

コシヒカリの判別

著者	大橋 和義
雑誌名	技術報告
巻	19
ページ	61-64
発行年	2014-03-10
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00008045

コシヒカリの判別

大橋 和義

技術部 教育支援部門

1. はじめに

本研修では、我々日本人にとって最も身近な食物である「うるち米」(以下コメ)を試料として、そのコメが、コシヒカリか他品種なのかを SNP (一塩基多型) を利用して判別する実験を行った。実験には、DNA 抽出、PCR、電気泳動など遺伝子実験を行う上で必須の技術を組み込んだ。本研修で利用した PCR 法は食品検査、農業など様々な分野で利用されている技術である。本研修では、遺伝子や PCR などの先端技術を身近な食物であるコメを通して学ぶことを目的とした。

なお本研修は、物質工学科 3 年生対象の「物質工学実験 II」で実際に行われている実験内容を簡易的にした実験である。

2. 基本概念

2.1 SNP (SNPs)

Single Nucleotide Polymorphism の略で、一塩基多型と訳される。

DNA は 4 つの塩基が連なってできており、その塩基の並び方は、例えばイネであればほぼ同じであるが、品種間においてわずかに異なる部分が存在する。個体間における 1 塩基の違い、その異なる部分を SNP という。(下図参照)

今回の実験では、マルチプレックス PCR 法によって、SNP の部分の違いを上手く検出することにより、コメの個体差を分類する。

塩基配列における SNP の例

品種1	ATGGTC	C	CTTGA	ACT	A	AGGTAG	G	GCTAGG
品種2	ATGGTC	C	CTTGA	ACT	G	AGGTAT	T	GCTAGG
品種3	ATGGTC	C	CTTGA	ACT	A	AGGTAT	T	GCTAGG
品種4	ATGGTC	C	CTTGA	ACT	G	AGGTAG	G	GCTAGG
品種5	ATGGTC	T	CTTGA	ACT	A	AGGTAG	G	GCTAGG
品種6	ATGGTC	T	CTTGA	ACT	G	AGGTAT	T	GCTAGG

↑ SNP I ↑ SNP II ↑ SNP III

SNP 例

2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

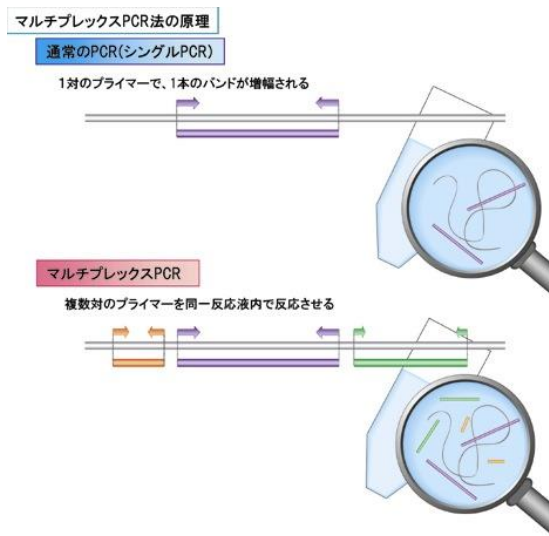
PCR 法は、短時間かつ簡便に目的とする DNA 断片を大量に増幅する技術である。この技術は特定の遺伝子配列を人工的に増幅できるため、バイオサイエンスの研究において不可欠な技術となっている。

さらに PCR 法は、病原菌感染の検査や遺伝子組換え食物 (GM 食品) 混入の検査といった医療や食品の安全管理の分野、DNA 鑑定などの犯罪捜査などにも応用されており、その用途は多岐にわたっている。

PCR法では、増幅したい塩基配列の両端に相補的な、20塩基前後のオリゴヌクレオチド鎖からなるプライマーを足がかりとし、耐熱性DNAポリメラーゼを用いてDNA塩基配列を増幅していく。この操作は3段階の温度変化を経て行われ、それを繰り返すことで大量のDNA塩基配列が得られる。

