

水産物からの簡易 DNA 抽出の検討

井伊 悠介, 小岩 智宏, 足立 静香
Yusuke Ii, Tomohiro Koiwa, Shizuka Adachi

要 約

水産物の種判別等に用いる PCR-RFLP 法において、DNA 抽出に要する時間短縮等のため、スピнкаラムを用いたキットに代わる簡便な操作で実施できる抽出法を複数の水産物を用いて検討した。DNA の精製工程においてスピнкаラム、クロロホルムのような劇物、エタノール沈殿法を用いることなく、1つのマイクロチューブ内で試料と2種類の試薬(溶解液と Proteinase K)を混合・加温し、得られた液を希釈することで水産物の種判別等に適用できる DNA の抽出が可能であった。その結果、キットによる方法に比べて、20～25%の時間で PCR-RFLP 分析に利用できる DNA を抽出することができた。

1. はじめに

独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) では DNA 分析により水産物の種判別等の検査を実施している。現在、水産物のほとんどの品目において、スピнкаラムを用いた DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) による DNA 抽出を行っているところである。

スピнкаラムを用いたキットは、PCR 阻害物質が除去された DNA を抽出・精製できる一方で、抽出操作は煩雑である。具体的には、試料の溶解後に複数の試薬を添加した後に、この液をスピнкаラムに負荷し、不純物を取り除くためのバッファーを加え、最後に溶出バッファーにより精製された DNA をスピнкаラムより溶出させる。これらの操作には、試薬添加やスピнкаラムへの溶液負荷のピペッティング以外にも複数回の遠心分離やスピнкаラムを新しいマイクロチューブへの移動等を伴う。このため、DNA 抽出に時間を要し、多数の検体を扱う場合は、操作の煩雑さのために、コンタミネーションや試料の取違いを生じる恐れがある。これらの問題点を解決するために、抽出 DNA の純度が良好でなくても、操作工程が少ない簡便な方法により抽出された DNA を用いて検査することが可能となれば、より迅速に検査を行うことができる。

以上のことを踏まえ、本研究では、スピнкаラムを用いたキットより使用試薬の種類が少なく、スピнкаラムやエタノール沈殿法を用いない3種類の簡易な DNA 抽出法を検討し、PCR-RFLP に供する十分な量の PCR 産物量が得られる PCR 条件を検討した。

2. 実験方法

2. 1 試料

試料として生鮮食品3品目（アサリ、シジミ、マグロ）、加工食品3品目（アジ加工品、サバ加工品、タコ加工品）の合計6品目を用いた。アサリは閉殻筋を、シジミは斧足部を用いた。加工品は表面に調味液等が付着している場合は、滅菌水で洗い流し、余分な水分を産業用ワイパーで取り除いてから用いた。

2. 2 DNA抽出

2. 2. 1 キット法 (DNeasy Blood & Tissue Kit)

プロトコルを一部変更して次のとおり DNA 抽出を行った。試料を採取したマイクロチューブに Buffer ATL を 180 μ L、20 mg/mL Proteinase K 溶液を 20 μ L 添加し、56 $^{\circ}$ C で 2 時間以上加温し、その間適宜かくはんしながら試料を溶解させた後、100 mg/mL RNaseA 溶液 (Qiagen) を 4 μ L 添加し、56 $^{\circ}$ C で 5 分間加温した。次に、Buffer AL を 200 μ L 加えてかくはんし、さらにエタノール (99.5) を 200 μ L 加えかくはんした。この溶液の全量を mini spin column に負荷し、6000 rcf 以上で 1 分間遠心分離を行い、DNA 等を mini spin column に吸着させた。この mini spin column を新しいマイクロチューブに設置し、Buffer AW1 を 500 μ L 負荷し、6000 rcf 以上で 1 分間遠心分離を行い、mini spin column の洗浄を行った。この mini spin column を新しいマイクロチューブに設置し、Buffer AW2 を 500 μ L 負荷し、20000 rcf 以上で 3 分間遠心分離を行い、mini spin column の洗浄を行った。溶出液が付着しないように mini spin column を注意して取り出し、新しいマイクロチューブに設置した。Buffer AE を 100 μ L 負荷し、3 分以上静置した後に、6000 rcf 以上で遠心分離を行い、溶出液を得た。Buffer AE の負荷と遠心分離を繰り返し 2 回行うことで得た 200 μ L の溶出液を抽出 DNA 溶液とし、PCR の鋳型 DNA に用いた。

