

食品からのDNA抽出とPCRによる組み換え遺伝子の検出

岡山県立川上農業高等学校 中川陽介

1 はじめに

平成 14 年 8 月に筑波大学遺伝子センターで行われた新産業技術等指導者養成講習に参加し、教育用キットを用いた遺伝子組み換え実験及び食品からの DNA 抽出と PCR による組み換え遺伝子の検出についての実験並びに教育現場で組み換え DNA 実験を教える意義及び指導すべき事柄などに関する教育研修を受けた。

この内容を科目「生物工学」「生物工学」の授業に取り入れ、新技術の導入による魅力的な授業展開として平成 15 年度より実施した。

2 目的

遺伝子組み換え農作物の必要性やその安全性、また許可されるまでの検査や手続きなどについて理解させる。また、実験に教育用キットを用いて遺伝子組み換え実験及び食品からの DNA 抽出と PCR による組み換え遺伝子の検出など基本的な技術を体験させ、生命科学への興味・関心を深める。

3 実験

(1) 食品からの DNA 精製と PCR による組み換え遺伝子の検出

ア 食品からの DNA 精製について 表 1

この実験では、表 1 のようにトウモロコシ葉、油揚げや冷凍コーンなど市販されている大豆製品を用い 1 区から 7 区に設定した。

食品からの DNA 精製

番号	試料
1区	トウモロコシ葉
2区	トウモロコシ葉(マークさせた)
3区	油揚げ
4区	冷凍コーン
5区	クラッカー
6区	みそ汁
7区	組換えダイズ粉

試薬は、イソプロパノールや 70% エタノールの他に DNA 精製キットに付属した試薬を使用した。

< 方法 >

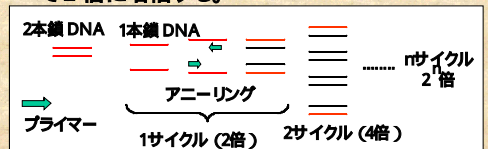
- ・食品をすりつぶしマイクロチューブに取る。
- ・タンパク質分解酵素を加え、激しく混ぜる。
- ・遠心分離後、DNA の含まれる水層を取り出す。
- ・磁気粒子を入れて DNA を吸着した後、磁気スタンドに立て余分な液体を捨てる。
- ・70% エタノールで磁気粒子の DNA を洗い、滅菌蒸留水を加えて DNA 溶液として回収する。

イ PCR による特異的 DNA 断片の増幅 表 2

PCR とは、耐熱性の DNA ポリメラーゼを用いて表 2 のように連鎖反的に DNA

() PCRによる特異的DNA断片の増幅

" PCR (Polymerase Chain Reaction) とは DNA ポリメラーゼを用い連鎖反的に DNA を増幅する。
" 1 サイクルで標的 DNA は 2 倍。よって、n サイクルで 2^n 倍に増幅する。



を増幅させる方法である。1 サイクルで標的 DNA は 2 倍になる。従って、n サイクルで 2^n 倍に増幅する (表 2) ことになる。 表 3

35 S プロモーターは、現在ほとんどの遺伝子組み換え作物に用いられているため、150bp の遺伝子が検出されたら遺伝子組み換えされたものであると判断できる (表 3)。

標的 DNA 増幅

- 278bp:ゼイン
トウモロコシの DNA の有無
- 118bp:レクチン
ダイズの DNA の有無
- 150bp:35S プロモーター
遺伝子組み換え体の判断
- 217bp:内部標準
PCR の成否確認

ウ 電気泳動による分析

PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動後、DNA を染色してUV照射下でバンドとして検出し、バンドサイズと濃さを比較して組み換え遺伝子の有無を判定する。電気泳動を行うにあたり、作成したゲルのウェルにサンプルを入れ、同時に DNA 分子サイズマーカーを入れた。

エ 実験結果

写真 2 のようになった。表 4 をもとに 150bp が組み換え遺伝子を表す。

1 区と 8 区はコントロール、2 区と 4 区は組み換えトウモロコシ、3 区と 7 区は非組み換え大豆の DNA が含まれ

ることが分かった。5 区は DNA 精製が不十分で油分が多く残ったため PCR が正常に反応しなかった。油揚げのような加工食品からも DNA を精製し PCR による検出を行うことができるが、一部のものは精製が不十分で PCR が阻害された。また、6 区は PCR は正常であったが、DNA がうまく取り出せなかったものと思われる。加工食品の製造過程において DNA が分解されて DNA を精製できない可能性がある。

オ 5 区・6 区の失敗原因と改善策

(ア) 5 区のクラッカーは油分等の不純物が多く、また、DNA も分解されている可能性も大きい。

そこで、同じクラッカーから多く精製し、それを回収して通常より濃度の濃いサンプルを作成することにした。

(イ) 6 区のみそは、こうじ菌によって発酵してできたものででんぷんを多く含み、糖がじゃまをした可能性もあるため、滅菌水でみそを洗いサイズ破片を回収して材料とした。

カ 再実験の結果

表 5 のようにみそ、クラッカーとも DNA をバンドとして確認すること

ことができ成功といえる。

これによって、植物だけでなく加工食品からでも DNA を精製し PCR による遺伝子の検出ができることが分かった。

今回の遺伝子検出は定性試験であり 0.1% 混入でも検出できるが、日本の規定では 5% 以下の混入は非遺伝子組み換えとなるので、定量試験を行う必要がある。また、150bp の標的 DNA CaMV 35 S promoter は遺伝子組み換えのものではなく、植物に感染しているウイルスを検出した可能性もあるため別の検定結果とあわせて解釈する必要がある。

4 まとめ

DNA 実験を授業に導入することにより、生徒の興味・関心は高まり、長時間の実験にもかかわらず前向きな姿勢を見ることができた。また、今日的課題となってる組み換え食品など、自分たちの食に対する関心も深まった。

今後の課題となった定量試験についても新技術を導入し継続的に研究を進めていきたい。

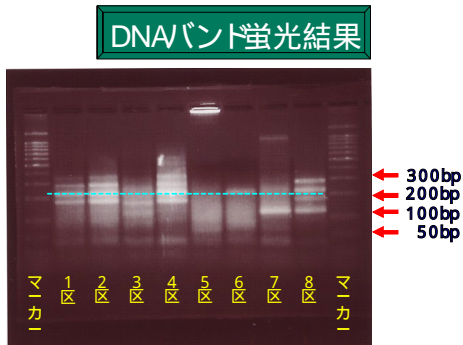


写真 2

表 4

結果

区	278bp	217bp	150bp	118bp	判定結果
1区					市販種子使用
2区				x	組換えトウモロコシ
3区	x		x		非組換えダイズ
4区				x	組換えトウモロコシ
5区	x	x	x	x	PCR反応してない
6区	x		x	x	DNA抽出失敗
7区	x		x		非組換えダイズ
8区					コントロール

	278	217	150	118	
1					コントロール
2	x		x		味噌
3	x		x		味噌
4	x		x		味噌
5	x			x	クラッカー
6	x			x	クラッカー
7	x			x	クラッカー
8					コントロール

