

遺伝子組換えコメ粉末におけるDNA抽出法の検証

Verification of DNA Extraction Methods for Genetically Modified Rice

石井 学, 山本 淳, 山辺真一, 肥塚加奈江, 今中雅章 (衛生化学科)

Manabu Ishii, Jun Yamamoto, Shinichi Yamabe, Kanae Koeduka, Masaaki Imanaka

調査の試料を入手できたことから、通知に示された遺伝子の抽出法及び組換え遺伝子の検知法について検証を行い、若干の知見を得たので報告する。

2 材料及び方法

2.1 試料

平成19年度遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査において配布された試料

コメ加工品粉砕物	1 試料 (試料 1)
定性PCR用DNA溶液	3 試料 (試料2a, 2b, 2c)
リアルタイムPCR用DNA溶液	3 試料 (試料3a, 3b, 3c)

2.2 試薬及びキット等

試薬等はすべて特級または生化学用を使用した。

抽出キットについては、シリカゲル膜タイプキットとしてニッポンジーン製GM quicker 2 を用いた。

2.3 DNA抽出方法

試料 1 について、DNA抽出は図 2 に示すGM quicker 2 変法にて、2 並行で行った。(抽出後のDNA試料溶液を試料 1 a, 1 bとする)

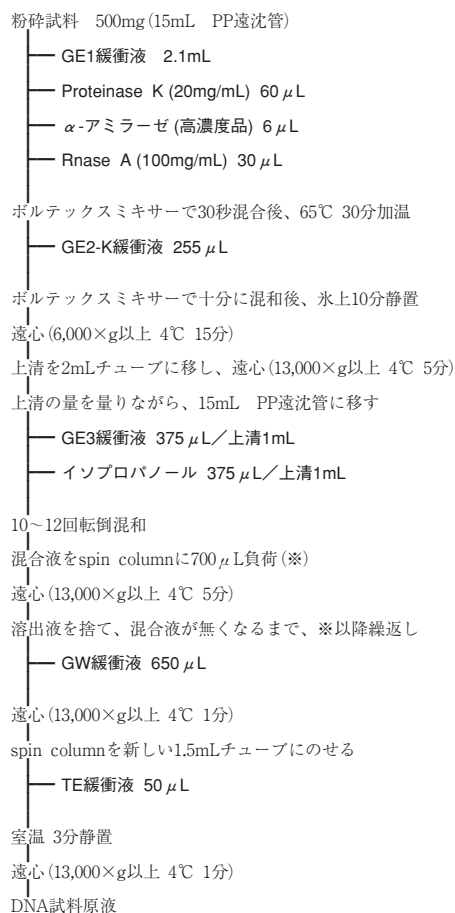


図 2 コメDNA抽出プロトコル

2.4 定性PCR法

試料 1 a, 1 b (n=1) 及び試料 2 a, 2 b, 2 c (n=2) について、定性PCRを行った。定性PCRの条件を表 1 に示した。

表 1 コメ遺伝子の定性PCR条件

プライマーの種類	最初の 変性	変性	アニー リング	伸長 反応	最後の 伸長反応	保存
陽性対照用 プライマー対	94 °C 10 min.	94 °C 30 sec.	56 °C 30 sec.	72 °C 30 sec.	72 °C 7 min.	4 °C
Cry1Ac検出用 プライマー対	95 °C 10 min.	95 °C 30 sec.	60 °C 30 sec.	72 °C 30 sec.	72 °C 7 min.	4 °C
Btコメ検出用 プライマー対	94 °C 10 min.	94 °C 30 sec.	56 °C 30 sec.	72 °C 10 sec.	72 °C 7 min.	4 °C

← 45 cycles →

2.5 リアルタイムPCR法

試料 1 a, 1 b 及び試料 3 a, 3 b, 3 c について、リアルタイムPCRを行った。NN Btコメ検出用プローブはReporterがHEXであるものを使用したため、事前にHEXdyeの登録を行った。

PCR条件：95°C 10 min. → 95°C 20 sec.

