

スピナートリッジ核酸抽出キットを用いた大豆加工食品におけるDNA抽出精製法の検討

保健科学部

津田元彦 三浦泉 藤原美智子 立野幸治

はじめに

厚生労働省通知¹⁾の組換えDNA技術応用食品の検査方法では、DNA抽出法としてCTAB法、シリカゲル膜タイプキット法などが用いられている。

CTAB法は、応用範囲が広い上、PCR阻害物質が残存しにくく、純度の高いDNAを得ることができる非常に優れた方法であるが、フェノール、クロロホルムという有害試薬を用いること、煩雑な精製操作及び時間が必要という欠点がある。これらの欠点を解消するためには、検体によりシリカゲル膜タイプのものなどのDNA抽出キットを用いることが可能である。

近年、DNA抽出キットは応用範囲が広い様々なタイプのキットが開発されて市販されており、動物組織等を対象としたDNA抽出キットでも植物の高品質のDNAが抽出可能と推測された。

そこで、大豆加工食品について、動物組織用DNA抽出キットとして市販され特殊な極めて薄いフィルターを用いた多孔質メンブレン膜タイプキットによるDNA抽出法（多孔質メンブレン膜タイプキット法）を厚生労働省通知¹⁾のDNA抽出法（CTAB法、シリカゲル膜タイプキット法）と収率、純度、PCRの効率等について比較検討したので報告する。

実験方法

1. 試料及びキット等

表1に示す大豆加工食品10検体（原材料名に大豆が記載されている食品）を試料とした。試料は、多孔質メンブレン膜タイプキット法（A法）で10mg、CTAB法（B法）及びシリカゲル膜タイプキット法（C法）で2gを使用した。

2. 試薬

試薬等はすべて特級、多孔質メンブレン膜タイプキットはFUJI QuickGene SP Kit²⁾、シリカゲル膜タイプキットはQIAGEN DNeasy Plant Mini Kitを用いた。

3. 操作法

各DNA抽出法は、厚生労働省通知¹⁾またはキット付属のマニュアルに従い、装置は、(株)島津製作所製 核酸蛋白質分光光度計 BioSpec-mini, Applied Biosystems社製G

eneAmp PCR System 9700, 東洋紡績(株)製 GelMate 2000を用いた。A法については図1に示した。

抽出したDNAは、定性PCRを行い、Le1遺伝子の検出と更にRRS遺伝子の検出を試みた。

表1 試料（大豆加工食品）

試料番号	検体名(品名)
No. 1	FF SOY Flour Standard(0.3% w/w GMO)
No. 2	調合味噌
No. 3	たれ（だし）
No. 4	こいくちしょうゆ
No. 5	ウスターソース
No. 6	味つけ油あげ
No. 7	豆乳飲料
No. 8	豆腐
No. 9	風味かまぼこ(かに風味)
No. 10	凍り豆腐

結果

各DNA抽出法によるDNA収量、精製度及び定性PCR(Le1, RRS)の結果を表2に示した。

A法の精製度は、他の厚生労働省通知¹⁾のB法、C法に比べて1.7を大きく下回るものがあり、DNA収量は、A法の試料の使用量が200分の1のためB法、C法に比べて低くなった。

再度、A法をPCR検査に適したDNA収量と精製度に改善するため、DNA抽出キットで処理可能な検体量（200mg）に増量した改良A法を、DNA収量の少ない試料No. 3と4で試みた。結果は、精製度は約1.7、DNA収量は約0.5 μ g/mlと改善したが、DNA収量はまだ不足しており、更にDNA収量を増やすためには抽出用チューブの大容量化などキット本体の改良の必要性が示唆された。

定性PCR結果では、Le1遺伝子についてB法、C法で検出できなかった試料があったが、A法はDNA収量が少ないにもかかわらず全試料で検出でき、良好な結果（図2）となった。

