

シリカベースレジンタイプキット改良法の検討 ならびに大豆及び大豆加工品の定量PCR試験

芦澤 英一, 橋本 博之, 永田 知子

A Study of DNA Extraction Using Modified Silica-based Resin-type Kit Method and Quantitative PCR Assay of Recombinant DNA from Soybean Kernels and Processed Foods

Eiichi ASHIZAWA, Hiroyuki HASHIMOTO, Tomoko NAGATA

I はじめに

組換えDNA技術応用食品についての消費者の不安感を背景に、平成13年4月から組換えDNA技術応用食品に表示義務が課せられた。これを科学的に検証するための検査法も通知された。

シリカベースレジンタイプキット法（以下、レジンタイプ法と略す）は大豆およびとうもろこし穀粒からのDNA抽出法として、平成13年3月27日付け食発第110号で通知されていたが、シリカゲル膜タイプキット法（以下、シリカゲル膜タイプ法と略す）やセチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）法も通知されていたため他都道府県でもあまり使用されていなかった。ところが平成15年11月13日付け食発1130001号の通知によりシリカゲル膜タイプキット法が大豆穀粒のDNA抽出法としては通知から削除されたため、レジンタイプ法が使用されるようになった。しかし、実際には通知法どおり行くとDNA抽出量が安定しないため検査効率が上がらない難点があった。

そこで今回、シリカベースレジンタイプキット法を改良し（以下、改良法と略す）安定した結果が得られたので報告する。さらにこの改良法を用いた検査結果ならびに平成14年度、15年度のシリカゲル膜タイプ法、イオン交換膜法を用いた検査結果についても報告する。

II 実験方法

1 試料

大豆粉は平成16年1月に県内豆乳製造工場から入手した。

大豆穀粒8検体、豆腐8検体、厚揚げ8検体、きな粉4検体、大豆水煮3検体、こうや豆腐1検体については、平成16年6月から8月にかけて入手した。大豆穀粒は8検体中6検体が原料用、残り2検体は市販品であった。大豆加工食品は全て市販品であった。

平成14年度外部精度管理用大豆検体は精度管理使用後-20℃で凍結保存しておいたものを使用した。

平成14年度および平成15年度検査用検体はすべて県内流通品を用いた。

2 試薬

1) DNA抽出用試薬

10%-SDS, 5mol/L塩化ナトリウム, TE緩衝液, 塩酸-グアニジン: Promega社製 (分子生物学グレード)

シリカベースレジンタイプキット: Wizard DNA clean-up system (Promega社製)

Proteinase K, 0.5mol/L EDTA, 1mol/L Tris-塩酸, フェノール/クロロホルム混合液: ニッポンジーン社製 (分子生物学グレード)

エタノール: 和光純薬社製 (残留農薬分析用)

イソアミルアルコール, クロロホルム: 和光純薬社製 (試薬特級)

イソプロパノール: 関東化学社製 (試薬特級)

シリカゲル膜タイプキット: DNeasy Plant mini Kit (QIAGEN社製)

イオン交換膜タイプキット: Genomic-Tip 20/G (QIAGEN社製)

Genomic DNA Buffer Set: QIAGEN社製

CTAB: SIGMA社製 (分子化学グレード)