2. 2. 2 簡易抽出法 (テイル溶解液)

試料を採取したマイクロチューブに、試料 1 mg 当たりテイル溶解液 (ナカライテスク) を 20 μ L、20 mg/mL Proteinase K 溶液 (関東化学) を 1.5 μ L 添加し、56 $^{\circ}$ C で 40 分間以上加温し、その間適宜かくはんした。次に、85 $^{\circ}$ C で 10 分間静置して Proteinase K を失活させた。

2. 2. 3 簡易抽出法 (GenCheck[®] DNA Extraction Reagent)

試料を採取したマイクロチューブに、試料 1 mg 当たり GenCheck[®] DNA Extraction Reagent (以下「GenCheck」という。ファスマック) を 21.5 μ L 添加し、95 $^{\circ}$ C で 40 分間以上加温し、その間適宜かくはんした。次に、4 $^{\circ}$ C で 5 分間以上静置した。

2. 2. 4 簡易抽出法 (水酸化ナトリウム)

試料を採取したマイクロチューブに、試料 1 mg 当たり水酸化ナトリウム水溶液を 21.5 μ L 添加し、95 $^{\circ}$ C で 40 分間以上加温し、その間適宜かくはんした。水酸化ナトリウム水溶液の濃度は岸根・奥西¹⁾を参考にし 50 mM とした。

2. 2. 5 簡易抽出法により得られた DNA の希釈

抽出 DNA 溶液の上清を TE バッファー (pH 8.0) で 1 (希釈せず)、5、10、25、50、100、200 倍に希釈して PCR の鋳型 DNA に用いた。

2. 3 PCR-RFLP 及びアガロースゲル電気泳動

品目ごとに設定された条件 (プライマー配列、PCR サイクル条件、制限酵素の種類等) による PCR-RFLP を行った。Taq ポリメラーゼは AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase (以下「Ampli Taq Gold」という。Thermo Fisher Scientific)、又は TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (以下「TaKaRa Ex Taq HS」という。タカラバイオ)を用い、サイクル数は 35 サイクル、又は 45 サイクルとした。鋳型 DNA 量は原則、PCR 反応液の 1/10 量とした。増幅対象部位はミトコンドリア DNA の一部分であり、目的の増幅長はアサリ 283 bp、シジミ 888 bp、アジ 360 bp、サバ 505 bp、マグロ 915 bp、タコ 432 bp である。

アガロースゲル電気泳動は 0.5 µg/mL の臭化エチジウムを含む 3 %アガロースと TBE バッファーにより電気泳動を行った。アガロースは、アガロース S (ニッポンジーン)、又はアガロース KANTO HC (関東化学) を用いた。

3. 結果及び考察

3. 1 簡易抽出法における試料の溶解

テイル溶解液による抽出においては、試料の全てもしくは一部の溶解が目視により確認できた。GenCheck、水酸化ナトリウムによる抽出においては、目視による観察では試料の溶解はほとんど確認できなかった。

3. 2 PCR-RFLP 産物の電気泳動による 3 種類の簡易抽出法の比較

アサリ、シジミは TaKaRa Ex Taq HS により、アジ加工品、サバ加工品、マグロは AmpliTaq Gold により 35 サイクルの PCR-RFLP を行った。結果を図 1 に示す。

テイル溶解液により抽出した DNA を用いた場合、抽出 DNA 溶液の上澄みの 1、5、10 倍希釈では PCR 産物が確認できず、25 倍以上希釈したもので PCR 産物が確認された。アジ加工品、サバ加工品、マグロは、キット法により抽出した DNA からの PCR 産物に比べ薄い傾向であった。GenCheck により抽出した DNA を用いた場合、アサリ、シジミでは希釈倍率によらず PCR 産物が確認された。アジ加工品、サバ加工品は 5 から 200 倍希釈で、マグロは 5 から 25 倍希釈で PCR 産物が確認されたが、キット法により抽出した DNA による PCR 産物量と比べると非常に少ない結果であった。水酸化ナトリウムにより抽出した DNA を用いた場合、アサリ、シジミでは希釈倍率によらず PCR 産物が確認された。アジ加工品においても PCR 産物が確認されたが、キット法により抽出した DNA による PCR 産物量と比べると非常に少ない結果であった。サバ加工品、マグロでは PCR 産物が確認できなかった。

