

## 試験研究成果普及情報

| 部門  | 野菜            | 対象         | 研究      |
|---|---------------|------------|---------|
| 課題名：イチゴの葉から簡易に DNA を抽出できる、PVPP を利用したガラス繊維ろ紙挿入チップ法の開発  |               |            |         |
| [要約] ポリビニルポリピロリドン (PVPP) を加えた磨砕緩衝液を利用したガラス繊維ろ紙挿入チップ法を用いることで、イチゴの葉から PCR に利用可能な品質の DNA を簡易に抽出できる。これにより、イチゴの品種改良や品種識別を目的とした DNA マーカーによる鑑定において、多数の検体を処理することが可能となる。 |               |            |         |
| フリーワード <sup>*</sup> イチゴ、DNA 抽出、PVPP、ガラス繊維ろ紙、品種改良  |               |            |         |
| 実施機関名   | 主 査           | 農林総合研究センター | 生物工学研究室 |
|   | 協力機関          | 農林総合研究センター | 野菜研究室   |
| 実施期間  | 2012年度～2016年度 |            |         |

## [目的及び背景]

近年、イチゴの品種改良や品種識別に DNA マーカーが利用されるようになりつつある。これらの作業では多数の検体を扱うため、簡易で迅速な DNA 抽出法が必要である。しかし、イチゴにはポリフェノール等 DNA 抽出を阻害する物質が含まれているため、簡易な方法では実験に必要な品質の DNA を抽出することが困難であった。そこで、ガラス繊維ろ紙挿入チップ法を改良し、イチゴにも利用可能な簡易 DNA 抽出法を開発する。

## [成果内容]

- 1 イチゴの葉から簡易に DNA を抽出する方法を開発した (表 1)。
- 2 ポリフェノールを選択的に吸着する物質ポリビニルポリピロリドン (以下、PVPP) を、磨砕緩衝液に 50mg/ml となるように加えることで、ガラス繊維ろ紙挿入チップ法により PCR に利用可能な品質の DNA を抽出することができる (表 1、図 1、2)。
- 3 イチゴにおいて、従来のガラス繊維ろ紙挿入チップ法を用いると実験に必要な品質の DNA を抽出することが困難であったが、本手法を用いることで十分な品質の DNA を抽出でき、迅速に多数の検体の処理が可能となる。

## [留意事項]

DNA 抽出の材料としては、若く新鮮な葉を使うことが望ましい。

## [普及対象地域]

県内全域の研究機関・指導機関

## [行政上の措置]

## [普及状況]

[成果の概要]