2) 定量PCR用試薬

プライマー, TaqManプローブ: ニッポンジーン社製

TaqMan Universal PCR Master Mix: Applied Biosystems社製

3 装置及び操作条件

定量装置にはABI PRISM 7700(Applied Biosystems社製)を用いた。

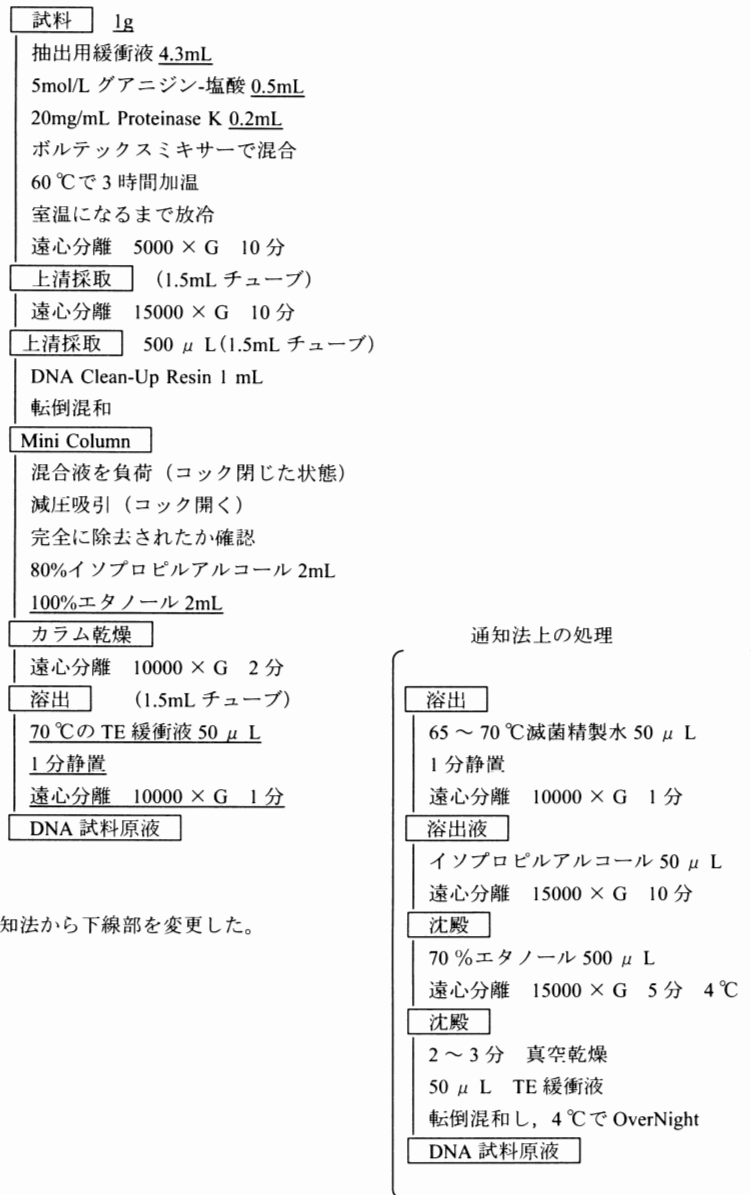
操作条件は通知法¹⁾³⁾⁴⁾に従った。

4 試験操作

レジンタイプ改良法は通知法¹⁾を図1のとおり変更して実施した。DNA抽出量を増加させるためにサンプル量は1/2である1gとした。レジン原液に加えるサンプル抽出液上清の上限が500μLとキットにより決められていることから抽出用緩衝液, 5mol/Lグアニジン-塩酸, 20mg/mL Proteinase Kをすべて1/4にスケールダウンした。レジンタイプ改良法²⁾すなわち通知法のイソプロパノール沈殿操作を省略し, かわりに100%エタノールによって洗浄後, TE緩衝液で直接溶出する方法を参考にした。定量PCRの部分はすべて通知法¹⁾に従った。

平成14年度精度管理用検体については試料を0.5gで抽出した。

イオン交換膜タイプ法は通知法³⁾⁴⁾の「加工食品からのDNA抽出精製」を準用し, シリカゲル膜タイプ法は通知法³⁾⁴⁾CTAB法は通知法¹⁾に従った。



通知法から下線部を変更した。

図1 レジンタイプDNA抽出改良法

III 結果及び考察

1. DNA抽出および定量PCR

(1) 大豆粉から繰り返し実験

大豆粉から繰り返し実験の結果を表1に示す。

改良法はレジンタイプ法に比べて純度の向上し、収量は5倍以

上になった。抽出するサンプル量は相対的に2倍になっているが、割合としてそれ以上の増加であった。またDNA収量もばらつきが少なく、定量PCRに必要なDNA量を安定して得ることができた。同一ロットの大豆粉を利用しているためサンプルや前処理の影響は無いと考えられることから、通知法のイソプロパノール沈殿がうまくいかないことによってDNA収量にばらつきが生じると思われる。