2.3 マルチプレックスPCR

上手く設計されたプライマー対を複数用意してPCRを行うと、1つのDNAから複数種のDNA断片を複製することができる。異なる個体のDNAでは、塩基配列が異なるのでプライマーが結合する位置も異なる。その結果、複製されるDNA断片の種類（大きさ）が個体により異なる固有なものになる。



PCRとマルチプレックスPCR

2.4 電気泳動によるDNAの解析

DNA断片は、リン酸が負の電荷 (-) を持つため、陽極 (+) と陰極 (-) を持つ装置内に置くと陽極側に移動する。これを利用してゲルの中にDNA断片を置くと、移動するDNA断片とゲルとの間に抵抗力が働き、移動速度に差が生じる。その結果、一定時間後には、DNAのサイズに応じた移動距離にDNAのバンドが確認される。

今回用いた、マルチプレックスPCR法で複製されたDNA断片は、大きさの異なる数種類の断片がそれぞれ異なる移動距離を持つため、試料固有のバンドが観察される。

これを、適当な参照試料と比較することにより、DNAが何由来のものなのか解析することができる。

3. 実験方法

試薬は、GM quicker 2 (ニッポンジーン) とコシヒカリ判別キット (株コッケン) を使用した。

試料として、研修参加者に普段食している精米を数粒持参してもらい、試料とした。

3.1 コメ一粒からDNAを抽出

- ① コメ一粒を厚く折り重ねた (4回折、16枚重ね) アルミホイルで包み、ラジオペンチを用いてできるだけ粉々に粉碎し、コメ粉末試料を調整する。
- ② 1.5ml マイクロチューブにコメ粉末試料を入れ、GE1 Buffer を $250\mu\text{l}$ 、Proteinase K を $10\mu\text{l}$ 、RNase を $5\mu\text{l}$ 加える。

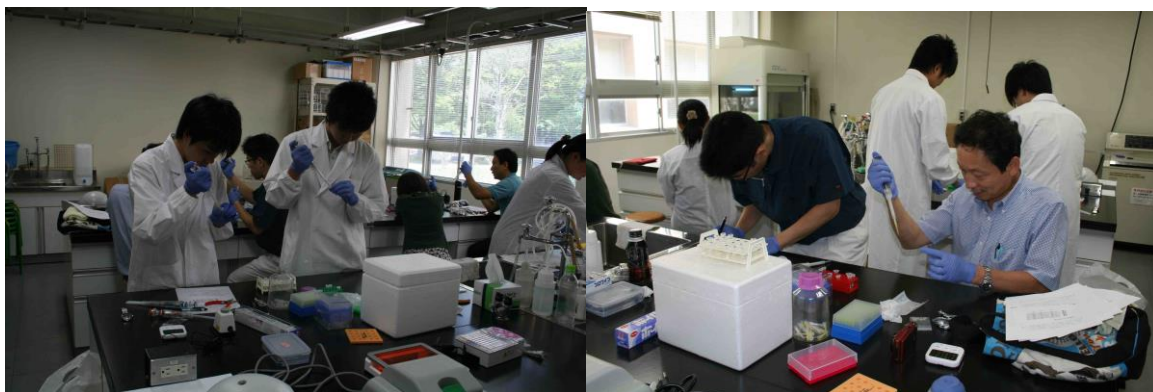
- ③ ボルテックスミキサーで 60 秒間攪拌する
- ④ 60°Cで 15 分間加温する。
- ⑤ GE2-K Buffer を 40 μ l 加え、ボルテックスミキサーでよく混ぜる。(30 秒)
- ⑥ 遠心分離する。(≥13,000rpm、5 分間、室温)
- ⑦ 上清 200 μ l を新しい 1.5ml マイクロチューブに移す。
- ⑧ GB3 Buffer を 75 μ l 加える。
- ⑨ イソプロパノールを 75 μ l 加える。
- ⑩ フタをし、10~12 回チューブを上下に回転させ、よく混ぜる。
- ⑪ ⑩で得られた混合液全量をスピнкаラムに移す。
- ⑫ 遠心分離する。(≥13,000rpm、30 秒間、室温)
- ⑬ ろ液を廃棄する。
- ⑭ GW Buffer を 650 μ l 加える。
- ⑮ 遠心分離する。(≥13,000rpm、60 秒間、室温)
- ⑯ ろ液を廃棄する。
- ⑰ スピнкаラムを新しい 1.5ml マイクロチューブに付け替える。
- ⑱ TE (pH 8.0) を 50 μ l 滴下する。
- ⑲ 室温で 3 分間静置。
- ⑳ 遠心分離する。(≥13,000rpm、60 秒間、室温)
- ㉑ ろ液を回収。これを DNA 溶液とする。

