

短報

イオン交換レジンタイプキットを用いたトウモロコシ加工品のDNA抽出精製における簡易化の検討

大森 清美, 土屋 久世*

Study on simplification of DNA extraction and purification method of corn processed foods using the ion-exchange resin type kit for the detection of the genetically modified organism

Kiyomi OHMORI and Hisayo TSUCHIYA*

緒言

イオン交換タイプのDNA抽出精製キット法(QIAGEN Genomic-tip)(Gtip法)は、厚生労働省通知の「安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法」¹⁾(厚労GM通知法)およびJAS 分析試験ハンドブックの「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」²⁾(JASハンドブック法)に採用されている他、消費者庁通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法」³⁾(消食AL通知法)でもDNA抽出精製法として採用されている。特に、消食AL通知法のGtip法は、食品の加工度が高く、DNA収量の少ない食品からのDNA抽出精製に適している³⁾とされているが、それら3種のGtip法は、試料調製法およびDNA抽出精製に用いる試薬量等が異なるため、時間や経費等にも違いがある。

厚労GM通知法のトウモロコシ(CBH351)の検査方法では、タコス、トルティーヤ、コーンチップおよびコーンフレークについては、「2.1.1. タコス、トルティーヤ、コーンチップおよびコーンフレーク(加熱加工されているものに限る)」と記載されたDNA抽出精製(MHLW-Gtip法)を行い、それ以外のトウモロコシ加工品は、JASハンドブック法に従い、加水およびホモジネート(湿式法)により調製した試料2 gからGtip法を用いて

DNAの抽出精製(JAS-Gtip法)を行うこととされている。しかし、DNA収量の少ないジャンボコーン(トウモロコシを原料としたポン菓子)等については、湿式法を用いたJAS-Gtip法では、定性PCRで用いられる10ng/ μ l以上のDNAが得られず、PCR後のトウモロコシ内在性遺伝子(Zein遺伝子)の検出も困難であったことから、筆者らは以前に加水せず粉碎(乾式法)を行うKNG-Gtip法を提案した⁴⁾。他のコーンスナック菓子類(ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナックおよびコーンパフ類)については、湿式法で調製した試料2 gからJAS-Gtip法を用いてDNAの抽出精製を行うこととされているが、加水およびホモジネート処理を行う湿式法による試料調製は煩雑であり、さらには使用する試薬類は多くがMHLW-Gtip法の2倍量であることから経費が嵩む。また、消食AL通知法に記載されたGtip法(ALG-Gtip法)では、アミラーゼ処理により澱粉質を分解する工程があるため、抽出時間および経費ともに3種のGtip法の中で最大である。

そこで、最も簡便で安価なMHLW-Gtip法について、厚労GM通知法では適用外の各種コーンスナック類およびその他のトウモロコシ加工品でのDNA抽出精製法として適用の可否を検証するために、抽出DNAの量、質およびPCRによるZein遺伝子増幅について3種のGtip法での比較を行った。

方法

試料として用いたトウモロコシ加工品は、コーンスナック菓子(ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナック、コーンパフ、トウモロコシ缶詰(ホールタイプ、クリームタイプ)、コーンスープ(乾燥粉末、液体)、冷凍トウモロコシであり、いずれも神奈川県内の食料品店で購入した。

試料の前処理について、MHLW-Gtip法の乾式法は、試料を袋の中で可能な限り細かくした後、ラボミルサー(大阪ケミカル)で粉碎した。湿式法は、JASハンドブック法²⁾「個別品目編(定性試験)」に従い、試料に規定量の滅菌水を加え、ホモジナイザー(佐久間精機)を用いてホモジナイズした。MHLW-Gtip法の適用性を検討した冷凍トウモロコシおよびトウモロコシ缶詰(ホールタイプ)は、湿式法に従い、トウモロコシ缶詰(クリームタイプ)およびコーンスープ(液体)については、ホモジネートを行うのに十分な水分を含むことから、加水せずホモジネート処理のみを行った。コーンスープ(乾燥粉末)は、乾式法により試料調製を行った。

DNA抽出精製法において検討を行った3種のDNA抽出精製法は、MHLW-Gtip法として、厚労GM通知法¹⁾、

神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
※ 前 理化学部

ALG-Gtip法は、消食AL通知法³⁾、JAS-Gtip法は、JASハンドブック法²⁾に従った。なお、いずれのDNA抽出精製法についても、1試料につき3回(n=3)の抽出を行った。

