

遺伝子組換え食品からのDNA精製とPCRによる解析

By Rex Bitner, Ph.D., Susan Koller, B.S., and Hemanth Sheno, Ph.D., Terri Grunst, B.S., and Dan Kephart, Ph.D.
Promega Corporation



はじめに

世界中で、さまざまな遺伝子改変された農作物を食糧として使うことが承認されています(1)。遺伝子組換え作物(GMO)やその加工食品は、European Regulation on Novel Foods and Novel Food Ingredients (EC/258/97)(2)によって決定されているように、表示が義務付けられています。食糧がGMOであるかを定めるために一般的に承認されている方法は、遺伝子改変に使われたDNA配列の検出です。一例として、市販されている大豆の遺伝子改変には、glyphosate-resistant 5-enol-pyruvyl-shikimate-3 phosphate synthase (EPSPS) 遺伝子とEPSPS遺伝子の発現調節領域の導入が関わっています(3)。EPSPS遺伝子の発現調節領域は、カリフラワーモザイクウイルス(Cauliflower Mosaic Virus; CaMV)から得られた35Sプロモーターとnopaline synthase (NOS) 転写停止配列です。このようにPCR^(b)による35SとNOS配列の検出はGMO大豆の同定のために広く使われています。

現在、遺伝子改変された食物がさまざまな加工食品に使われているため、多目的なDNA精製システムが必要とされています。MagneSilTM Paramagnetic Particles^(c) (PMPs)を採用したWizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food^(d)では、さまざまなサンプルサイズに対応できる可変性と柔軟性を示し、さらに、BioSmart Allin 1.0 GMO Screening System、LabSystemsのKingFisherTM自動化ラボステーションと組み合わせた24サンプル同時処理が行えます。

食物からのDNA単離の結果

図1にWizard[®] DNA Purification System for Food を使ったDNA精製の概要を示しました。この手順は多くの食糧に適用できます。図2では、各200mgのサンプルからCTAB法、Wizard[®] Resin^(d)法(4)そしてWizard[®] Magnetic DNA Purification System for Foodを使った方法により抽出したDNAの比較を行っています。CTAB法は界面活性剤/クロロホルムを基にしたDNA精製方法です。Wizard[®] Magnetic DNA System for Foodではクロロホルムのような有機溶媒を必要としません。典型的に、これらの食物種から抽出された特有のDNAは約10-20kbであり、いくつかのサンプルでは1-10kbのスミアなバンドが見られます。

35SとNOS配列の検出と確認

商業的な原料から採られたDNAの品質は異なるため、DNA精製の再現性は、よく特長が知られている食物を標準品として評価します。0、0.1、0.5または2%のGMOを含んだFlukaのGMO標準品であるトウモロコシからWizard[®] DNA System for Food を使ってDNAを精製しました。200mgのサンプルを100μlで溶出し、それを用いてPCR反応を行った結果、トウモロコシサンプル(トウモロコシ粉末)では0.1%程度のGMO含有を検出できました(図3)。また増幅阻害剤が陰性を示す原因となることがあるため、陽性コントロールとしてクロロプラストのコントロールを実施しました。

食物サンプルの溶解液を調製するために、サンプルに以下の試薬を加えます。

- Lysis Buffer A
 - RNase A
 - Lysis Buffer B
 - Precipitation Solution
- 10分間の遠心を行う

溶解液の上清をMagneSilTM PMPsが入ったチューブに移す。イソプロパノールを加え、ボルテックスなどでよく攪拌する。

磁石でMagneSilTM PMPsを捕えた後、上清を廃棄し、磁石からチューブをはずす。

MagneSilTM PMPsをLysis Buffer Bで洗浄する。
MagneSilTM PMPsを70% ethanol wash solutionで3回洗浄する。
各洗浄ステップの後にはエタノールを除く。
MagneSilTM PMPsを乾かす。

