

## 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落花生からの簡易迅速 DNA抽出法			
[要約] 本法は、落花生に適用できるよう改良した、ガラス繊維濾紙挿入チップによる DNA抽出法である。低コストで簡易迅速であるこの手法を活用することにより、落花生育種における DNAマーカー選抜の効率化が図られる。			
キーワード：落花生、育種選抜、DNAマーカー、ガラス繊維濾紙、DNA抽出法			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター・生産環境部・植物工学研究室	
	協力機関	農林総合研究センター・育種研究所・畑作物育種研究室・ 落花生試験地、(財)かずさディー・エヌ・エー研究所	
実施期間	2008年度～2010年度		

### [ 目的及び背景 ]

育種の選抜作業では、多数の交配集団から有用な遺伝子をもった個体を DNAマーカー技術で判定する手法が実用化されている。DNAマーカーを利用して選抜する場合、多数の個体各々から DNAを抽出する必要がある。夾雑物の多い落花生においては、これまで開発された様々な方法では、簡単な操作で再現性の高い判別結果が得られる DNAが抽出できず、DNAマーカーを利用する際の障害のひとつとなっている。このため、迅速かつ高い再現性が得られる DNA抽出法を開発した。

### [ 成果内容 ]

- 1 簡易で迅速な DNA抽出法として、イネで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 (Fukami et al, 2008) がある。本法はこの方法を落花生に適用するため、濾紙に付着させる磨砕液の量を減らし、洗浄回数を追加するよう改良した DNA抽出法である。この方法では、落花生の葉を材料に DNAマーカーを使った簡易かつ迅速な判別が可能である (表 1、図 1、図 2)。
- 2 本法で落花生の育種交配系統 160～170 個体から DNAを抽出し、DNAマーカーにより脂肪酸関連遺伝子に変異した個体の判別を行ったところ、97～98% のサンプルを判別することができ、再現性の高い結果が得られる DNA抽出法として広く育種選抜に利用できる (表 2)。
- 3 本法は、従来用いられてきた DNA抽出法に比べて煩雑な操作が不要で、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。このため、省力化と約 60% 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、材料費は 1 サンプル当たり約 50 円であり、市販の DNA抽出キットと比較して安価である。

### [ 留意事項 ]

本法は、DNAマーカーによる育種選抜に利用するだけでなく、DNAによる品種判別に利用す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(落花生)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、200μLのマイクロピペットチップの中に挿入し、使用するまで常温で保存する。
2. 調べたい落花生の葉を約1cm<sup>2</sup>切断し、150μLの磨砕緩衝液(20mM Tris-HCl(pH8)、2mM EDTA-Na、10%亜硫酸ナトリウム)とともに磨砕する。
3. 磨砕した液4μLをマイクロピペットで吸い上げ1.で作製したチップの濾紙に付着させる。
4. そのチップで固定液(100mM Tris-HCl(pH8)、10mM EDTA-Na、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-Na、200mM塩化ナトリウム、60%エタノール)を吸い上げ、ゆっくり2回出し入れし、洗浄液を吸い上げた状態で20秒間静置した後、ゆっくり2回出し入れする。同様の操作を新しい洗浄液を用いて、合計5回繰り返す。
6. 上記と同様な操作を洗浄液の代わりに70%エタノールを用いて1回行う。
7. 100μLの1/10TE液(1mM Tris-HCl(pH8)、0.1mM EDTA-Na)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2 ガラス濾紙挿入チップ法(落花生)で得られたDNAを用いたDNAマーカー判別結果

注) 適用例として脂肪酸合成関連遺伝子のDNAマーカーによる判別結果を示した

白い筋が上にあるサンプルが野生型

下にあるサンプルが変異型と判定する

表2 ガラス濾紙挿入チップ法(落花生)によるDNAマーカー判別成功率

使用DNAマーカー	供試サンプル数	判別できたサンプル数	判別成功率(%)
マーカー A	170	167	98
マーカー B	160	155	97

注) 脂肪酸合成関連遺伝子に連鎖する2種類のDNAマーカー(A、B)の判別結果を示した

表3 ガラス濾紙挿入チップ法(落花生)の所要時間<sup>1)</sup>

方法	所要時間(分)	対照比(%) <sup>3)</sup>
ガラス濾紙挿入チップ法	29	43
市販のキット <sup>2)</sup>	67	

注) 1)16サンプルの処理時間

2)Q社のDNA抽出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 ]

Masanobu Fukami, Yasunori Muramoto, Kazuo Chkoshi, Rapid and simple DNA extraction method from rice using a glass-fiber filter inserted pipette tip, Plant Biotechnology 25, 493-496(2008)

[ その他 ]

さらに、葉の磨砕液をガラス繊維濾紙に付着させる方法を変更し、不純物の除去を行う工程を変更したことで、不純物の影響が比較的大きいとされている落花生からのDNA抽出を再現性よく行えるようになった。

表2 ガラス濾紙挿入チップ法（落花生）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
170	167	98%

注) 脂肪酸合成関連遺伝子の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（落花生）の所要時間<sup>1)</sup>  
方法 所要時間(分) 対照比(%)<sup>3)</sup>

ガラス濾紙挿入チップ法	29	43
市販のキット <sup>2)</sup>	67	

注 1)10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