抽出DNAの評価は、吸光度測定法として、分光光度計(Gene Quant Pro, アマシャムファルマシア)を用いて230 nm, 260 nm, 280 nmの測定を行い、260 nmにおける吸光度からDNA濃度を算出し、260 nm/230 nmの吸光度比(A260/A230)および260 nm/280 nmの吸光度比(A260/A280)は純度の指標とした。また、電気泳動法での評価は、100 ng/ μ lに希釈したDNA溶液7.5 lについて0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。0.8%アガロースゲルは、アガロース(LO3[TAKARA], タカラバイオ)およびTAE緩衝液を用いて調製した。 λ DNA HindIII(タカラバイオ)を分子量マーカーとして、100Vで電気泳動を行い、電気泳動後のアガロースゲルは、エチジウムブロミド(和光純薬工業)のTAE緩衝液溶液(0.1 mg/l)で15分間染色後、TAE緩衝液で15分間脱色した。紫外線312 nmを照射し、画像撮影装置(AE-6905H Image Saver HR, アトー)を用いてDNAの電気泳動像を撮影した。

PCR増幅によるDNA抽出精製法の適用性評価は、CBH351系統組換えトウモロコシの加工品は入手不可能であることから、トウモロコシ内在性遺伝子 ZeinのPCR増幅を指標として、厚労GM通知法¹⁾に従った。

結果および考察

3種のGtip法(MHLW-Gtip法, ALG-Gtip法およびJAS-Gtip法)を用いて、各種コーンスナック類(ジャイアントコーン(試料No.1), ポップコーン(試料No.2), タコススナック(試料No.3)およびコーンパフ類(試料No.4-1, 4-2および4-3))からDNAの抽出精製を行い、抽出DNAの質および量の比較を行った。その結果、いずれのGtip法を用いた場合にも、抽出DNAの濃度は10 ng/ μ lを超えており、試料1 gあたりの抽出DNA量として算出したDNA抽出効率は、タコススナック以外の5品目において、MHLW-Gtip法がALG-Gtip法およびJAS-Gtip法と比べて高値を示した(Table 1)。一方、ALG-Gtip法はアミラーゼ処理が行われているにも関わらず、DNA抽出効率は他の2法よりも低値であった。また、A260/A280の吸光度比を指標とした抽出DNAの純度については、MHLW-Gtip法により得られたDNA試料原液は、いずれも良好な純度の指標とされる1.7以上であったが、ALG-Gtip法およびJAS-Gtip法を用いた場合には、ジャイアントコーン、ポップコーン、およびタコススナックのDNA試料原液で1.7に満たないことがあっ

た。A260/A230の吸光度比はすべて2.1以上で良好な値であった。それらの抽出DNAについて、Zein遺伝子を増幅し電気泳動を行った結果、試料No.1~4のコーンスナック菓子のいずれにおいても、MHLW-Gtip法、JAS-Gtip法およびALG-Gtip法により抽出されたDNA試料液で、3回抽出のすべてにおいてZein遺伝子のバンドが検出された(Table 1)。次に、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った結果、ジャイアントコーンについては、MHLW-Gtip法を用いて抽出したDNA試料液が他の2法により抽出したDNA試料液よりも高分子量のDNAを含有していた(Fig.1. No.1)。一方、タコススナックについては、MHLW-Gtip法を用いて抽出されたDNA試料液よりも他の2法を用いて抽出されたDNA試料液の方が高分子量のDNAを含んでいた(Fig.1. No.3)。試料No.4-3のコーンパフについては、MHLW-Gtip法およびALG-Gtip法よりもJAS-Gtip法を用いて抽出されたDNA試料液の方が高分子量のDNAが多い傾向であった。その他のコーンスナック菓子については、3種のGtip法を用いて抽出精製されたDNA試料液の分子量分布に明確な差は認められなかった。以上により、ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナック、コーンパフ類については、3種のGtip法により得られたDNAの分子量分布において、MHLW-Gtip法は他の2法と比較して必ずしも高分子量のDNAが採取できていないが、いずれのDNA試料液についてもZein遺伝子の増幅および検出には影響がないことから、Fig.1でみられたDNAの分子量分布の差は、トウモロコシ遺伝子の検出に影響のないレベルであることが確認され、MHLW-Gtip法により得られた抽出DNAの量および純度は他の2法よりも高値であることが明らかになった。これらの結果に加えて、MHLW-Gtip法は、煩雑なJAS-Gtip法の加水およびホモジネート処理やALG-Gtip法のアミラーゼ処理を必要とせず、抽出用試薬量もJAS-Gtip法およびALG-Gtip法の1/2量であり低コストであることから、ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナックおよびコーンパフ類のDNA抽出精製法として、3種のGtip法の中では最も有用であると考えられた。

