

試験研究成果普及情報

部門	その他	対象	研究
課題名：ガラス繊維濾紙挿入チップを用いた簡易迅速 DNA 抽出法			
[要約] ガラス繊維濾紙挿入チップを用いた DNA 抽出法は、低コストで簡易迅速である。イネの育種における交配個体からの DNA マーカーによる選抜等に有効に活用できる。			
キーワード 育種選抜、DNA マーカー、ガラス繊維濾紙、DNA 抽出法、品種判別			
実施機関名 主 査 農業総合研究センター・生物工学部・遺伝子工学研究室 協力機関 農業総合研究センター・育種研究所・水稻育種研究室			
実施期間 2002年度～2007年度			

[目的及び背景]

育種選抜において、多数の交配集団から有用な遺伝子を持った個体を DNA マーカー技術で選抜する手法が実用化されつつある。しかし、DNA マーカーで選抜する場合、DNA マーカーそのものの開発とともに、多くの個体から迅速かつ低コストに DNA を抽出する技術の開発が望まれている。

これまでに様々な DNA 抽出法が開発されているが、手順が煩雑、DNA の純度が低く DNA マーカーによる判別に支障をきたす等の問題があった。このため、迅速かつ再現性の高い DNA 抽出法の開発を行った。

[成果内容]

- 1 簡易で迅速な DNA 抽出を目的として開発された方法のひとつにガラス繊維濾紙を利用した方法（村元ら、2005）がある。この方法を改良し、DNA マーカーによる優良個体の判別が可能な DNA 抽出法であるガラス濾紙挿入チップ法を開発した（表 1、図 1、図 2）。
- 2 本法により、イネの育種交配系統 236 個体から DNA を抽出し、DNA マーカーによるツマグロヨコバイ抵抗性個体の判別を行ったところ、ほとんどのサンプルで判別できたことから、育種選抜に広く適用可能な再現性を有する抽出法である（表 2）。
- 3 本法は、元法から遠心操作やチューブの開閉等の煩雑な操作を省略するとともに、マルチチャンネルピペットを用いることにより複数のサンプルを一括して処理できるため、省力化と約 70 % の時間短縮ができる（表 3）。また、高価な試薬、消耗品等を用いないことから、市販のキットに比較してコストは 8 分の 1 程度である。

[留意事項]

本法は、育種交配個体の DNA マーカーによる選抜だけでなく、品種判別等に用いることも可能である。

[普及対象地域]

[行政上の措置]

[普及状況]

育種選抜に利用している。

[成果の概要]



図1 ガラス繊維濾紙挿入チップの写真

表1 ガラス濾紙挿入チップ法の手順

1. ガラス繊維濾紙を亜硫酸ナトリウム液 (20mM Tris-HCl(pH8)、2mM EDTA-Na₂、10%亜硫酸ナトリウム) に浸漬した後、室温で乾燥させ、3mm 角に切断し、200 μL のマイクロピペットチップの中に挿入する。
2. 調べたいイネの葉を約 1cm に切断し、100 μL の磨砕緩衝液 (20mM Tris-HCl(pH8)、2mM EDTA-Na₂) とともに磨砕する。
3. 1. で作製したチップで磨砕した液を濾紙のところまで吸い上げる。
4. そのチップで固定液 (100mM Tris-HCl(pH8)、10mM EDTA-Na₂、7M グアニジン塩酸) を 2 回出し入れする。その後、1 分間放置する。
5. 洗浄液 (50mM Tris-HCl(pH8)、5mM EDTA-Na₂、200mM 塩化ナトリウム、60%エタノール) を吸い上げ、ゆっくり 10 回出し入れする。同様の操作を新しい洗浄液を用いてもう一度繰り返す。
6. 70%エタノールを吸い上げ、ゆっくり 10 回出し入れしてもどす。
7. 100 μL の 1/10TE 液 (1mM Tris-HCl(pH8)、0.1mM EDTA-Na₂) を吸い上げ、ゆっくり 10 回出し入れして、その液を新しいチューブに移す。得られた液を DNA マーカー判別のための PCR 反応に用いる。

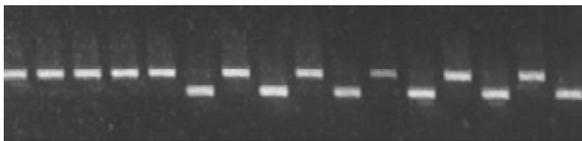


図1 ガラス濾紙挿入チップ法で得られた DNA を用いた DNA マーカー判別結果

注) 適用例としてツマグロヨコバイ抵抗性の DNA マーカーによる判別結果を示した
 白い筋が上のほうにあるサンプルが抵抗性
 下のほうにあるのが感受性と判定する

表2 ガラス濾紙挿入チップ法の DNA マーカー判別成功率

供試サンプル数	判別できたサンプル数	判別成功率
236	234	99%

注) ツマグロヨコバイ抵抗性の DNA マーカー判別結果を示した

表3 ガラス濾紙挿入チップ法の所要時間¹⁾

方法	所要時間 (分)	対照比 (%) ³⁾
ガラス濾紙挿入チップ法	22	33
市販のキット ²⁾	67	

注 1) 16 サンプルの処理時間

2) Q 社のキットを用いた場合

3) Q 社のキットに対する比を百分率で示した

[発表及び関連文献]

- ・村元靖典ら、ガラス繊維濾紙を利用した植物からの迅速・簡便・低コストな DNA 抽出法, 平成 16 年度関東東海北陸農業研究成果情報, 2005 年

[その他]