

## ピーマンにおける DNA 簡易抽出法の開発

木下哲次・杉田 亘・長田龍太郎・轟 篤  
(宮崎県総合農業試験場)

Tetsuji Kinoshita, Toru Sugita, Ryutarō Nagata, Atsushi Todoroki :  
Development of the DNA simple extraction method in sweet pepper

宮崎県はピーマンにおける病害抵抗性 DNA マーカーの開発を試みている。この DNA マーカーの確認技術、特に PCR による確認技術を育種事業へと活用するためには、簡便かつ低コストで行える DNA 抽出法が必要である。今回、ピーマン等から DNA を簡易に抽出する方法を開発したので報告する。

## 1. 材料および方法

供試材料：ピーマンの若い展開葉 (0.1g ~ 0.2g) を幅 5mm で切断後使用した。なお参考としてタバコ、イチゴ、カンショ、カンキツの展開葉各 0.1g を用いた。

## 1) 簡易抽出法の開発

供試材料の粉碎は粉碎装置 (クラボウ: SH-48) を用いた。まず、液体窒素中に試料と径 5mm のジルコニアボールの入った容器を 2 分間浸漬し、試料凍結後に粉碎器で 2 分間粉碎して供試した。DNA の抽出は第 1 図に示す改良 CTAB 法に従い、50~100 $\mu$ l の TE 緩衝液に溶解した。DNA 濃度は、電気泳動 (0.8% TAE アガロースゲル) で 100V10 分間泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、 $\lambda$  DNA との比較により測定した。

## 2) RAPD-PCR, PCR での確認

まず簡易抽出法で抽出した DNA を 4 ng/ $\mu$ l の濃度に希釈し、RAPD-PCR または PCR を行った。使用した RAPD プライマーはオペロン社の 10塩基プライマーを、また PCR プライマーは 20塩基の共優性マーカーを用いた。反応組成は鋳型 DNA 20ng、上流域および下流域プライマー各 1 $\mu$ M、dNTP 各 200 $\mu$ M、*rTaq* DNA 合成酵素 (TaKaRa 社) 2 U とした。滅菌蒸留水を加え総量 20 $\mu$ l とし、RAPD-PCR および PCR 後、電気泳動 (2% TAE アガロースゲル) 後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、増幅産物の有無を確認した。

- チューブにジルコニアボールを 1 個、葉 0.1~0.2g を入れ、液体窒素で凍結
- 粉碎装置で 1100rpm 2 分、葉を粉碎
- 65°C CTAB 500 $\mu$ l、メルカプトエタノール 50 $\mu$ l を添加
- 65°C、15 分処理。5 分おきに攪拌
- 全量を別のチューブに移す
- クロロホルム / イソアミルアルコール 500 $\mu$ l 添加し攪拌
- 15000rpm 5 分、上澄みを別のチューブへ
- イソプロパノール等量混合、軽く反転。15000rpm 10 分
- 沈殿に 70% エタノール 500 $\mu$ l 添加。15000rpm 5 分
- 乾燥後、50~100 $\mu$ l の TE での溶解
- Rnase 5 $\mu$ l 添加、37°C 30 分間処理、DNA 量測定

第 1 図 簡易 DNA 抽出法手順

## 2. 結果および考察

## 1) 簡易抽出法の開発

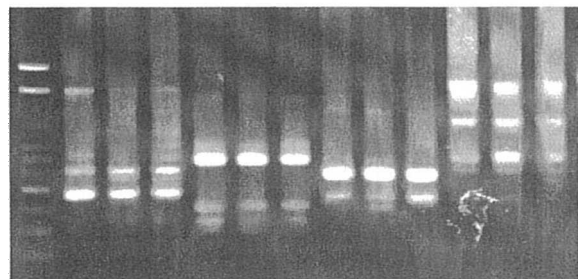
供試したすべての作物にわたり、第 1 図の方法で、サンプル粉碎装置を用いることにより、今までに用いていた CTAB 法や ISOPLANT よりも短時間で、かつ一度に最大 48 サンプルから DNA を抽出することが可能となった。また抽出された DNA は電気泳動により 1 本のバンドとして確認できた。

## 2) RAPD-PCR, PCR での確認

得られた DNA を鋳型とし、オペロン社の 10塩基プライマーを用いて RAPD-PCR を行ったところ、各作物において多型が得られた (第 2 図)。また 20塩基の共優性マーカーを用いて PCR を行ったところ、目的断片の増加が認められた (第 3 図)。

以上のことから、今回開発したピーマンの簡易 DNA 抽出方法は、非常に簡便かつ低コストで行えた。さらに他の作物へも応用可能であることから、育種事業に活用できるものと思われた。

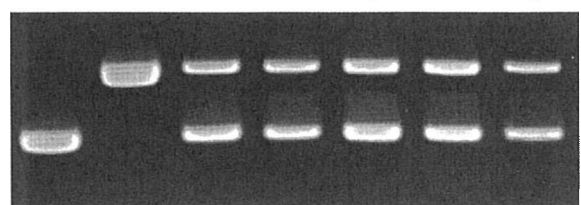
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



第 2 図 抽出した DNA を用いて行った RAPD-PCR

注) M : 100bp ラダーマーカー、  
1~3 : タバコ、4~6 : カンショ、7~9 : イチゴ、  
10~12 : カンキツ。

K9 AC 1 2 3 4 5



第 3 図 PCR による目的断片の確認

注) K9 : K9-11 AC : AC2258  
1~5 : K9-11 $\times$  AC2258。