MagneSilTM PMPsからDNAを溶出するために滅菌水を加える。
ボルテックスした後、インキュベートする。

磁石でMagneSilTM PMPsを捕える。

溶出されたDNAを新しいチューブに移す。

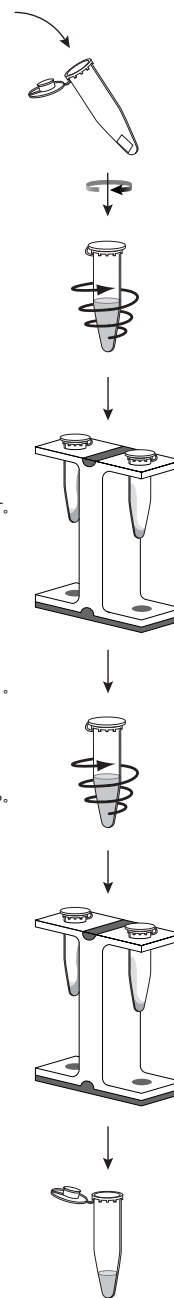


図1 . Wizard Magnetic DNA Purification System for Foodを用いたDNA単離の概要

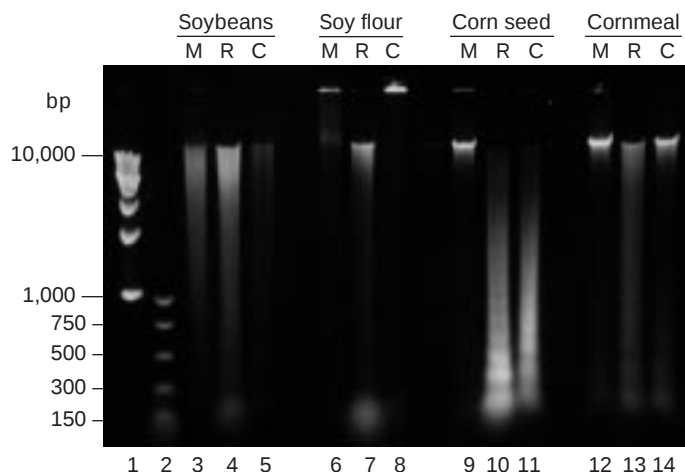


図2. 3つの方法を用いた食糧からのDNA単離

各200mgのすり砕いた大豆、大豆粉末、すり砕いたトウモロコシの種およびトウモロコシ粉末をサンプルとしてDNAを単離した。方法としてWizard® Magnetic DNA Purification System for Food (M)、Wizard® Resin (R) およびCTAB法 (C) を用いた。処理前に乾燥した大豆とトウモロコシは粉状にした。100μlの溶出液から10μlを1%アガロースゲルにロードし、エチジウムブロマイドで染色した。レーン1と2: 1kb DNA Step Ladder (カタログ番号G6941) およびPCR Markers (カタログ番号 G3161)

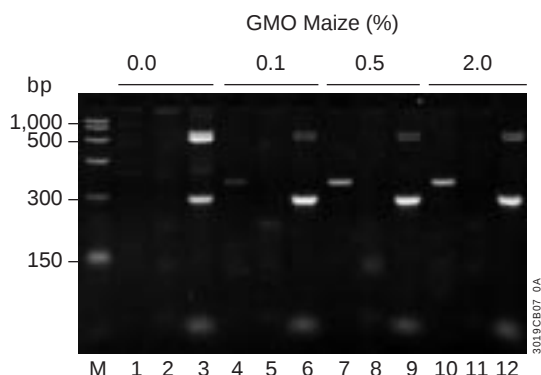


図3. PCR解析に使われたFluka参考用のDNA

図に示したGMO含有率のGMO作物から35Sプロモーター、NOSターミネーターおよびクロロプラスト陽性コントロールのPCR産物を作製した。100μl反応液から10μlを4% NuSieve® 3:1 アガロースゲルで解析した。35S (レーン1, 4, 7, 10), NOS (レーン2, 5, 8, 11), コントロール (レーン3, 6, 9, 12)。予想されたように0%のGMO含有率である標準品では35SおよびNOS配列は示されなかったが、クロロプラストコントロールは陽性だった。0.1%から2%の含有率である標準品のサンプルは、35S配列の明瞭さに幅がある増幅バンドを示し、NOS配列ではバンドが現れなかった。この試験により、Fluka参考用のトウモロコシ標準品では0.1%のGMO含有率を検出できることが示された。レーン1、PCR Markers (カタログ番号G3161)。

