

(参考資料 8)

DNA分析による米飯品種の識別

独立行政法人食品総合研究所

※DNAの増幅と電気泳動による分離・検出の方法については
参考資料 3 「DNA分析による稲品種の識別」を参照

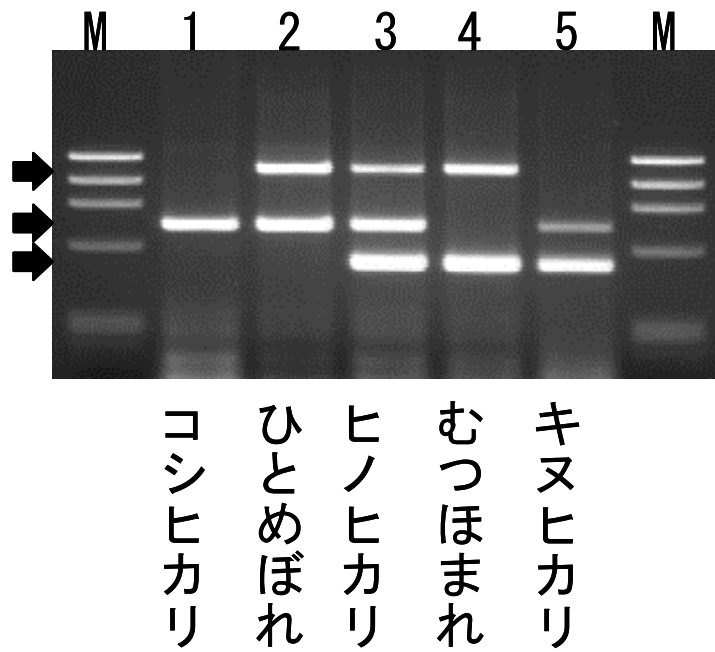
1 米飯一粒からの DNA 抽出方法 (酵素法)

- (1) 米飯 1 粒を 1.5ml 容量のプラスチックチューブに採り、抽出 Buffer^{*1} 300 μ l を加え、米飯をチップの先で細かく潰す。
- (2) 15mg/ml となるよう滅菌蒸留水で溶解した α -アミラーゼ (*Bacillus licheniformis* 由来、Sigma 社製) 10 μ l を加え、80°C で 1 時間放置する。
- (3) 33 μ l の 2% SDS^{*2}、及び 20 μ l の Proteinase K (20mg/ml) を加え 55°C で 1 時間放置する。
- (4) 遠心分離 (15,000rpm、1 分間) を行う。
- (5) 沈殿物を吸い上げないように上清を新しいロック付き 2ml チューブ (エッペンドルフ社製) に移し、2~2.5 倍量の冷却エタノール^{*3}を加え、手でゆっくり転倒混和し、氷上に 15 分間静置する。
- (6) 遠心分離 (15,000rpm、4°C、15 分間) し、沈殿を TE^{*4} 300 μ l で溶解する。
- (7) 1 μ l の RNase A (10mg/ml) を加え、55°C で 1 時間放置する。
- (8) PCI^{*5} 300 μ l を加え、ローテーター (15 分間/分) で 15 分間攪拌する。
- (9) 遠心分離 (15,000rpm、4°C、15 分間) し、上清を新しいロック付き 2ml チューブに移す。
- (10) 等量の PCI^{*5} を加え、ローテーター (15 分間/分) で 15 分間攪拌する。
- (11) 遠心分離 (15,000rpm、4°C、15 分間) し、上層を新しいロック付き 2ml チューブに移し、すぐに氷に漬ける。
- (12) その後、上清に 2~2.5 倍の冷却エタノール^{*3}を加え、手でゆっくりと転倒混和し、その後氷上に 10 分間静置する。
- (13) 遠心分離 (15,000rpm、4°C、15 分間) し、沈殿を冷却 70% エタノール^{*6} 50 μ l で洗浄する。
- (14) 遠心分離 (15,000rpm、4°C、15 分間) を行う。
- (15) 上清を除去しエタノール臭がなくなるまで自然乾燥する。このとき、沈殿を失わないように注意する。
- (16) 沈殿に 1/10 TE^{*7} 30 μ l を加え、静置にて overnight で溶解後、静かにピペッティングを行い、均質化する。
- (17) 操作 (16) で得られた溶液を 50~100 倍に希釈後、吸光度計にて 260nm、および 280nm における吸光度を測定する。
- (18) 4°C で保存する。