→ 60°C 1 min. (50 cycles)

PCR Volume: 25 μL

Plate Format: 96wells Clear Plate

2.6 機器等

分光光度計：那珂インストルメンツ社製

Gene Spec V

定性PCR装置：アプライドバイオシステムズ社製

ABI GeneAmp PCR System 9700 (96wells)

定量PCR装置：アプライドバイオシステムズ社製

ABI PRIZM 7900HT (96wells)

3 結果および考察

3.1 コメ加工品粉砕物からの抽出

配布されたコメ加工品粉砕物を、GM quicker 2 変法で抽出 (n=2) した。その結果を図 3 に示す。DNA抽出量は8.90 μg, 8.30 μgであり、2 並行のサンプルで両方とも十分な量が得られた。また、タンパク質混入量を示すO.D.260/280比は1.82, 1.81で、目安となる1.7~2.0の範囲にあり、糖質の混入を示すO.D.260/230比も3.16, 3.30で両方とも1.0より大きくDNAの抽出は問題なく行うことができた。

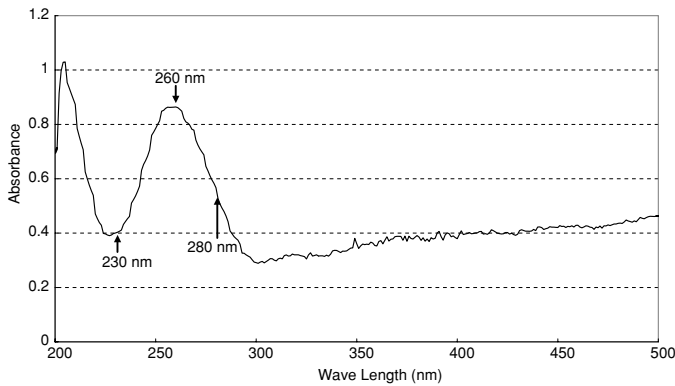


図3 抽出結果（試料1b）

3.2 定性PCR結果

試料1a, 1b及び試料2a, 2b, 2cについて、定性PCRを行い、その結果を表2および図4に示した。

なお、通知ではCry1Ac検出用プライマー対で検出されなかった場合、以後の操作はしないこととなっているが、今回は、陽性対照用プライマー対で検出されたものについてすべて以後の操作を行った。

表2 コメDNA溶液の定性PCR結果

	陽性対照用 プライマー対	Cry1Ac検出用 プライマー対	Btコメ検出用 プライマー対	Btコメ確認用 プライマー対
試料1a (n=1) (DNA量:50 ng)	検出せず	—	—	—
試料1b (n=1) (DNA量:50 ng)	検出せず	—	—	—
試料1a (n=1) (DNA量:100 ng)	検出	検出せず	検出せず*	検出せず*
試料1b (n=1) (DNA量:100 ng)	検出	検出せず	検出せず*	検出せず*
試料2a (n=2)	検出	検出	検出せず	検出
	検出	検出	検出せず	検出
試料2b (n=2)	検出	検出せず	検出せず*	検出せず*
	検出	検出せず	検出せず*	検出せず*
試料2c (n=2)	検出	検出	検出	検出
	検出	検出	検出	検出

*：通知ではCry1Ac検出用プライマー対での増幅が検出された場合のみ行う

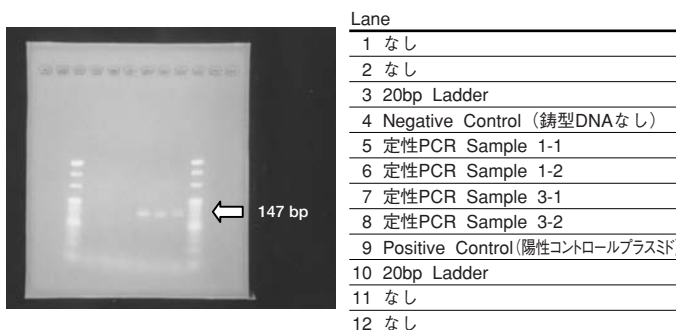


図4 Btコメ検出用プライマー対を用いたPCR増幅後の電気泳動ゲルイメージ

3.2.1 陽性対照用プライマー対を用いた増幅

通知ではPCR反応液中のDNA量を50 ngとしているが、試料1a, 1bは、その条件では陽性対照用プライマー対を用いても検出されなかった。そのため、反応液中のDNA量を倍の100 ngとしたところ、十分な増幅が検出された。なお、反応液中のDNA量を10倍の500 ngとしたところ、100 ngと比較して増幅バンドが薄く、増幅が阻害されていると思われる。このため、以後のPCR操作において、試料1a, 1bについては通知の2倍量（100 ng）のDNAを用いて操作することとした。