3.2 PCR

- ① PCR PreMix が入った 1.5ml が各班に 1 本あることを確認する。
(これ以降④まで氷上で作業する)
- ② これを 15 μ l ずつ PCR チューブ 8 本に分ける。
- ③ 各チューブにサンプル溶液を 10 μ l ずつ、それぞれに加える。
- ④ 準備してある PCR 装置にチューブをセットする。
- ⑤ PCR を開始 (約 2 時間)
- ⑥ PCR 終了後、電気泳動へ

3.3 電気泳動による増幅バンドパターンの確認

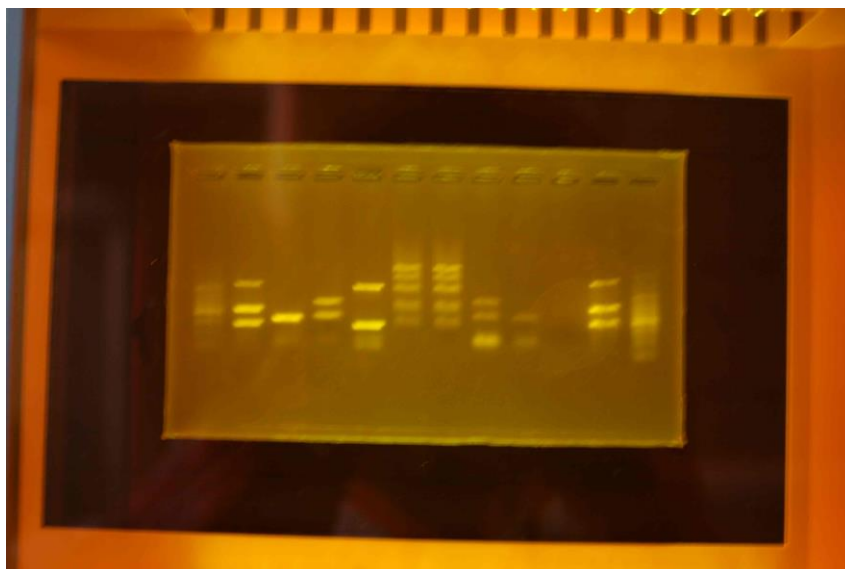
- ① 電気泳動用 Buffer で満たした電気泳動装置に、ゲルをセットする。
ウェル (試料を入れる穴) が一側になるように注意する。
- ② PCR が終わったそれぞれのサンプルに、ローディングバッファを 4 μ l ずつ加え、ピペッティングでよく混ぜる。混ぜた後ウェルに 10 μ l ずつ静かに注入する。
- ③ 分子量マーカーをアガロースゲルのウェルに 10 μ l ずつ静かに注入する。
- ④ 100V で電気泳動する。
- ⑤ 青色色素がゲルの端から 3cm 程度に移動するまで電気泳動を続ける。
- ⑥ 電気泳動終了後、ゲルを観察する。



研修風景

4. 結果

参加者ほぼ全員バンドを観察することができた。



結果の一例

5. 謝辞

本研修に参加された、森内良太・剣持太一・安原裕子・黒川正明・太田諭之・大石武則・江上智恵
上田瑞恵（敬称略）の皆様がこの紙面を借りてお礼申し上げます。