

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

Comparison of DNA Extraction Methods from Soybean, Maize and Processed Foods Containing Maize or Potato

田邊英子，山本 淳，肥塚加奈江，山辺真一，今中雅章（衛生化学科）

Eiko Tanabe, Jun Yamamoto, Kanae Koeduka, Shinichi Yamabe, Masaaki Imanaka

【調査研究】

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

Comparison of DNA Extraction Methods from Soybean, Maize and Processed Foods Containing Maize or Potato

田邊英子，山本 淳，肥塚加奈江，山辺真一，今中雅章（衛生化学科）

Eiko Tanabe, Jun Yamamoto, Kanae Koeduka, Shinichi Yamabe, Masaaki Imanaka

要 旨

遺伝子組換え大豆の混入率を重量比5%に調整した模擬試料大豆粉末や市販トウモロコシ加工品(トルティーヤ，ポップコーン他)等を用いて各種DNA抽出法でDNAを抽出し，比較検討した。

- (1) 模擬試料大豆粉末の定量PCR結果は，混入率がどの抽出法でも5%より低い値となり，特に，シリガゲル膜タイプキット法 (DNeasy Mini Kit) は他法より低かった。
- (2) トウモロコシ加工品の未審査組換え遺伝子CBH351の定性PCRでは，検出用プライマーで陽性で確認用プライマーでは陰性という偽陽性1検体を検出した。

[キーワード：遺伝子組換え食品，DNA抽出法，定性PCR，定量PCR]

1 はじめに

遺伝子組換え食品においては，平成13年に安全性審査及び表示が義務づけられたことに伴い，その検査法¹⁾が示され，当センターにおいても平成15年度から検査を実施している²⁾。

同通知¹⁾では「組換えDNA技術は，科学技術分野の中でも最も進歩が早い分野の一つであることから，技術の進歩に対応し，検査方法については順次見直しを行っていくこと」とされており，現在まで6回の改正が行われている。特に抽出操作は，結果を大きく左右する工程であるため，改正が多いのが実状である。

また，同通知¹⁾では同じ検体であっても複数の抽出法が示されており，さらにJAS法³⁾においても異なる抽出法が併記され，どの抽出法がどの農産物穀粒・食品に適しているかは述べられてない。

今回，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について，各種DNA抽出法を適用し，それらの分析結果に及ぼす影響を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

大豆については，研究用に入手した不分別大豆 (Roundup Ready Soybean (以下RRSと省略) 混入率80.4%) と米国産分別大豆をそれぞれ粉砕し，重量比で混入率が5%になるよう混合した模擬試料大豆を用いた。

トウモロコシは，爆裂種トウモロコシ (ポップコーン用) 1検体，トウモロコシ加工品は，コーンチップ2検体及びポップコーン (キャラメル味) 1検体を岡山県内店舗から購入し，それぞれ粉砕し，試料とした。

また，米国で購入したトウモロコシ加工品 (コーンチップ) 1検体およびジャガイモ加工品 (ポテトチップス) 1検体についても同様に粉砕し，試料として用

表1 試料の種類と入手方法

検体番号	種 類	細分類	入手方法等
No.1	大豆	大豆	5%模擬試料(当センターで調製)
No.2	トウモロコシ	爆裂種 (ポップコーン用)	県内店舗で入手 (輸入品)
No.3	トウモロコシ加工品	コーンチップ	県内店舗で入手 (輸入品)
No.4		コーンチップ	県内店舗で入手 (輸入品)
No.5		ポップコーン (キャラメル味)	県内店舗で入手 (輸入品)
No.6		コーンチップ	米国で入手
No.7	ジャガイモ加工品	ポテトチップス	米国で入手

いた (表1)。

2.2 試薬及びキット等

試薬等はすべて特級を使用した。

また、抽出キットについては、シリカゲル膜タイプキット法としてQIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 及び DNeasy Plant Maxi Kitを、シリカベースレジンタイプキット法としてPromega Wizard DNA Clean-up Systemを、イオン交換樹脂タイプキット法として