これは、DNA抽出操作において手技の熟達不足によるDNA鎖の切断の可能性及び、DNA抽出後において濃度測定機器であるGene Spec Vのベースが若干高くなり、見かけ上のDNA量が大きくなった可能性が高いと思われる。

試料2a, 2b, 2cは、いずれも通知の条件で十分な増幅が検出された。

3.2.2 Cry1Ac検出用プライマー対を用いた増幅

試料1a, 1bは、3.2.1と同様に反応液中のDNA量を倍の100ngとして行ったが、検出されなかった。試料2a, 2b, 2cについて、通知の条件で増幅を行ったところ、2a, 2cは増幅が検出されたが、2bは検出されなかった。

3.2.3 Btコメ検出用プライマー対を用いた増幅

試料1a, 1b, 2bは、確認のためPCRを行ったところ、いずれも増幅は検出されなかった。

試料2a, 2cは、通知で判定の必要があるとされており、PCRを行ったところ、2cは増幅が検出され、2aは増幅が検出されなかった。

3.2.4 Btコメ確認用プライマー対を用いた増幅

試料1a, 1b, 2bは、確認のためPCRを行ったところ、いずれも増幅は検出されなかった。

試料2a, 2cについては、通知で判定の必要があるとされており、PCRを行ったところ、両方とも増幅が検出された。

3.2.5 定性PCR法での判定

試料1a, 1bについて、通知の倍のDNA量ではあったものの、陽性対照用プライマー対における増幅は検出された。しかし、Cry1Ac検出用プライマー対における増幅は検出されなかったため、Btコメの判定

は陰性とした。

試料 2 a は、陽性対照用プライマー対における増幅が検出された。また、Cry1Ac 検出用プライマー対における増幅も検出された。Bt コメ検出用プライマー対における増幅は検出されなかったが、Bt コメ確認用プライマー対における増幅は検出されたため、Bt コメの定性 PCR 法での判定は陽性とした。

試料 2 b は、陽性対照用プライマー対における増幅が検出された。また、Cry1Ac 検出用プライマー対における増幅は検出されなかったため、Bt コメの判定は陰性とした。

試料 2 c は、陽性対照用プライマー対における増幅が検出された。また、Cry1Ac 検出用プライマー対における増幅も検出された。Bt コメ検出用プライマー対及び Bt コメ確認用プライマー対における増幅についても共に検出されたため、Bt コメの定性 PCR 法での判定は陽性とした。

試料 2 a, 2 c において、両方とも Bt コメの判定が陽性であるものの結果が異なっている。平成19年度遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査結果報告5) (以下、結果報告)によると、試料 2 a は試料 2 c に比べて陽性対照プラスミドの濃度が低いことから、プライマーの結合力の差により、増幅効率に差が生じたためと思われる。

3.3 リアルタイム PCR 結果

試料 1 a, 1 b 及び試料 3 a, 3 b, 3 c について、リ

アルタイム PCR を行い、その結果を表 3 および図 5 に示した。

3.3.1 コメ陽性対照用試験

試料 1 a, 1 b は、3.2.1と同様に反応液中のDNA量を通知の倍の100 ng として行ったところ、両者とも PCR 産物の増幅が検出された。

試料 3 a, 3 b, 3 c は、いずれも通知の条件で PCR 産物の増幅が検出された。

3.3.2 Bt コメ検出用試験

試料 1 a, 1 b は、定性 PCR で陰性判定されたこともあり、いずれも PCR 産物の増幅は検出されなかった。

試料 3 a, 3 b は、いずれも通知の条件で PCR 産物の増幅が検出されたが、3 c については PCR 産物の増幅が検出されなかった。

3.3.3 リアルタイム PCR 法での判定

試料 1 a, 1 b については、陽性対照用プローブを用いた PCR 産物の増幅が検出されたが、Bt コメ検出用プローブ 2 種を用いた PCR 産物の増幅はいずれも検出されなかった。なお、試料 1 a, 1 b については、定性 PCR 法で陰性と判断され、これとよく一致した。試料 3 a, 3 b については、通知の条件で、陽性対照用プローブを用いた PCR 産物の増幅が検出された。また、Bt コメ検出用プローブ 2 種を用いた PCR 産物の増幅についてもいずれも検出されたため、Bt コメの判定は陽性とした。