表1 大豆粉を使った繰り返しDNA抽出実験結果

DNA抽出法	試行数	純度 (O.D.260/O.D.280)	平均DNA量 (μg)	標準偏差	内在性遺伝子 コピー数	組換え遺伝子 コピー数	平均混入率 (%)	標準偏差
改良法1回目	4	1.57~1.77	34.10	5.57	20578~39148	94~138	0.350	0.066
改良法2回目	4	1.74~1.91	46.12	5.80	34813~59560	132~174	0.354	0.057
レジンタイプ法	4	1.26~2.07	11.85	12.64	3211~13761	9~60	0.396	0.095
シリカゲル膜タイプ キット法	4	1.06~1.21	2.88	1.05	3800~11926	32~97	0.866	0.086
CTAB法	4	1.12~1.18	3.64	0.19	558~1672	7~19	1.142	0.044

また、シリカゲル膜タイプ法、CTAB法と比較してもいずれも純度が向上し、DNA収量も増加している。このことから大豆粉からのDNA抽出法として改良法は最も適した方法であると言える。

(2) 定量PCR

(1)で抽出したDNAを用いて定量PCRを実施した。

内在性遺伝子のコピー数がレジンタイプ法に比べて2倍近く改善された。混入率を計算すると、1回目0.350±0.066%、2回目0.354±0.057%と安定した結果が得られた。レジンタイプ法と比較してもほぼ同等であったことから改良法を利用しても定量PCRには影響がないものと思われる。

CTAB法は抽出DNA量が少ないため、内在性遺伝子及び組換え遺伝子のコピー数も小さいことからCTAB法は今後の検討課題である。

(3) 定量PCRへの影響

改良法によって定量値にどのような傾向が生じるのかを見るため、平成14年度外部精度管理用大豆検体を用いて1試行で実施した。

1%混入検体が1.68、5%混入検体が1.70と良好な純度であり、

DNA量も25μg、23.5μgと十分であった。定量PCRの結果1%混入試料が0.943%、5%混入試料は5.438%と検出された。

当所の平成14年度外部精度管理の報告値はシリカゲル膜タイプ法で抽出したので1%混入検体が0.194%、5%混入検体が3.713%と低い値であった。シリカゲル膜タイプ法を使用してDNAを抽出すると定量PCRの結果が低めに出る傾向にあったことが報告書²⁾に記載されている。

2. 市場流通品への適用

大豆穀粒（8検体）及び大豆加工品（計24検体）について、DNA抽出及び定量PCRの結果を表2に示す。

大豆穀粒及び大豆加工品ともに純度は良好で、DNA収量も十分であった。定量PCRを実施したところ、原料用大豆1検体から組換え遺伝子が0.88%混入していた。残りの大豆穀粒7検体からは検出されなかった。大豆加工食品についての定量PCR法は確立されていないため、参考値として計算した。豆腐から3検体、厚揚げから2検体検出された。いずれも5%を超えるものではなかった。なお、混入率の計算においては検量線が20コピーから250万コピーであることから、20コピー未満は計算の対象から除いた。

表2 改良法を用いた原料及び市販品からの検査結果

検体の種類	検体数	純度 (O.D.260/O.D.280)	平均DNA量 (μg)	標準偏差	内在性遺伝子 コピー数	組換え遺伝子 コピー数	混入率
大豆穀粒	8	1.58~1.66	28.01	4.51	48134~96897	0~746	0.88% (1)
豆腐	8	1.79~2.17	29.03	10.14	8740~27400	0~160	*1.53%~*0.18% (3)
厚揚げ	8	1.98~2.14	54.61	9.19	10642~24491	1~38	*0.32%~*0.17% (2)
きな粉	4	1.62~1.68	43.97	7.44	3797~6483	0~1	—
大豆水煮	3	1.90~2.23	24.75	4.81	3602~4897	0	—
こやや豆腐	1	1.80	40.30	—	13332	8	—