さらに、その他のトウモロコシ加工品(Table 1, 試料No.5, 6-1, 6-2, 7-1, 7-2)について、MHLW-Gtip法の適用性を検討した結果、DNA試料原液濃度は、いずれも100 ng/ μ lを超え、A260/A230は2.2~2.4、A260/A280は1.7以上であることから、DNAの抽出精製は良好であると判断された(Table 1)。Zein遺伝子増幅後の電気泳動像は、いずれのDNA試料液についても3回抽出のすべてにおいてバンドが検出され(Table 1)、それらのバンドはいずれも明瞭であった。また、

Table 1 Quality and yield of DNA extracted from corn processed foods and maize

Sample No.	Maize processed foods	Gtip method	No. of extraction	Weight of water for homogenization of sample ¹⁾ (g)	Sampling weight after pre-treatment (g)	Ratio of absorbance (260nm/230nm)		Ratio of absorbance (260nm/280nm)		Concentration of DNA measured by O.D.260nm (ng/μL)		Amount of DNA extracted from 1g sample(μg)			Detection frequency of <i>Zein</i> gene (per 3 times)
						ave.	±S.D.	ave.	±S.D.	ave.	± S.D.	ave.	±	S.D.	
1	Giant corn	MHLW-Gtip	1,2,3	—	1	2.25	± 0.02	1.75	± 0.02	503.7	± 42.3	503.7	±	42.3	3
		ALG-Gtip	4,5,6	—	2	2.30	± 0.01	1.58	± 0.01	435.3	± 29.1	217.7	±	14.6	3
		JAS-Gtip	7,8,9	x3	2	2.28	± 0.05	1.69	± 0.05	119.7	± 15.0	239.3	±	29.9	3
2	Popcorn	MHLW-Gtip	1,2,3	—	1	2.23	± 0.01	1.70	± 0.02	1182.8	± 17.1	1182.8	±	17.1	3
		ALG-Gtip	4,5,6	—	2	2.24	± 0.01	1.64	± 0.01	1112.7	± 17.1	556.3	±	8.5	3
		JAS-Gtip	7,8,9	x3	2	2.33	± 0.02	1.71	± 0.01	523.3	± 16.1	1046.7	±	32.1	3
3	Tacos snack	MHLW-Gtip	1,2,3	—	1	2.28	± 0.04	1.69	± 0.05	431.2	± 3.6	431.2	±	3.6	3
		ALG-Gtip	4,5,6	—	2	2.19	± 0.02	1.64	± 0.02	833.0	± 7.1	416.5	±	3.5	3
		JAS-Gtip	7,8,9	x2	2	2.33	± 0.01	1.63	± 0.11	425.7	± 4.3	638.5	±	6.4	3
4-1	Corn puff (salt taste)	MHLW-Gtip	1,2,3	—	1	2.22	± 0.01	1.75	± 0.04	469.5	± 44.7	469.5	±	44.7	3
		ALG-Gtip	4,5,6	—	2	2.24	± 0.04	1.76	± 0.02	673.8	± 4.3	336.9	±	2.2	3
		JAS-Gtip	7,8,9	x2	2	2.21	± 0.03	1.78	± 0.01	262.8	± 20.0	394.3	±	30.0	3
4-2	Corn puff (with onion)	MHLW-Gtip	1,2,3	—	1	2.32	± 0.02	1.74	± 0.04	577.5	± 19.7	577.5	±	19.7	3
		ALG-Gtip	4,5,6	—	2	2.33	± 0.03	1.78	± 0.03	522.0	± 16.1	261.0	±	8.1	3
		JAS-Gtip	7,8,9	x2	2	2.34	± 0.02	1.73	± 0.01	340.0	± 15.7	510.0	±	23.6	3
4-3	Corn puff (with chili)	MHLW-Gtip	1,2,3	—	1	2.41	± 0.07	1.69	± 0.03	553.2	± 18.3	553.2	±	18.3	3
		ALG-Gtip	4,5,6	—	2	2.36	± 0.03	1.77	± 0.03	570.7	± 15.3	285.3	±	7.7	3
		JAS-Gtip	7,8,9	x2	2	2.36	± 0.03	1.74	± 0.04	282.2	± 21.8	423.3	±	32.6	3
5	Frozen corn	MHLW-Gtip	1,2,3	x1	1	2.24	± 0.08	1.68	± 0.09	224.0	± 41.7	448.0	±	1.9	3
6-1	Whole corn (canned)	MHLW-Gtip	1,2,3	x1	1	2.40	± 0.02	1.66	± 0.01	270.7	± 4.9	541.3	±	9.9	3
6-2	Cream corn (canned)	MHLW-Gtip	1,2,3	—	1	2.31	± 0.00	1.65	± 0.01	394.7	± 8.1	394.7	±	8.1	3
7-1	Corn soup (dry powder)	MHLW-Gtip	1,2,3	—	1	2.34	± 0.01	1.76	± 0.01	947.0	± 15.8	947.0	±	15.8	3
7-2	Corn soup (liquid)	MHLW-Gtip	1,2,3	—	1	2.42	± 0.02	1.65	± 0.03	130.8	± 5.1	130.8	±	5.1	3