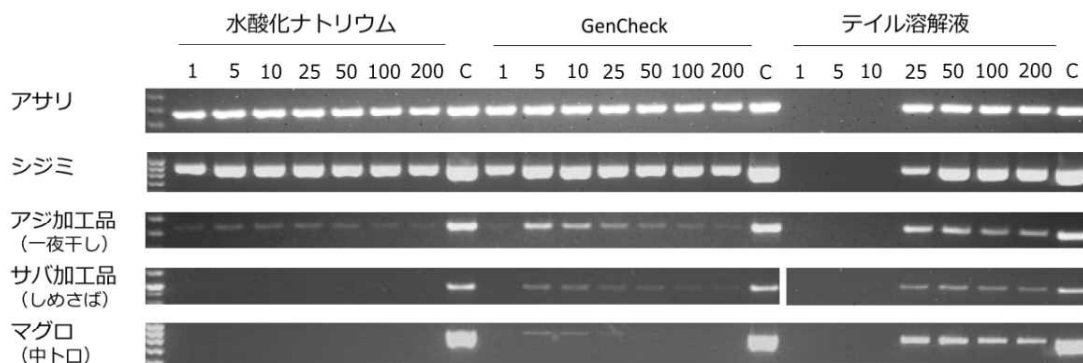


図1 3種類の簡易抽出法により得られたDNAのPCR産物の比較

アサリ、シジミは TaKaRa Ex Taq HS により、アジ加工品、サバ加工品、マグロは Ampli Taq Gold を用いて PCR を行った。C は DNeasy Blood & Tissue Kit により抽出した試料からの DNA の PCR 産物を示す。1、5、10、25、50、100、200 は希釈倍率を示す。

テイル溶解液で抽出した DNA は、1、5、10 倍希釈では PCR 産物が生じなかったが、これは鋳型 DNA にテイル溶解液が含まれる場合、希釈して用いるとされていることから²⁾、テイル溶解液には PCR を阻害する物質が含まれており、この濃度を薄めることで、PCR 増幅が可能になると思われた。

サバ加工品やマグロのように、GenCheck 又は水酸化ナトリウムによる抽出 DNA では PCR 産物がほとんど確認できない品目があったことから、品目に関わらず同一の方法で簡易抽出を行う場合を考えると、3 種類の方法のうちテイル溶解液の方法が適していると考えられた。

3. 3 簡易抽出したDNAのためのPCR条件の検討

アサリ、シジミ、アジ加工品、サバ加工品、マグロ、タコ加工品からキット法により抽出した DNA と簡易抽出法（テイル溶解液）により抽出した DNA を 50 倍に希釈したものをを用いた。Taq ポリメラーゼは、Ampli Taq Gold 及び TaKaRa Ex Taq HS を用いた。サイクル数は 35 サイクルとし、簡易抽出法による DNA については 45 サイクルでも実施した。結果を図 2 に示す。

2 種の Taq ポリメラーゼの違いによる PCR 増幅量を比較すると、サイクル数と抽出方法が同じであれば、いずれの品目でも Ampli Taq Gold に比べ TaKaRa Ex Taq HS による PCR において、より多くの PCR 産物が得られ、その結果 RFLP が明瞭に観察される傾向にあった。特に、シジミ、サバ加工品、タコ加工品でその傾向が顕著であった。アサリ及びタコ加工品においては Ampli Taq Gold を用いた場合、サイクル数を 35 サイクルから 45 サイクルに増やすことで PCR 産物の増加が認められたが、その産物量はアサリにおいては TaKaRa Ex Taq HS による 35 サイクルのものと同程度で、タコ加工品においては TaKaRa Ex Taq HS による 35 サイクルのものより少なかった。これらの結果から、簡易抽出法による鋳型 DNA と PCR 条件の組み合わせでは Taq ポリメラーゼは Ampli Taq Gold より TaKaRa Ex Taq HS が適していると考えられた。