QIAGEN Genomic-tip20/Gを用いた。

2.3 DNA抽出方法とPCR法

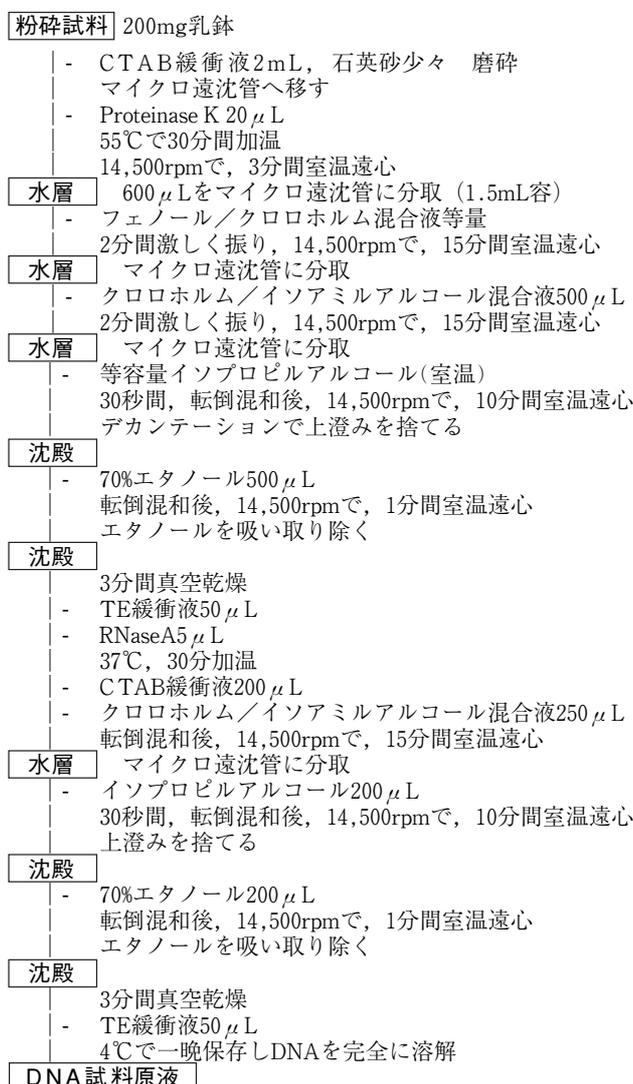
DNA抽出は、表2のとおり6つの方法で行った。なお、操作方法は厚生労働省通知に示されたとおりに行った。独自法については、図1に示した。

抽出されたDNAについて、模擬試料大豆および爆裂種トウモロコシは定量PCR、トウモロコシ加工品は、JAS法に示された組成の反応液で定性PCRを行い、

表2 各種DNA抽出方法

A	CTAB法	厚生労働省通知
B	シリカゲル膜タイプキット法	厚生労働省通知 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)
C	シリカベースレジンタイプキット法	厚生労働省通知 (Promega Wizard DNA Clean-up System)
D	イオン交換樹脂タイプキット法	厚生労働省通知(QIAGEN Genomic-tip)
E	シリカゲル膜タイプキット法	JAS法 (QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit)
F	CTAB法	独自法 (当センターSOP)

図1 F法の操作フロー



CBH351の検出を試みた。

2.4 機器等

定量PCR装置：アプライドバイオシステムズ社製

ABI PRIZM 7900HT

定性PCR装置：アプライドバイオシステムズ社製

GeneAmp PCR9700

電気泳動装置：アドバンス社製 Mupid-S

粉碎装置：フォアベルク社製 Thermomix

3 結果及び考察

3.1 模擬試料大豆からの抽出

模擬試料大豆を、シリカゲル膜タイプキット法 DNeasy Plant Maxi Kit (E法)を除く5つの抽出方法で抽出した (n=4)。その結果を表3に示した。

通常、タンパク質などの混入があると260nm/280nm比は小さくなる。この比が1.7~2.0になれば定量および定性のPCRに適している¹⁾。また、糖類やフェノール類などの混入があると260nm/230nm比は小さくなる傾向がある。

D法のみ260nm/280nm比が1.7を下回り、精製が不十分であることが分かった。260nm/230nm比については、C及びD法で1を下回ったが、C法については、試薬として用いるグアニジン自体に230nmの吸収がある⁴⁾ため、低いと考えられた。