食材からの半自動化ゲノムDNAの単離

KingFisher™ instrument (LabSystems)を使ったWizard® Magnetic DNA Purification System for Foodの半自動化プロトコルを紹介します。表1の簡単な溶解手順に従うと、この機器では24個までの溶解されたサンプルから全く手作業が不要なゲノムDNAの単離が行えます。表2には96ウェルの準備とKingFisher™ instrumentに使う時のアッセイに必要なとされる溶液を示しています。さらに、図4には、KingFisher™ instrumentを使う時の自動化手順を示します。スーパーマーケットで購入した大豆粉末とトウモロコシ粉末からゲノムDNAを単離しました。

精製されたゲノムDNAは、Biosmart Allin 1.0 GMO Screening Systemを使ってGMO含有量を解析しました。このキットは35S CaMVプロモーター配列の増幅によるGMO材料の存在を検出するために連続した2種類のnested PCRを行います。1回目のPCRでは、5μlの単離されたDNAを反応液 (40μl Allin Mix 1 component, 5μl internal control template, 1unit Taq DNA polymerase (AmpliTaq®, Perkin Elmer))に加えます。反応液にミネラルオイルを上層し、サーマルサイクラーにセットします。サンプルを以下のサイクル条件を使ったBiosmart Allin 1.0のプロトコル(6)に推奨されるように増幅します。95 /3分間-40サイクル(95 /30秒-55 /40秒)-72 /3分間。1回目のPCR反応液から1μlを2回目のPCR増幅の鋳型として使います。2回目の反応は1μlの鋳型と49μlのAllin Mix 2と1unitのTaq DNA polymeraseです。nested PCR反応液にミネラルオイルを上層し、サーマルサイクラーにセットします。サンプルを以下のサイクル条件で増幅します。95 /1分間-45サイクル(95 /40秒-50 /40秒-72 /30秒)-72 /3分間。PCR反応液の一部を2.5%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイド染色を行いました(図5)。

Biosmart Allin 1.0 Systemでは、はじめに400ngの鋳型の使用を推奨します(6)。プロメガでは、検出限界は50ngの開始原料であることを発見しました (Promega Notes No.76、21ページ参照)。しかし、この検出限界はサンプルにより変動します。Biosmart Allin 1.0 Systemに含まれるトウモロコシや大豆に特異的なPCR primerを使っても増幅が行われない場合は、反応液中の鋳型が少なすぎることやDNAサンプル調製液中にPCR阻害剤が存在することを示唆します。そのため、検出限界はそれぞれのサンプルについて決定しなければなりません。

表1. 試料の溶解手順

1. 50mgの開始材料あたり125μl Lysis Buffer Aを加える
2. 5μl RNase A Solutionを加え、激しくボルテックスする
3. 50mgの開始材料あたり62.5μl Lysis Buffer Bを加え、激しくボルテックスする
4. 定期的にボルテックスしながら、室温で10分間インキュベートする
5. 50mgの開始材料あたり187.5μl Precipitation Solutionを加え、激しくボルテックスする
6. マイクロ遠心機を用いて、高速遠心を10分間行う
7. 上清を新しい1.5mlマイクロ遠心チューブに移す

表2. 96ウェルプレートでの列ごとの準備

列	内容
A	50μl サンプル溶解液 + 45μl isopropanol + MagneSil™ PMPs
B	100μl Lysis Buffer B
C	100μl 70% ethanol
D	100μl 70% ethanol
E	100μl 70% ethanol
F	100μl 70% ethanol
G	50μl Nuclease-Free Water