1) ×1: The weight of water is equal to the weight of sample.

×2: The weight of water is twice the weight of sample.

×3: The weight of water is 3 times the weight of sample.

0.8%アガロースゲルによる電気泳動では、冷凍トウモロコシでは23 Kbp付近の高分子DNAを多く含むインタクトなDNAが観察された (Fig.2, No.5). 一方、トウモロコシ缶詰 (ホールタイプ)、トウモロコシ缶詰 (クリームタイプ) およびコーンスープ (乾燥粉末) では560 bp以下の低分子化したDNAが明瞭に観察され、コーンスープ (液体) のDNA試料液には2 Kbp付近から低分子量側にのびるスメアも観察された (Fig.2, No.6-1, No.6-2 No.7-1, 2No.7-2). 以上の結果により、MHLW-Gtip法を用いた場合のDNA試料液の分子量分布は加工品により異なっていたが、それらの抽出DNAは定性PCRに用いるDNA試料原液として量および質ともに良好であることが確認された。

結論

Gtipを用いた3種のDNA抽出精製法のうち、作業効率および経済性の観点からJAS-Gtip法およびALG-Gtip

法よりも優れているMHLW-Gtip法は、本研究で検討した11種のトウモロコシ加工品において、定性PCRに用いるDNA試料原液として量および質ともに良好なDNAが得られることが確認された。よって、トウモロコシ (CBH351) の検査方法におけるコーンスナック菓子 (ジャイアントコーン、ポップコーン、タコススナック、コーンパフ、トウモロコシ缶詰 (ホールタイプ、クリームタイプ)、コーンスープ (乾燥粉末、液体)、冷凍トウモロコシのDNA抽出精製法については、試料採取量1gのMHLW-Gtip法への統一が可能であると考える。

文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局 生活衛生・食品安全部長, 安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法の一部改正について, 生食発0824第2号, 平成28年8月24日.
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター, JAS