3.2 トウモロコシ及びトウモロコシ加工品並びにジャガイモ加工品からの抽出

表1の試料について表2の6つの抽出方法でDNAを抽出した(n=1)。

抽出操作で次の3点を変更した。①D法でジャガイモ加工品ポテトチップス (No.7) にG2緩衝液8.0mLを加え、加温したところ糊状になり、上清が少量しか得られなかったため、12.0mLのG2緩衝液を加えることとした。②E法で爆裂種トウモロコシ (No.2) から大量のDNAが得られたため、最終的に100μLのTE緩衝液に溶解した。③E法でジャガイモ加工品ポテトチップス (No.7) でイソプロパノール沈殿の際に白色沈殿が生じた。この沈殿は500μLのTE緩衝液にも溶解しなかったため、その上清を用いてDNA純度

表3 抽出法によるDNA収量の比較(模擬試料大豆の場合)

抽出方法(n=4)		DNA (μg)	260nm/280nm比	260nm/230nm比
A	CTAB法(厚生労働省通知)	4.21±0.73	1.92±0.12	1.50±0.15
B	シリカゲル膜タイプキット法	15.41±1.31	1.75±0.11	1.55±0.14
C	シリカベースレジソタイプキット法	27.10±3.60	2.05±0.05	0.51±0.04
D	イオン交換樹脂タイプキット法	46.34±13.58	1.52±0.20	0.81±0.19
F	CTAB法(当センターSOP)	39.58±11.43	2.23±0.57	5.69±5.66

表4 各種抽出法によるDNA収量と精製度合いの比較 (トウモロコシ穀粒, トウモロコシ加工品, ジャガイモ加工品の場合)

抽出法 (n=1)	A法			B法			C法			D法			E法			F法		
	CTAB法			シリカゲル膜タイプキット法			シリカベースレジソタイプキット法			イオン交換樹脂タイプキット法			シリカゲル膜タイプキット法			CTAB法		
試料	厚生労働省通知			厚生労働省通知 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)			厚生労働省通知 (Promega Wizard DNA Clean-up System)			厚生労働省通知 (QIAGEN Genomic-tip)			JAS法 (QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit)			独自法 (当センターSOP)		
	DNA量 (μg)	260nm/280nm	260nm/230nm	DNA量 (μg)	260nm/280nm	260nm/230nm	DNA量 (μg)	260nm/280nm	260nm/230nm	DNA量 (μg)	260nm/280nm	260nm/230nm	DNA量 (μg)	260nm/280nm	260nm/230nm	DNA量 (μg)	260nm/280nm	260nm/230nm
No.2	2.61	1.73	1.09	16.88	1.73	1.71	15.70	1.57	0.27	55.40	1.71	1.19	384.8	1.38	1.00	14.98	1.95	0.96
No.3	0.37	1.36	0.42	0.95	1.39	1.38	6.70	1.80	0.14	24.95	2.11	2.30	266.0	1.14	0.93	18.00	1.71	0.72
No.4	0.55	1.07	0.43	0.37	2.04	2.79	4.87	1.68	0.13	11.95	2.19	2.30	17.70	1.32	1.09	17.53	1.54	0.81
No.5	0.43	1.42	0.46	0.80	1.44	0.17	5.97	1.83	0.14	30.10	1.83	1.75	37.45	1.29	0.95	26.95	1.68	0.95
No.6	2.37	1.14	0.70	1.60	1.82	0.81	1.97	1.55	0.07	5.33	1.84	2.04	163.3	1.15	0.81	2.66	1.88	0.50
No.7	1.03	1.32	0.32	2.47	1.63	0.67	4.37	1.89	0.11	6.24	2.30	2.69	67.75	1.17	0.97	9.20	1.62	0.57

トウモロコシ穀粒：試料 No.2

トウモロコシ加工品：試料No.3~6

ジャガイモ加工品：No.7

測定を行った。抽出結果を表4に示した。

A法は加工されていないNo.2のトウモロコシからは260nm/280nm比が1.7以上と純度の高いDNAを得ることができたが、No.3～No.7の加工品では精製が不十分であった。

B法もA法と同じようにポップコーン、ポテトチップスなどの加工の程度が高い試料では精製が不十分なDNAしか得られなかった。

C法は加工食品でも比較的良好なDNAを得ることができた。しかし、前にも述べたとおり、試薬として用いるグアニジン自体に230nmの吸収がある⁴⁾ため、260nm/230nm比はすべてにおいて低い値になったと考えられる。