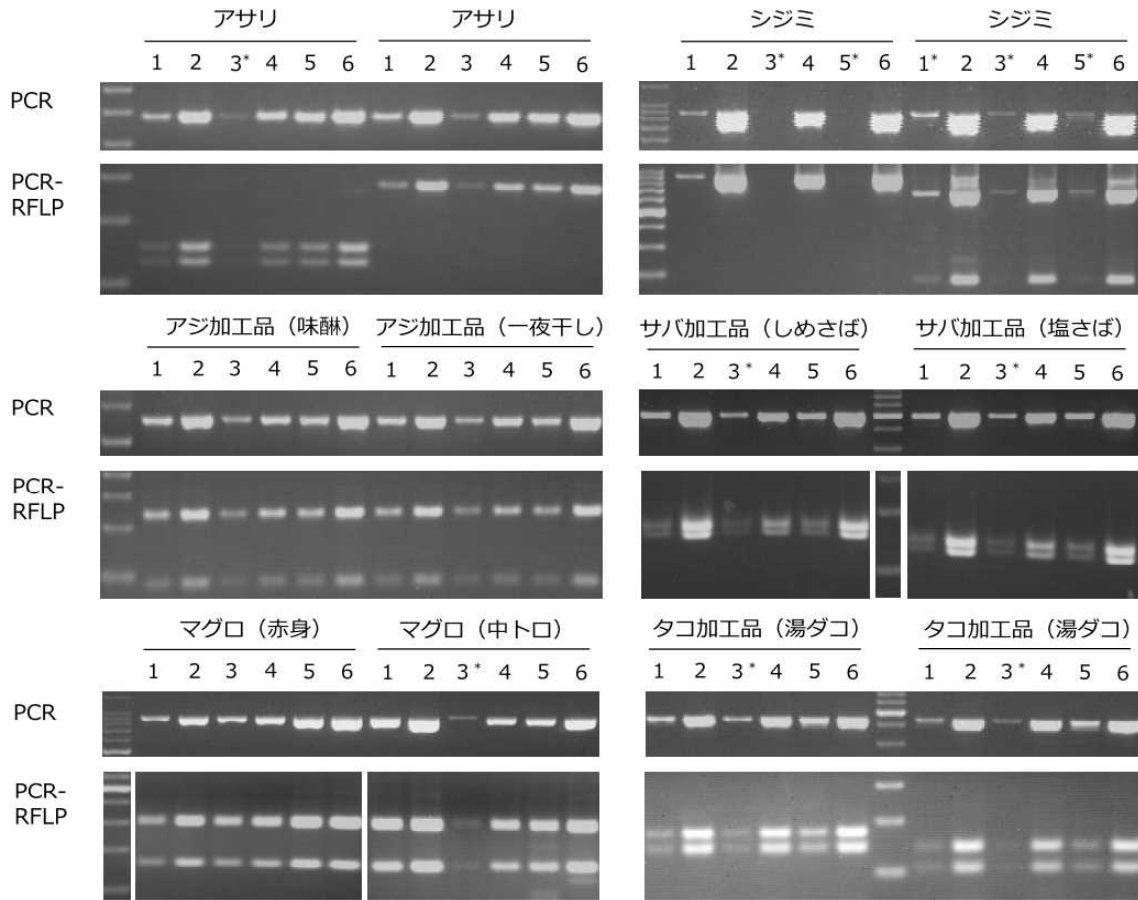


図 2 DNeasy Blood & Tissue Kit 及びテイル溶解液により抽出された DNA による PCR-RFLP 産物の電気泳動図

1～6のPCR等の条件（鋳型DNAの抽出試薬、Taqポリメラーゼ、サイクル数）は下記のとおり。レーン番号に付した*はPCR-RFLP産物が特に薄い、もしくは観察されない試料を示す。