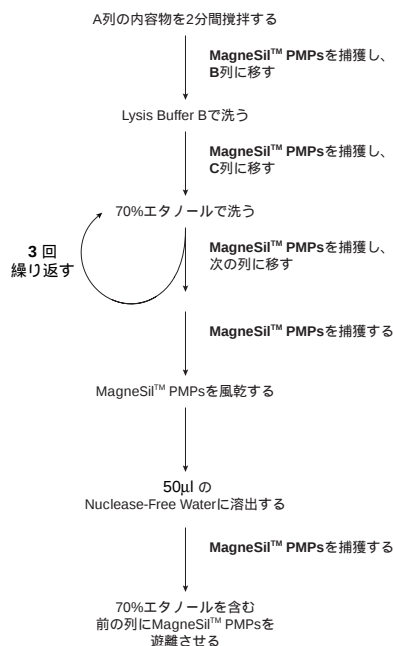


図4 . KingFisher™ instrumentを用いたDNAの単離の手順と機器及び試薬

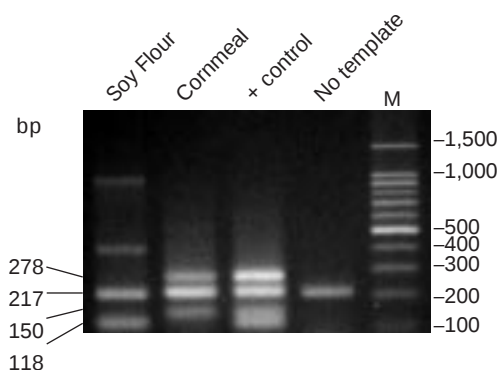


図5 . Biosmart Allin 1.0 GMO Screening Systemを用いたゲノムDNAのGMO解析

トウモロコシ粉末と大豆粉末から単離されたゲノムDNAがBiosmart Allin 1.0 GMO Screening Systemを用いて増幅された。nested PCRの産物から20μlを2.5%アガロースゲル電気泳動で解析し、エチジウムブロマイドで染色した。レーンM、100 bp DNA Ladder (カタログ番号G2101)。すべての反応は内部標準DNA鋳型で検定され、217bpの内部標準バンドを示すことが予想される。PCR産物は278bpのトウモロコシゼイン、150bpの35Sプロモーターおよび118bpの大豆レクチンが現れる。

結論

このように、Wizard® Magnetic DNA Purification Systemのマニュアルによるプロトコル及びKingFisher™ instrumentを組み合わせた半自動化DNA単離プロトコルとそのDNAを利用したBioSmart Allin 1.0 GMO Screening SystemによるGMOテストを紹介しました。このシステムは容量可変であり、多くのサンプルタイプに簡単に適用できます。また、導入された遺伝子の発現を駆動するために、商業的な作物で広く使われている35Sプロモーター領域を検出し、確認のための内部コントロール配列を同時に増幅します。

参考文献

- Hemmer, W. (1997) BATS Report 2/1997, Basel, Switzerland, ISSN 1420.
- Regulation (EC) No 258/97 (1997) *J. Eur. Comm. Novel Foods Food Ingred.* 43, 1.
- European Patent 0 546 090 BI (1996) *European Patent Office Bulletin* 25.
- Spoth, B. and Strauss, E. (1999) *Promega Notes* 73, 23.
- DG JRC Environment Institute, Consumer Protection and Food Unit. From Pietsch, K., Waiblinger, U., Brodman, P. and Wurz, A. (1997) *Deutsche Lebensmittel Rundschau* Heft 2, 35.
- Biosmart Manual for Allin 1.0 Part# GE024*, Biosmart molecular analytical laboratories.

製品紹介

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food	200 回分	FF3750	100,000
	400 回分	FF3751	165,000

製品内容

- Lysis Buffer A
- Lysis Buffer B
- RNase A
- Precipitation Solution
- MagneSil™ Paramagnetic Particles

特長

- 簡単操作 - 有機溶媒を使いません。
- 多目的 - いろいろな食物に使えます。
- 量可変 - どんなサンプル量にも適用できます。
- 高精製度 - そのままPCRに使えます。

製品紹介

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Biosmart Allin 1.0 GMO Screening System	3 × 20 回分	FF3730	165,000
	6 × 20 回分	FF3740	300,000

Wizard is a trademark of Promega Corporation and is registered with the U.S. Patent and Trademark Office. MagneSil is a trademark of Promega Corporation.

AmpliTaq Gold is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. Kingfisher is a trademark of LabSystems Oy. NuSieve and Reliant are registered trademarks of BioWhittaker Molecular Applications.

©U.S. Pat. No. 6,027,945.

©The PCR process is covered by patents issued and applicable in certain countries. Promega does not encourage or support the unauthorized or unlicensed use of the PCR process.

©Patent Pending.

©U.S. Pat. No. 5,658,548, Australian Pat. No. 689815 and other patents.