D法はDNA収量、純度とも最も良好な結果となったが、カラムが目詰まりする検体もあり、他の方法に比べ精製に時間を要した。

E法はDNA収量は多かったが260nm/280nm比の数値が低く精製が不十分であった。また、ジャガイモ加工品ポテトチップス（No.7）で生じた白色沈殿は、ヨウ素試液で暗青紫色を呈したためデンプンと推測された。

F法は同じCTAB法であるA法に比べDNA収量、純度で上回り、最も良好な結果を与えた。

3.3 各種DNA抽出法の定量PCR値に及ぼす影響について（模擬試料大豆）

種々の方法で得られた模擬試料大豆からのDNAを用いてRRSの定量PCRを行い、その結果を表5に示した。

測定値が最も5%に近かったのはF法であり、一方B法が最も低い値であった。B法は平成15年11月13日付けの通知⁵⁾でトウモロコシのみの適用となり大豆は除外された。これは平成15年度に実施された外部精度管理結果を受けての改正であり⁶⁾、B法が他の方法より測定値が低くなる傾向と良く一致した。F法について

は、5%に近い値であったものの、Lec遺伝子コピー数が12,571±1,625と他の方法よりも格段に低い値であった。0.1%の定量限界を担保するためにLec遺伝子コピー数は20,000以上であるべき⁷⁾とされているが、F法ではこの条件を満たしていなかった。石英砂での研磨、少量スケールであることなどにより、操作の過程でLec遺伝子が分解している可能性が示唆された。A法、C法、D法ではほぼ差がない結果であったが、C法では260nm/230nm比が低く精製度合いが把握しにくいこと、厚生労働省通知¹⁾で大豆穀粒の抽出法はA法またはC法と示されていることを勘案すると、模擬試料大豆はA法で抽出するのが最も適していると考えられた。

3.4 市販トウモロコシの定量PCR検査について

爆裂種トウモロコシからのDNA抽出は、A法、B法、D法で精製度合いにほぼ差がない結果であったが、A法ではDNA収量が少ないこと、厚生労働省通知¹⁾でトウモロコシ穀粒の抽出法はA、BまたはC法と示されていることを勘案すると、B法で抽出するのが最も適していると考えられた。

爆裂種トウモロコシについて、B法（n=4）で抽出し、定量PCRを行ったが、P35S（CAM）スクリーニング及びGA21のどちらも混入率は0%であった。

3.5 トウモロコシ及びその加工品からの定性PCRによるCBH351の検出法について

トウモロコシ加工品からのDNA抽出は、D法が最も適しており、厚生労働省通知¹⁾でD法と示されていることにも一致した。

トウモロコシ及びトウモロコシ加工品（No.2, 3, 4, 5, 6）について、D法で抽出したDNAを用いて定性PCRを行いCBH351の検出を試み、電気泳動結果を図2, 3に示した。スクリーニング試験において、陽性対象とほぼ同じ位置（170bp付近）にバンドが出現した（図3, No.6）。

表5 定量PCRの結果（模擬試料大豆）

抽出方法(n=4)		Lec遺伝子コピー数	RRS遺伝子コピー数	混入率%
A	CTAB法(厚生労働省通知)	41,814±9,065	1,423±359	3.26±0.13
B	シリカゲル膜タイプキット法	38,801±14,388	1,005±350	2.50±0.08
C	シリカベースレジンタイプキット法	38,844±2,167	1,312±262	3.73±0.69
D	イオン交換樹脂タイプキット法	59,889±14,878	2,214±475	3.58±0.12
F	CTAB法(当センターSOP)	12,571±1,625	577±171	4.61±1.65