1)：混入率はコピー数が20以上であったもの限り計算した。()は組換え遺伝子検出検体数

*：通知法としては大豆穀粒のみであるため、参考値として算出した。

3. 平成14年度、15年度の検査結果

平成14年度に実施した結果を表3-1に、平成15年度に実施した結果を表3-2に示す。平成15年6月18日付けで通知法³⁾が改正され、定量PCR溶液の組成が変更されているため、平成14年度とそれ以降の定量PCRにおいて内在性遺伝子のコピー数を直接比較することはできない。また、シリカゲル膜タイプ法におい

て内在性遺伝子コピー数が少ない場合にはイオン交換膜タイプ法を用いて行った。

平成14年度は豆腐から5検体、油揚げから3検体、きな粉から1検体検出された。平成15年度は豆腐から4検体、油揚げから1検体検出された。参考値ではあるが、いずれも5%を超えるものではなかった。

表3-1 平成14年度 検査結果

検体の種類	検体数	DNA抽出法	内在性遺伝子 コピー数	組換え遺伝子 コピー数	混入率
大豆穀粒	1	シリカゲル膜タイプ法	402	0	—
	3	イオン交換膜法	886~8758	0	—
豆腐	8	シリカゲル膜タイプ法	49056~126955	0~398	*0.05%~*0.41% (5)
油揚げ	3	シリカゲル膜タイプ法	50428~133254	32~120	*0.03%~*0.25% (3)
大豆水煮	13	シリカゲル膜タイプ法	1337~7334	0	—
	5	イオン交換膜法	1628~9960	0	—
きな粉	13	シリカゲル膜タイプ法	913~12943	0~13	—
	1	イオン交換膜法	16140	37	*0.24% (1)

1)：混入率はコピー数が20以上であったもの限り計算した。()は組換え遺伝子検出検体数

*：通知法としては大豆穀粒のみであるため、参考値として算出した。

表3-2 平成15年度 検査結果

検体の種類	検体数	DNA抽出法	内在性遺伝子 コピー数	組換え遺伝子 コピー数	混入率 ¹⁾
大豆穀粒	10	シリカゲル膜タイプ法	20919~339879	0	—
豆腐	3	シリカゲル膜タイプ法	6580~9085	1~2	—
	5	イオン交換膜法	3512~136659	1~136	*0.03%~*0.10% (4)
厚揚げ	8	イオン交換膜法	3978~155033	0~125	*0.05%~*0.08% (4)
大豆水煮	12	イオン交換膜法	1742~21898	0	—
きな粉	2	イオン交換膜法	6007~8580	0~4	—

1)：混入率はコピー数が20以上であったものに限り計算した。()は組換え遺伝子検出検体数
*：通知法としては大豆穀粒のみであるため、参考値として算出した。

IV まとめ

レジタイプ法を改良した結果、抽出DNAの純度が向上し、DNA抽出量が増加した。平成14年度外部精度管理検体を用いた定量PCRの結果が良好であったことから、改良による定量PCRへの影響はないものと思われた。

改良法を用いて実際の流通品に適用した結果、原料用大豆穀粒から1検体0.88%の混入が認められた。平成14年度、15年度と同様に、豆腐3検体、厚揚げ2検体から混入が認められた。参考値として混入率を計算するといずれも5%を超えるものはなかった。

V 文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 (2003)：組換えDNA技術応用食品の検査方法について、食安発第1113001号
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所 (2003)：平成14年度組換えDNA食品外部精度管理調査結果報告 (ダイズ)
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品保健部長通知 (2003)：組換えDNA技術応用食品の検査方法について、食発第0618001号
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品保健部長通知 (2002)：組換えDNA技術応用食品の検査方法について、食発第0430001号