RRS遺伝子の結果も、A法はB法、C法で検出できなかった試料からも検出され、A法が大豆加工食品のDNA抽出

に適していると考えられた。

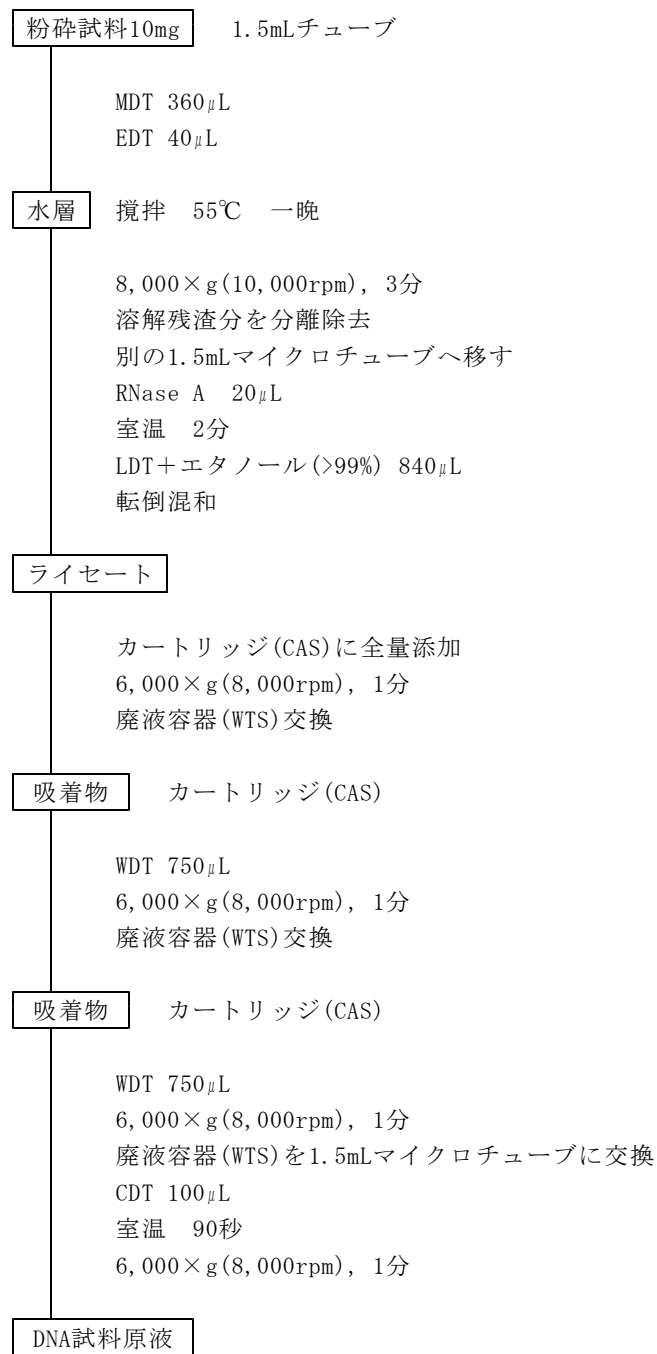
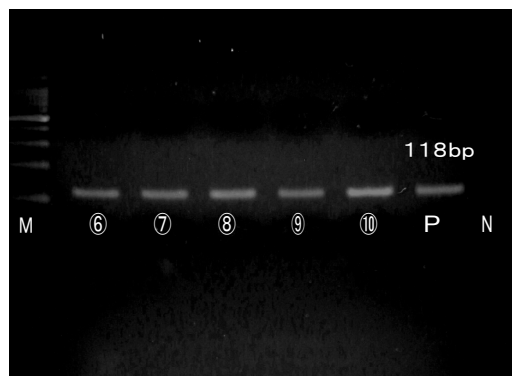
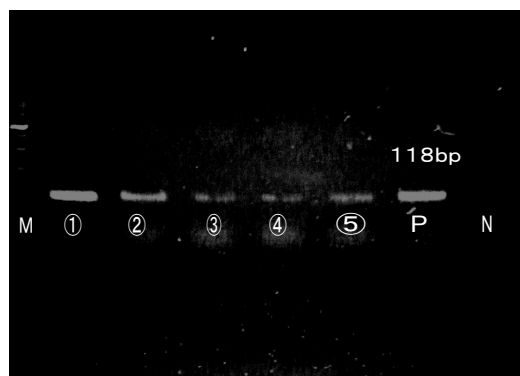