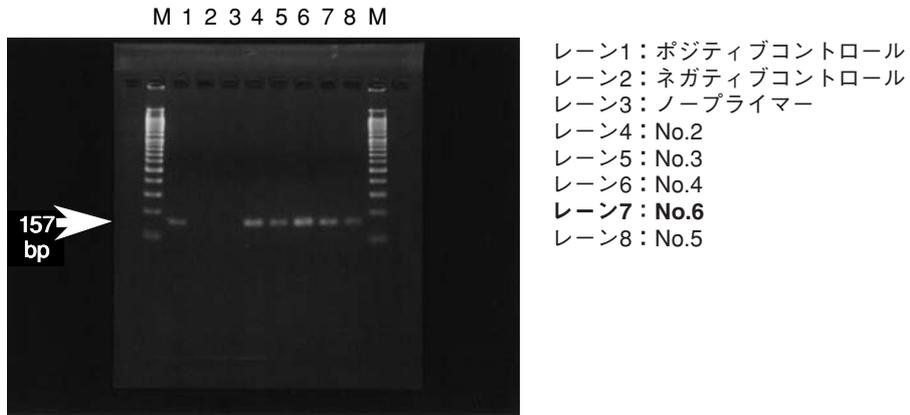


図2 陽性対照用プライマー (Zein n-5',Zein n-3') によるPCR産物のアガロースゲル電気泳動

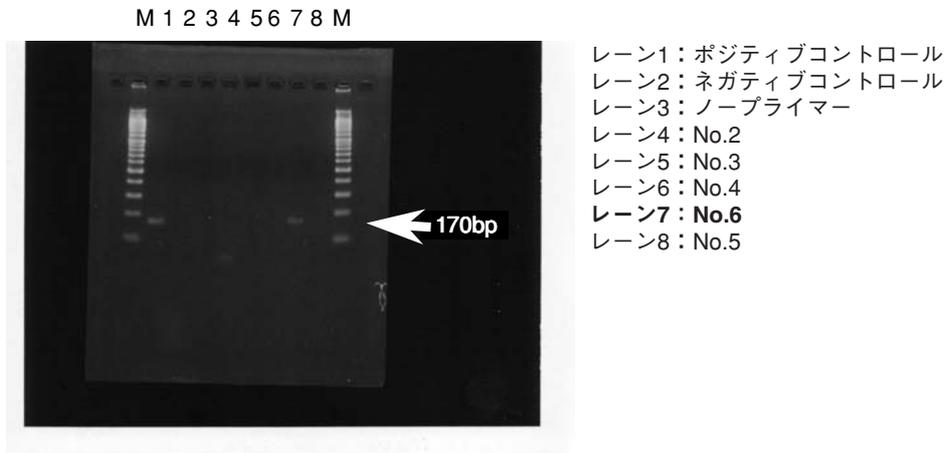


図3 検出用プライマー (Cam03-5',CBH02-3') によるPCR産物のアガロースゲル電気泳動

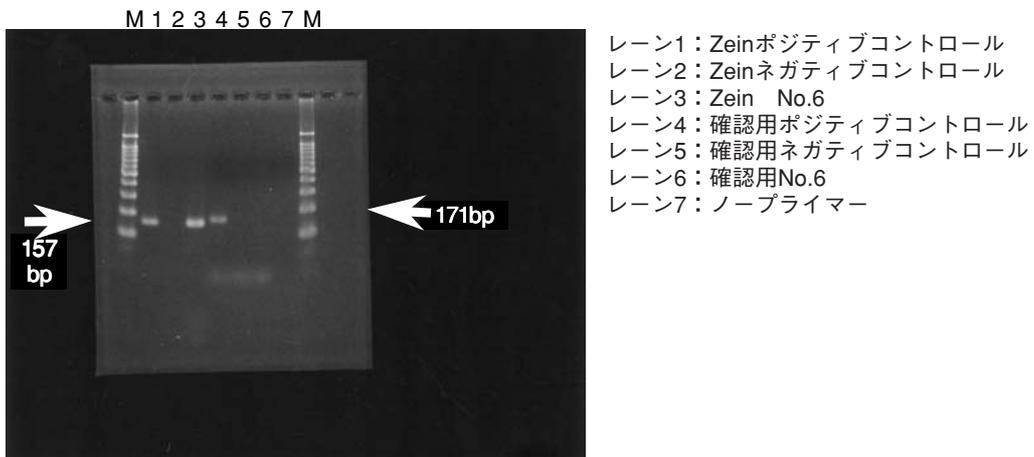
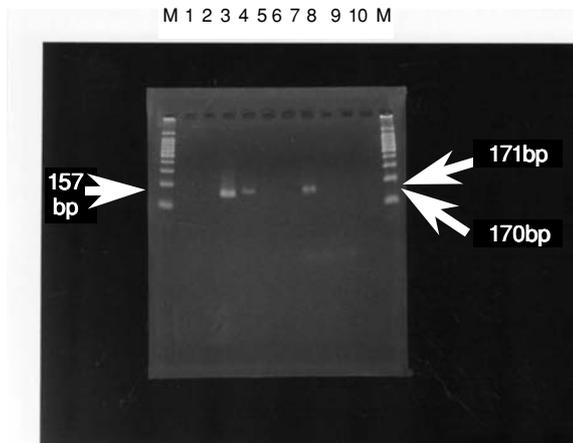