表 1 PVPP を利用したガラス繊維ろ紙挿入チップ法の手順

| ステップ              | 操作   | 備考  |
|-------------------|--|---|
| (ガラス繊維ろ紙挿入チップの準備) |  |   |
| 1                 | ガラス繊維ろ紙を抽出緩衝液に浸漬した後、乾燥させる。   | ・抽出緩衝液 (20mM Tris-HCl(pH8.0)、2mM EDTA-Na <sub>2</sub> 、10% 亜硫酸ナトリウム)  |
| 2                 | ろ紙を 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 (図 1)。                              | ・この状態で室温保存が可能である。   |
| (DNA 抽出)          |  |   |
| 3                 | イチゴの葉を 8 mm 角に切断し、200 μL の磨砕緩衝液、破砕用ビーズとともに 2ml チューブに入れ、多検体細胞破砕装置で 45 秒間破砕する。 | ・PVPP がポリフェノール類を吸着する。<br>・磨砕緩衝液 (200mM Tris-HCl(pH7.5)、25mM EDTA-Na <sub>2</sub> 、250mM 塩化ナトリウム、0.5% SDS、10% 亜硫酸ナトリウム、50mg/ml PVPP) |
| 4                 | インキュベーターを用いて、破砕液を 65°C で 10 分間保温する。  |   |
| 5                 | 微量高速遠心機を用いて、13,000G (約 12,000 回転)、20°C で 3 分間遠心する。                           | ・PVPP を沈殿させることで、吸着したポリフェノール類とともに溶液から除去する。   |
| 6                 | 7 μL の上清を、チップに挿入したろ紙に吸収させる。  | ・マイクロピペットに装着する前のチップをホルダーにセットし、装着する側からガラス繊維ろ紙に上清を吸収させる (図 1)。  |
| 7                 | ろ紙を挿入したチップをマイクロピペットにセットする。   |   |
| 8                 | 100 μL の固定液を、チップに 2 回出し入れする。   | ・DNA をガラス繊維ろ紙上に固定する。<br>・固定液 (100mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM EDTA-Na <sub>2</sub> 、7M グアニジン塩酸)  |
| 9                 | 1 分間、室温で静置する。  |   |
| 10                | 150 μL の洗浄液を、チップに 10 回出し入れする。  | ・ガラス繊維ろ紙上から、DNA 以外の成分を除去する。<br>・洗浄液 (50mM Tris-HCl(pH8.0)、5mM EDTA-Na <sub>2</sub> 、200mM 塩化ナトリウム、60% エタノール)                        |
| 11                | 洗浄液を 10 回出し入れするごとに新しい洗浄液に交換しながら、ステップ 10 の操作を 4 回繰り返す。                        | ・洗浄液の出し入れは、ステップ 10 と合わせて合計 50 回になる。   |
| 12                | 150 μL の 70% エタノールを、チップに 10 回出し入れする。   | ・ガラス繊維ろ紙に付着した洗浄液を除去する。  |
| 13                | 100 μL の 1/10 TE バッファーを、チップに 10 回出し入れする。                                     | ・ガラス繊維ろ紙から DNA を溶出する。<br>1/10 TE バッファー (1mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1mM EDTA-Na <sub>2</sub> )   |
| 14                | ステップ 13 で得られた溶液を PCR の鋳型 DNA 溶液として使用する。                                      | ・溶液は、冷蔵または冷凍保存する。   |

ガラス繊維ろ紙 200  $\mu$ L マイクロピペットチップ

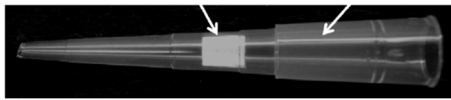


図1 ガラス繊維ろ紙挿入チップ

- 注1) 市販の200  $\mu$ L マイクロピペットチップの先端を5 mm程度切除し、抽出緩衝液を処理したガラス繊維ろ紙を挿入したもの
- 2) ステップ6で上清をガラス繊維ろ紙に吸着させる際は、ピペットに装着する部分(右側)から細いチップを装着したピペットを挿入して、ろ紙に上清を吸収させる
- 3) ステップ8以降、固定液等の溶液を処理する際は、本チップをマイクロピペットに装着して先端部分(左側)から溶液の出し入れを行う

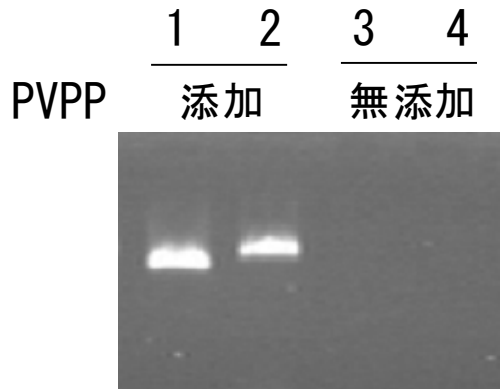


図2 イチゴ葉からのDNA抽出において、破碎緩衝液へのPVPPの添加がPCRに及ぼす影響

- 注) レーン1、2: DNA抽出時の破碎緩衝液にPVPPを含む。レーン3、4: DNA抽出時の破碎緩衝液にPVPPを含まない。レーン1、3: DNAマーカーPGPA-RSAI(N)を使用。レーン2、4: DNAマーカーCYT-BsaBI(N)を使用

[発表及び関連文献]

Manabu Watanabe, Masanobu Fukami. Modification of the filter-inserted tip method for simple and rapid DNA extraction from strawberry. Plant Biotechnology, vol.33, p133-136 (2016)