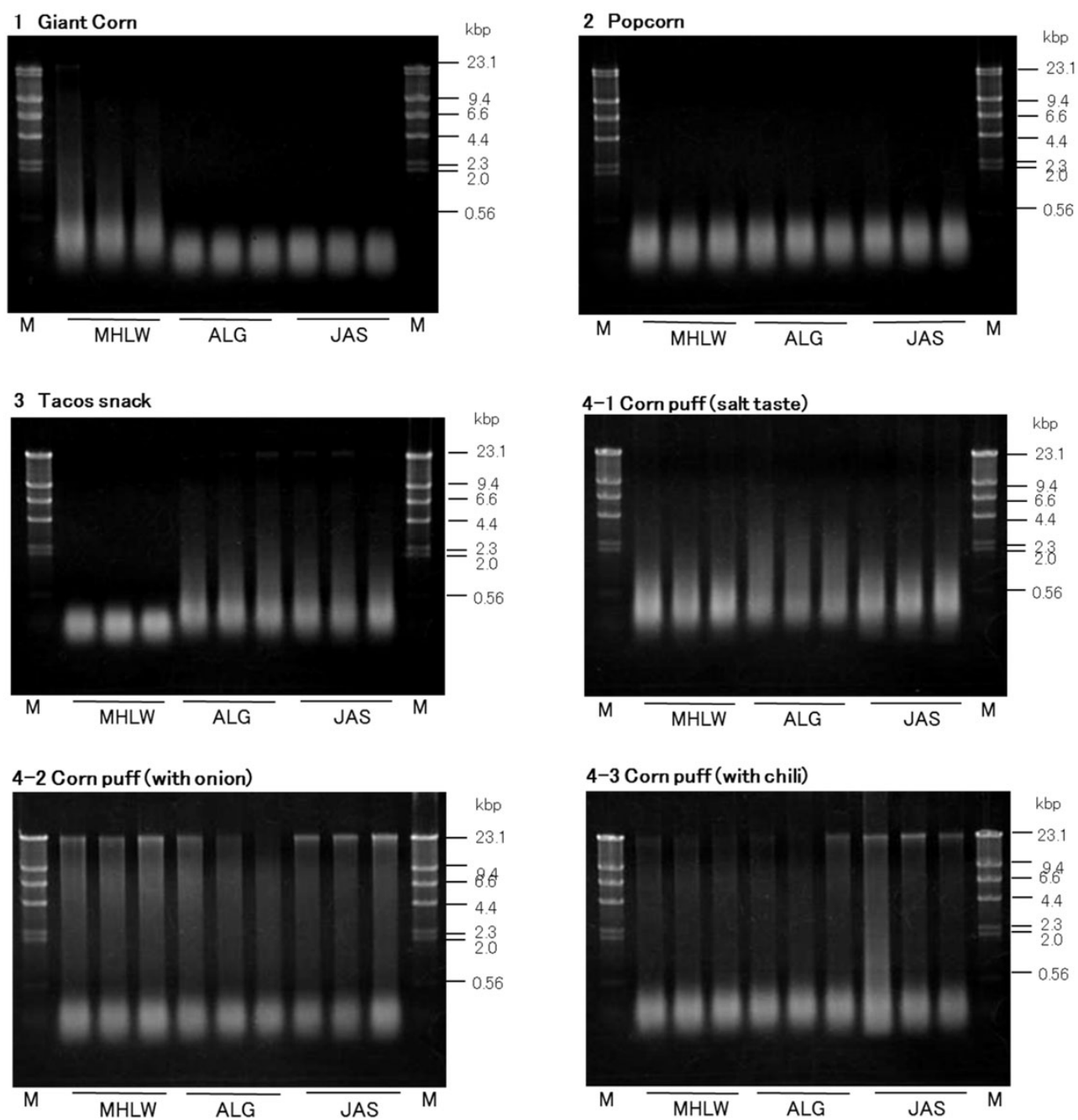


Fig.1 各種Gtip法によるDNA試料原液の分子量分布の比較

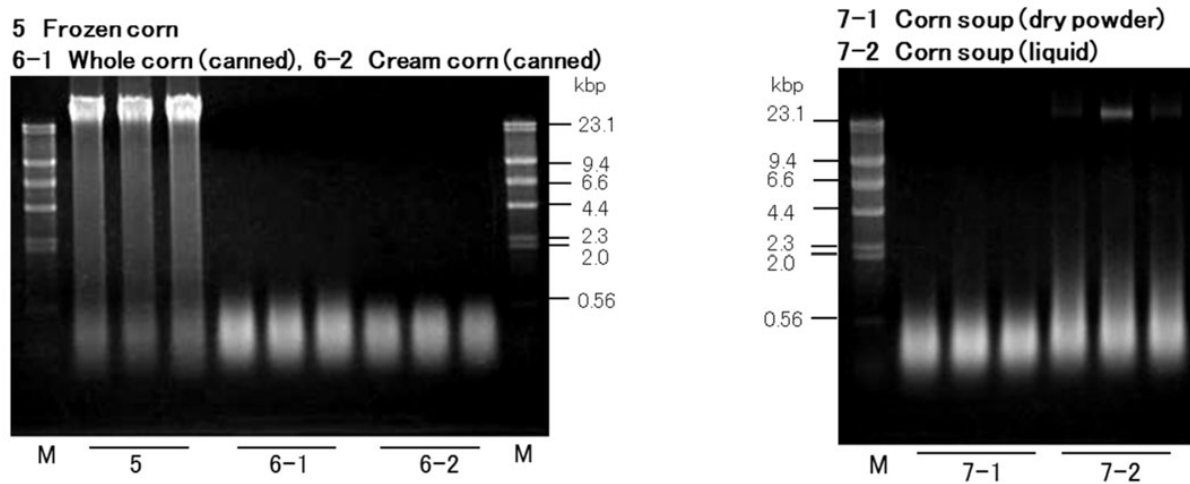


Fig.2 MHLW-Gtip法によるDNA試料原液の分子量分布

分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 第3版, 平成24年9月24日.

3) 消費者庁次長, アレルギー物質を含む食品の検査方法について, 消食表第36号, 平成26年3月26日.

4) 大森清美ほか: トウモロコシ加工品からのイオン交換樹脂タイプキットを用いたDNA抽出精製法の検討, 食品衛生学雑誌, 49, 45-50 (2008)