- 1 DNeasy Blood & Tissue Kit、Ampli Taq Gold、35 サイクル
- 2 DNeasy Blood & Tissue Kit、TaKaRa Ex Taq HS、35 サイクル
- 3 テイル溶解液、Ampli Taq Gold、35 サイクル
- 4 テイル溶解液、TaKaRa Ex Taq HS、35 サイクル
- 5 テイル溶解液、Ampli Taq Gold、45 サイクル
- 6 テイル溶解液、TaKaRa Ex Taq HS、45 サイクル

3. 2で GenCheck や水酸化ナトリウムによるマグロの簡易抽出 DNA について Ampli Taq Gold を用いて PCR を行った場合、その増幅は良好ではなかった（図1）。よって TaKaRa Ex Taq HS による PCR で良好な増幅結果が得られるかを調査した結果（図3）、水酸化ナトリウム及び GenCheck から得た抽出 DNA では、アサリやシジミのような良好な PCR 増幅（図1）は生じなかった。水酸化ナトリウムによる抽出 DNA ではほとんど PCR 産物を得ることができず、また GenCheck による抽出 DNA では50倍以上に希釈したテイル溶解液による PCR 産物の方が量が多い結果であったことから、TaKaRa Ex Taq HS を用いた場合でも簡易抽出法はテイル溶解液による方法が適していると思われた。GenCheck で抽出した DNA を TaKaRa EX Taq HS により PCR に供した場合、シジミ等では1倍希釈、

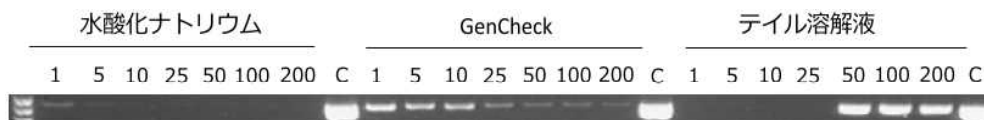


図3 3種類の簡易抽出法により得られたマグロからのDNAの TaKaRa Ex Taq HS による PCR 産物の比較

マグロは中トロを用いた。CはDNeasy Blood & Tissue Kitにより抽出した試料からのDNAのPCR産物を示す。1、5、10、25、50、100、200は希釈倍率を示す。

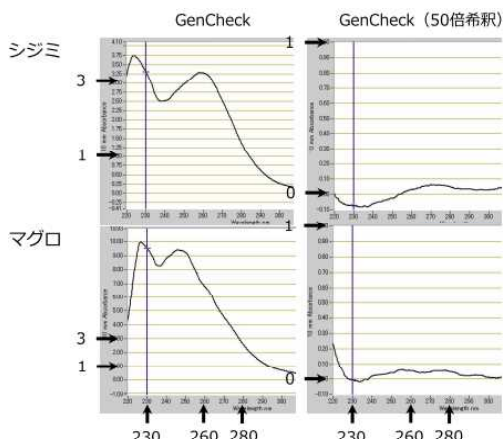


図4 GenCheckにより簡易抽出されたシジミ及びマグロのDNA溶液の吸収スペクトル

X軸：波長 (nm)、Y軸：吸光度

50倍希釈でも同程度のPCR産物量である一方で(図1)、マグロでは1倍希釈より50倍希釈のPCR産物量は少ない傾向であった(図3)。GenCheckにより抽出したシジミとマグロのDNAの吸収スペクトルを図4に示す。ともに、希釈することで、DNA以外の物質の濃度も減少し、希釈後の吸収スペクトルはほとんど同じと思われるが、シジミのように希釈してもPCR産物量が変わらない場合とマグロのように希釈することでPCR産物量が減少する場合がある理由是不明である。簡易抽出では精製操作がないことから、抽出DNA溶液に試料由来のPCR阻害物質が含まれている可能性が考えられたので、希釈した抽出DNA溶液もPCRに用いて検討し

たが、テイル溶解液の1～10もしくは1～25倍希釈以外においては(図1及び図3)、希釈によるPCR産物の増加はほとんど確認されなかった。

3. 4 使用量を同一にしたテイル溶解液による簡易DNA抽出

2. 2. 2の簡易DNA抽出法において、テイル溶解液とProteinase K溶液の使用量は試料の採取量に応じて変更している。抽出操作の工程はキット法に比べ簡易であるが、試料ごとに試薬の添加量を変更する作業には労力を要する。そこで、異なる試料量において、添加する試薬量が同一でもPCR増幅が得られるかを調査した。