図1 A法の操作フロー

表2 各DNA抽出法の結果 (n=3, 平均値)

試料番号	A法 多孔質メンブレン膜タイプキット法 検体量10mg				B法 CTAB法 検体量2g 厚生労働省通知法				C法 シリカゲル膜タイプキット法 検体量2g 厚生労働省通知法			
	DNA濃度 (ng/μl)	260nm /280nm	定性PCR		DNA濃度 (ng/μl)	260nm /280nm	定性PCR		DNA濃度 (ng/μl)	260nm /280nm	定性PCR	
			Le1	RBS			Le1	RBS			Le1	RBS
No. 1	20.76	1.75	+	+	101.37	1.85	+	+	78.52	1.80	+	+
No. 2	1.34	1.45	+	+	7.90	1.83	+	-	36.95	1.91	-	-
No. 3	0.09	1.96	+	+	2.55	1.49	-	-	2.58	1.89	+	-
(検体量200mg)	0.42	1.72)										
No. 4	0.03	0.75	+	-	4.88	5.17	+	-	1.36	1.95	-	-
(検体量200mg)	0.51	1.69)										
No. 5	0.23	1.09	+	-	9.14	1.45	-	-	15.67	1.42	+	-
No. 6	1.51	1.75	+	-	2.20	1.61	+	-	12.12	1.86	+	-
No. 7	0.46	2.02	+	-	3.61	1.85	+	-	34.56	1.91	+	-
No. 8	9.48	1.90	+	-	36.93	1.87	+	+	139.15	1.91	+	-
No. 9	2.10	1.89	+	+	28.06	1.75	+	-	44.80	1.84	+	-
No. 10	7.15	1.94	+	+	16.44	1.87	+	+	138.66	1.89	+	+

+ : 検出, - : 不検出



- ① No. 1 FF SOY Flour Standard
- ② No. 2 調合味噌
- ③ No. 3 たれ(だし)
- ④ No. 4 こいくちしょうゆ
- ⑤ No. 5 ウスターソース

- ⑥ No. 6 味つけ油あげ
- ⑦ No. 7 豆乳飲料
- ⑧ No. 8 豆腐
- ⑨ No. 9 風味かまぼこ(かに風味)
- ⑩ No. 10 凍り豆腐

M : DNA分子量マーカー

P : ポジティブコントロール

N : ネガティブコントロール

図2 PCR産物のアガロースゲル電気泳動 (Le1遺伝子)

まとめ

多孔質メンブレン膜タイプキット法(A法)は、膜厚は80 μ mとガラス繊維に比べ極めて薄く、高い吸着性能をもつとされる多孔質メンブレンによるDNA抽出法で、CTAB法(B法)に比べて操作が簡易で操作ミスを起こしにくく、一晚の攪拌(図1)を除けばDNA抽出に要する時間が少ない利点がある。

大豆加工食品の試験ではDNA収量、精製度が低いものがみられ、今後DNA収量を増やすためには抽出用チューブの大容量化などキット本体の改良の必要性が示唆された。

DNA収量が少ないにもかかわらず定性PCRで発酵食品を含む全試料のDNA検出ができており、今後、キットに改良を加えることにより有効な組換えDNA技術応用食品のDNA抽出法になると考えられる。

謝辞

本研究に当たり、核酸抽出キットを提供していただいた富士フィルム(株)ライフサイエンス事業部に深謝いたします。

文献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 食発第110号
：組換えDNA技術応用食品の検査方法について、平成13年3月27日
- 2) ホームページ <http://fujifilm.jp/business/lifescience/naisolation/quickgeneskit/index.html>