図4 No.6から抽出したDNA (1回目抽出)を用いた陽性対照用プライマー (Zein n-5',Zein n-3') および確認用プライマー (Cry9c-5',35Ser-3') によるPCR産物のアガロースゲル電気泳動



- レーン1：Zeinポジティブコントロール
- レーン2：Zeinネガティブコントロール
- レーン3：Zein No.6
- レーン4：検出用ポジティブコントロール
- レーン5：検出用ネガティブコントロール
- レーン6：検出用No.6
- レーン7：確認用ポジティブコントロール
- レーン8：確認用ネガティブコントロール
- レーン9：確認用No.6
- レーン10：ノープライマー

図5 No.6から抽出したDNA（2回目抽出）を用いた陽性対照用プライマー（Zein n-5', Zein n-3'）、検出用プライマー（Cam03-5', CBH02-3'）および確認用プライマー（Cry9c-5', 35Ser-3'）によるPCR産物のアガロースゲル電気泳動

このNo.6について再度確認用プライマーと用いて定性PCRを行ったところ、図4のとおり、確認用プライマーでは陽性対象とほぼ同じ位置にバンドは見られなかった。厚生労働省通知¹⁾では、抽出を2回並行して行い、定性PCRを行うこととなっているため、再度No.6からD法で抽出を行い同様に定性PCRをおこなったところ、陽性対照プライマーでは増幅は見られたが、検出用及び確認用プライマーでは増幅が見られず（図5）、この結果からNo.5はCBH351陰性と判断された。

門間等も同様にトウモロコシ中のCBH351スクリーニング試験の実施時に偽陽性を示す検体があることを見だし、詳細に検討した結果、公定法スクリーニング用プライマーの設計に問題があることを発見し、新しいプライマーを設計することにより良好な結果を得ている⁸⁾。我々も今後新プライマーの採用を検討する予定である。

4 まとめ

- ・大豆穀粒はCTAB法（A法）、トウモロコシはB法、加工品はD法で抽出するのが適していると考えられる。なお、C法は260nm/230nm比はすべてにおいて低く、糖の除去が十分かどうか判断できない欠点があるが、DNA収量は良好であった。
- ・大豆のCTAB法では、Lec遺伝子コピー数が20,000以上を担保できるA法で行うのが最も適していることから、当センター大豆穀粒の抽出法SOPの改訂を

行った。

- ・トウモロコシ加工品は、D法でDNA抽出し、定性PCR(CBH351)を行うという体制が整備された。また、スクリーニング試験で偽陽性のバンドが見られることが確認された。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 食発第110号：組換えDNA技術応用食品の検査方法について、平成15年3月27日
- 2) ホームページ<http://www.pref.okayama.jp/hoken/seiei/gmo.htm>
- 3) 農林水産消費技術センター：JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析 マニュアル改訂第2版、平成14年6月20日
- 4) 大森清美他：シリカベースレジソタイプキット法による遺伝子組換え食品からのDNA抽出に関する検討、第41回全国衛生化学技術協議会年会講演集、p116-117、平成16年
- 5) 厚生労働省食品安全部長通知 食安発第1113001号：組換えDNA技術応用食品の検査方法について（一部改正）、平成15年11月13日
- 6) 笠間菊子他：遺伝子組換えダイズ（ラウンドアップ・レディー・大豆40-3-2系統）の定量検査法の外部精度管理試験、食衛誌46（6）、270-276、2005
- 7) 杉浦義紹他：ABI PRISM 7900HTによる大豆およ

び大豆加工品の定量PCR試験, 第40回全国衛生化学
技術協議会年会講演集, p86-87, 平成15年
8) Monma, K., Moriguchi, R., Sagi, N., Ichikawa, H.,
Sato, K., Tobe, T., Kamata, K. : Investigation of

False-positive Reactions for CBH351 Maize in
Screening PCR Analysis, J. Food Hyg. Soc. Japan,
47(1), No. 1, 9-14, 2006