採取した試料について、その量によらず、20mgの試料の抽出に用いる量に相当する、400μLのテイル溶解液と30μLのProteinase K溶液により抽出を行い、50倍に希釈したものをTaKaRa Ex Taq HSによるPCRに供した。用いた試料量の範囲等は表1のとおりである。また、これらの試料とは別に2. 2. 2のとおり、1mg当たり20μLのテイル溶解液と1.5μLのProteinase K溶液により抽出し、50倍に希釈したものをコントロールに用いた。結果の一部を図5に示す。採取した試料の量は、最小量と最大量で5～35倍の違いがあったが、他の4試料も含めて、いずれもコントロールと同程度の量のPCR産物が観察された。

表 1 テイル溶解液による簡易抽出の試薬量の検討のために採取した各試料の量

試料	n=	試料量					
		平均値(mg)	標準偏差(mg)	RSD(%)	最小量(mg)	最大量(mg)	最大量/最小量
アサリ	33	20	13	67	4	46	12
シジミ	43	19	16	82	2	69	35
アジ加工品 (味醂)	18	27	19	71	4	57	14
アジ加工品 (開き)	18	26	19	73	4	61	15
サバ加工品 (しめさば)	18	30	20	67	4	68	17
サバ加工品 (味醂)	18	28	17	62	3	56	19
サバ加工品 (味噌漬け)	18	30	19	61	5	60	12
マグロ (中トロ)	18	38	17	46	9	70	8
マグロ (赤身)	18	37	18	48	13	71	5

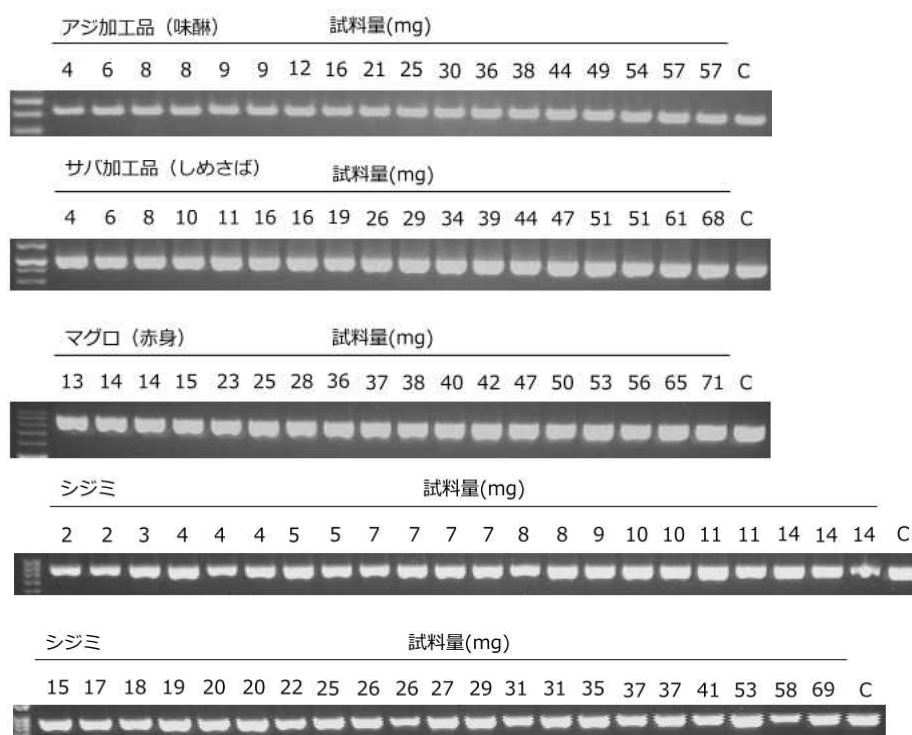


図5 テイル溶解液の添加量を同一にして試料から抽出された DNA の PCR 産物の電気泳動図

C は、試料 1 mg 当たり、200 μ L のテイル溶解液と 1.5 μ L で抽出した試料からの DNA の PCR 産物を示す。

DNA の抽出効率や、抽出液中の DNA や夾雑物の濃度を一定にすることで、異なる試料量でも同程度の PCR 産物量が得られることを想定して、試料量に応じた試薬量で抽出を行ったが、テイル溶解液及び Proteinase K 溶液の添加量は試料量に関わらず一律でも、同等の結果が得られることが分かった。従ってある試料量の範囲では試薬の添加量を試料量ごとに変更する必要がなく、より効率的な抽出操作が可能と考えられた。