表 3 コメDNA溶液のリアルタイムPCR結果

	陽性対照用 プローブ	63 Btコメ検出用 プローブ	NN Bt コメ検出 プローブ
試料 1 a* (DNA量:100 ng)	検出	検出せず	検出せず
試料 1 a* (DNA量:50 ng)	—	検出せず	検出せず
試料 1 b* (DNA量:100 ng)	検出	検出せず	検出せず
試料 1 b* (DNA量:50 ng)	—	検出せず	検出せず
試料 3 a (DNA量:50 ng)	検出	検出	検出
試料 3 a (DNA量:25 ng)	—	検出	検出
試料 3 b (DNA量:50 ng)	検出	検出	検出
試料 3 b (DNA量:25 ng)	—	検出	検出
試料 3 c (DNA量:50 ng)	検出	検出せず	検出せず
試料 3 c (DNA量:25 ng)	—	検出せず	検出せず

*：通知では定性PCR法で陽性と判定された場合のみ行う

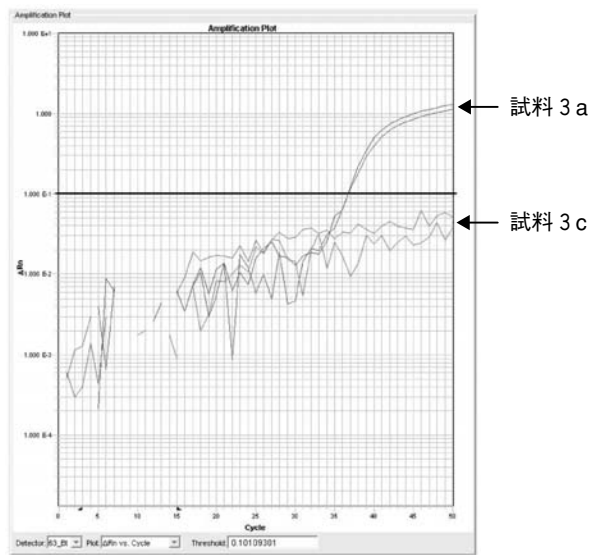


図 5 リアルタイムPCRによる増幅曲線 (試料3a,3c)

試料3cについては、通知の条件で、陽性対照用プローブを用いたPCR産物の増幅が検出された。また、Bt コメ検出用プローブ2種を用いたPCR産物の増幅はいずれも検出されなかったため、Bt コメの判定は陰性とした。

4 まとめ

著者らは、今回外部精度管理調査に参加したことで、Bt コメの試料を得られたことから、当施設において通知法によるBt コメの検出が可能かどうかの検証を行った。

コメ加工品からの抽出については、DNA量も十分に得られ、タンパク質・糖の混入も問題のない良好な結果であった。ただし、定性PCRの結果から、今回得られたDNAがやや切断されている可能性、及びDNA濃度測定における妨害物質の排除の必要性があり、手技の熟練、及びDNA濃度測定操作において改善の余地があると思われる。

定性PCR法については、増幅バンドの有無ははっきりと確認できたため、Bt コメの混入があれば検出は可能であると思われる。

リアルタイムPCR法についても、PCR産物の増幅の検出は可能であり、Bt コメの混入があれば検出は可能であると思われる。

なお、外部精度管理調査の結果報告によると、当機

関の検査結果については全ての試料において正しく判定されていた⁵⁾。今後は、抽出方法の改善、手技の熟練等も含め再度検証し、遺伝子組換え食品検査の信頼性が増すようにしていく予定である。

文 献

- 1) 武志保, 難波順子, 山辺真一, 今中雅章: 岡山県における遺伝子組換え食品の実態調査, 岡山県環境保健センター年報, 28, 111-114, 2004
- 2) 田邊英子, 山本淳, 肥塚加奈江, 山辺真一, 今中雅章: 大豆穀粒, トウモロコシ穀粒, トウモロコシ加工品及びジャガイモ加工品からのDNA抽出法の比較検討, 岡山県環境保健センター年報, 30, 127-133, 2006
- 3) 北村雅美, 田邊英子, 山辺真一, 肥塚加奈江, 今中雅章: 米国産大豆穀粒におけるDNA抽出法の比較検討, 岡山県環境保健センター年報, 31, 133-136, 2007
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 食安監発第0220001号: 安全性未審査の中国産米加工品の検知法について, 平成19年2月20日
- 5) 平成19年度遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査結果報告 (中国産安全性未審査遺伝子組換え米), 平成20年5月27日