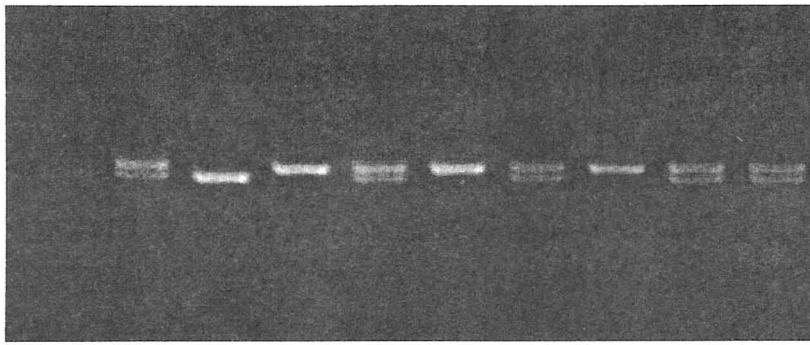


図2-7 PCR法によるDNA 増幅産物

＜考察＞

破碎の時間、金属球の種類、チューブ底の形状などいくつかの検討項目は残されるが、今回採用した汎用チューブミキサーによる抽出DNAは従来法に比べ遜色はなく(図2-6および2-7)、日々時間を追われる学生や卒業研究生を大いにバックアップできるものと考えられる。高価な機器を導入するのが一番確実ではあるが、身近にあるものを工夫し利用することで同様のデータを得られる場合があり、本発表における新手法の導入は今まで個人では進めにくかった大量検体を用いた遺伝解析の実験計画に幅を与えるものと期待できる。

＜謝辞＞

本実験は北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻育種工学講座植物育種学分野内で行われた。実験を遂行するに当たり、大学院農学研究科の佐野芳雄教授、貴島祐治助教授には実験全般および解析結果の考察に関して懇切丁寧なご指導をいただいた。この場を借りて厚くお礼申し上げます。