3. 5 テイル溶解液の利点及び評価

本調査研究においてテイル溶解液により簡易抽出された6種類の水産物のDNAのいずれにおいてもPCR増幅が可能であることが確認された。DNeasy Blood & Tissue Kitは溶解液中のDNAや夾雑物をスピнкаラムに吸着させることで、DNAの精製を行うものであるが、スピнкаラムの容量が固定されているためか、試料量が25 mgを超えると収量が低下するとされている³⁾。スピнкаラムの容量が固定されているため試料量には制約がある一方で、今回検討したテイル溶解液による簡易抽出法は幅広い範囲の試料量に対応できることから、少量の試料採取が簡便に実施できる。さらに用いる試薬数や操作工程が少なく、スピнкаラムの使用やエタノール沈殿の必要がなく全体的に操作が簡便であり、ピペティング操作の回数も少ないことからコンタミネーションのリスク軽減も期待できる。なお、今回のテイル溶解液による鋳型DNAは4℃で1ヶ月保存した後でもPCRに供することが可能である。

今回検討したテイル溶解液による簡易抽出法と似た工程による、魚介類からの簡易抽出法にEstoupら⁴⁾の方法がある。これは100～200 meshの陽イオンをキレート化する樹脂とProteinase Kを含む溶液中で55℃で60分間かくはんした後に、15分間100℃で熱して得られた上清をPCRの鋳型DNAとする方法である。要する時間も今回検討したテイル溶解液による方法と大きくは異ならないが、筋肉部位の供試料は1 mm³であることが求められる⁴⁾。一方でテイル溶解液による今回の方法は、少量の決まった量の試料採取ができなくても、上で述べたように問題なく抽出できることから、より簡便な実用的な方法と考えられる。

これらのことに加え、16～96検体のDNA抽出に要する時間はDNeasy Blood & Tissue Kitによる方法(2.2.1)では約240～600分であるのに対して、テイル溶解液による方法(2.2.2)は約60～110分(約20～25%相当)であり、試薬に要する費用はDNeasy Blood & Tissue Kitによる方法では約470円であるのに対して、テイル溶解液による簡易抽出法(試料20 mg時)は約85円(約20%相当)であることから、テイル溶解液による簡易DNA抽出は、検査に実用的であり、簡便で安価なDNA抽出法と考えられる。ただし、簡易抽出法はDNAの純度が劣ることから、PCR増幅が生じない試料の場合は、キット法によるDNA抽出を行うといった対応が必要と考えられる。

4. まとめ

水産物の種判別等に用いるPCR-RFLP法において、DNA抽出に要する時間短縮等のため、スピнкаラムを用いたキットに代わる簡便な抽出法を複数の水産物を用いて検討した。その結果、テイル溶解液を用いてDNA抽出を行い、TaqポリメラーゼとしてTaKaRa Ex Taq HSを用いたPCRによりPCR-RFLP分析が可能であった。この簡易DNA抽出法により、従来のDNeasy Blood & Tissue Kitを用いた方法に比べ、約20～25%の時間でDNA抽出が可能となった。

5. 文献

1) 岸根雅宏, 奥西智哉. (2011). LAMP法を利用したコシヒカリの高精度・迅速識別. 日本

食品科学工学会誌, 58(12), 591-596.

- 2) 「テイル溶解液」, Specially Prepared Reagents. BULLETIN, L-115. ナカライテスク.
(<https://www.nacalai.co.jp/products/handling/pdf/BULLETIN-L-115-110310.pdf>)
- 3) 「DNeasy® Blood & Tissue Handbook」, July 2006, Qiagen
- 4) Estoup, A., Largiader, C. R., Perrot, E., Chourrout, D. (1996). Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular marine biology and biotechnology*, 5(4), 295-298.