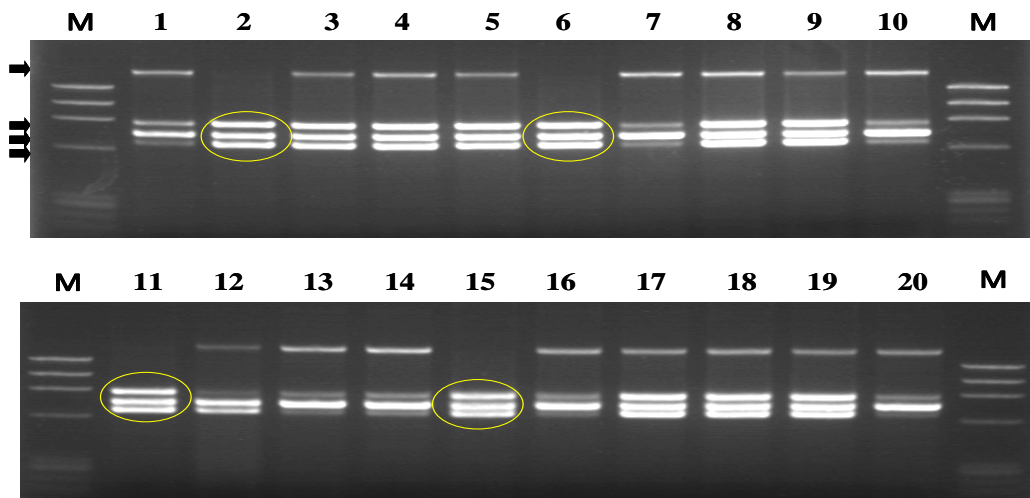
- (19) $OD_{260}=1$ の場合、 $50\mu\text{g/ml}$ として、工程 (17) で得られた測定値から DNA 濃度を計算する。なお、 OD_{260}/OD_{280} の値が $1.8\sim 2.0$ であれば、タンパク質はほぼ除かれていると考えられる。

試薬調製

- *1 抽出 Buffer : 1 M Tris-HCl (pH8.0) 10ml と 5 M NaCl 2ml を混合し、蒸留水で 100ml に fill up しオートクレーブ後室温保存
- *2 2% SDS : Dodecyl Sulfate sodium salt 2g を蒸留水にて溶解し、100ml に fill up し、 $0.22\mu\text{m}$ フィルターにて濾過滅菌、室温保存
- *3 冷却エタノール : エタノール (99.5V%、特級) を -20°C フリーザーにて保存
- *4 TE : 1 M Tris-HCl (pH8.0) 10ml と 0.5 M EDTA (pH8.0) 2ml を添加し蒸留水で 1,000ml に fill up、オートクレーブ後室温保存
- *5 PCI : フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25/24/1、v/v/v) をよく混合し、遮光、 4°C 保存する。(水層が分離するまで静置)
中性フェノール : 市販フェノール (特級) を 65°C で融解し、8-ヒドロキシキノリンを $0.05\sim 0.1\%$ (w/w) 程度の濃度になるよう添加し、等量の 1 M Tris-HCl (pH8.0) を加え激しく混合する。水層 (上層) を除去し水層の pH が 7.5 以上になるまでこの操作を繰り返す。等量の 0.1 M Tris-HCl (pH8.0) を加え混合し、2,000rpm、5 分間遠心後冷暗所に保存し、酸化して赤みの帯びたものは使用しない。
- *6 冷却 70% エタノール : エタノール (99.5V%、特級) 70ml を滅菌蒸留水 100ml に fill up 後、 -20°C フリーザー保存
- *7 1/10TE : TE を 10 倍希釈する。



米飯一粒試料による品種判別結果の例



コシヒカリポジキットによる市販おにぎりのPCR結果

M：分子量マーカー、コシヒカリ：2, 6, 11, 15、ひとめぼれ：3, 4, 5, 8, 9, 17, 18, 19、はえぬき：1, 7, 10, 13, 14, 16, 20、ヒノヒカリ：12