

RAPD分析の再現性に及ぼす鋳型DNA純度の影響

九州大学農学部 前田 一・白石 進

1. はじめに

近年のDNA分析技術の進展は目覚ましいものがあるが、このことに貢献している手法の一つにPCR (Polymerase Chain Reaction)¹⁾がある。このPCRは、極微量の鋳型DNAから目的のDNA領域を数十万から数百万倍に増幅させる画期的手法であるが、これにはその領域の両端の塩基配列情報が必要であり、これを基に約20~40塩基のオリゴヌクレオチド(プライマー)を設計しなければならない。

このPCR法の原理を応用した分析手法が考案されており、今回使用するRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)²⁾分析もそのひとつである。

RAPD分析はPCRのように塩基配列情報が必要ではなく、10塩基の任意の配列をもつプライマーでゲノムDNAをランダムに増幅する手法である。この手法の利点としては、使用するDNAの量が非常に少なく他の分析手法に比べ短時間で多くの情報の収集が可能なことである。しかし、RAPD分析は反応条件の微妙な違いによって得られる結果の再現性について問題にされることがある。

そこで本研究では鋳型DNAの純度が、RAPD分析の結果に及ぼす影響について検討した。

2. 材料と方法

供試樹種は、クロマツとスギの2樹種を用いた。クロマツは、同一母樹(中頸城103号)の種子から取り出した胚乳を、スギは在来品種であるリュウノヒゲ、シャカインの2品種の各5ヶ所の針葉を使用した。DNA抽出は、クロマツはSDS法³⁾を、スギはCTAB法⁴⁾を用いた。粗抽出液の精製は、GENE CLEAN III Kit (BIO 101, Inc.)とMagic™DNA Clean-Up System(Promega)の2種類の精製キットを使用した。

RAPD分析の反応溶液組成は、50mM Tris-HCl, pH8.5, 5mM MgCl₂, 500μg/ml BSA, 0.5mM dNTP, 2.0%(W/V) Ficoll 400, 4mM Tartrazine, 0.01mM EDTA,

0.4units/10μl *Tth* DNA polymerase, 0.25μM プライマー(各樹種12種類:Operon Inc.), 10ng/10μl 鋳型DNAである。反応サイクルは、最初に94℃60秒(変性)を行い、次に93℃10秒(変性) - 36℃30秒(アニーリング) - 72℃60秒(伸長)の工程を60サイクル行い、最後に72℃120秒(伸長)を行った。

得られたPCR産物は、1%アガロースゲルで120V・約2.5時間電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、UVトランスイルミネーター上で観察した。

3. 結果と考察

最初に、粗抽出液を精製した際にDNAの物理的切断が起こっている可能性があるため、クロマツの胚乳DNAの粗抽出液と2種類の精製キットを使用して得た精製液の電気泳動を行った。図-1はその結果である。粗抽出液と精製液を比較してみると、若干の低分子化が起こっているものの分子量はほぼ同じであった。また、精製キット間で比べるとほぼ同様の結果が得られた。このことから、精製キットの違いがDNAの低分子化に及ぼす影響はほとんどないと考えられる。その後の精製はGENE CLEAN III Kitを使用して行った。

次に、クロマツの胚乳DNAを用いたRAPD分析を行った。その結果の一部を図-2に示した。その結果、粗抽出液と精製液ではバンドパターンが全く異なっていた。これは、粗抽出液中に存在するPCR反応の阻害物質がDNA精製処理によって大部分除去されたことを示している。表-1に各プライマーにおける5サンプル間でのバンドの違いについてまとめた。一般に針葉樹では胚乳は母樹由来の半数体であるため、母樹がもつヘテロ接合型遺伝子座では分離が起こる。そのため、これらの5サンプルでのバンドパターンは必ずしも同一とは限らない。しかし、粗抽出液で得られた結果は精製液での値に比べ、著しく高い。これは粗抽出液を用いた結果は、その再現性が極めて低いことを示唆した。

次に、スギの針葉DNAを用いて分析を行った。その結果の一部を図-3に示した。この場合は各サンプルの

遺伝子型が同一であるため、バンドパターンは同一になることが理想である。泳動結果をみると品種間での違いはあるものの、同一品種内のサンプル間では粗抽出液と精製液の間に明確な違いは認められなかった。表-2に各プライマーにおける5サンプル間でのバンドの違いを示した。これを見ると、粗抽出液と精製液では、精製液の方が低い値を示した。また、CTAB法の粗抽出液の方はSDS法のものより、精製度が高くPCR増幅の高いバンドのみを情報として利用する場合は粗抽出液を用いても信頼性の高い結果を得ることができる。

4. おわりに

本研究の結果から、RAPD分析に及ぼすDNA純度の影響について、次の結論が導かれた。

1. 今回使用した組織・抽出法は異なるが、いずれの場合も精製操作を実験に組み込むことで、情報の信頼性が向上することが示唆された。
2. CTAB法は、通常の利用法で行う場合には、粗抽出液でも信頼性の高いことが示された。

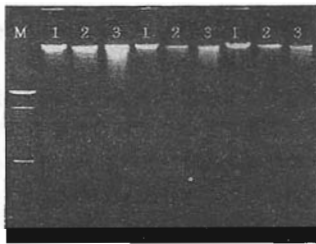


図-1 粗抽出液と精製液の泳動結果
 1: 粗抽出液
 2: 精製液 (GENECLEAN III)
 3: 精製液 (Magic™ DNA Clean-Up System)
 M: サイズマーカー

表-1 クロマツ5サンプル間でのバンドの差異

Primer	C15	J05	J08	K05	N07	N14	O16	P09	Q08	R10	W11	Y05	平均
粗抽出液	8	9	4	5	8	14	8	20	16	17	15	12	11.3
精製液	1	2	6	6	2	2	4	1	0	2	6	2	2.8

表-2 スギ5サンプル間でのバンドの差異

Primer	A05	A08	A10	B18	D01	E01	F02	G05	H05	I04	J08	K07	各平均	
リュウノヒゲ														
粗抽出液	1	1	12	1	3	0	0	1	0	3	12	0	2.8	
精製液	1	1	6	1	3	0	0	0	0	1	7	0	1.7	
シャカイン														
粗抽出液	2	0	5	1	4	0	1	3	0	2	12	1	2.6	
精製液	1	0	1	1	4	0	0	1	0	1	3	1	1.1	
													全平均	
													粗抽出液	2.8
													精製液	1.4

引用文献

- 1) 白石 進・渡辺 敦史: 日林誌, 77, 429-436, 1995
- 2) 関谷 剛男・向井 博之: 蛋白質核酸酵素 1996年4月号増刊, 41, 415-428, 1996
- 3) 深田 俊武ほか: 日林九支研論, 47, 249-250, 1994
- 4) WILLIAMS J. G. K, *et al*: Nucleic Acids Res, 18, 6531-6535, 1990

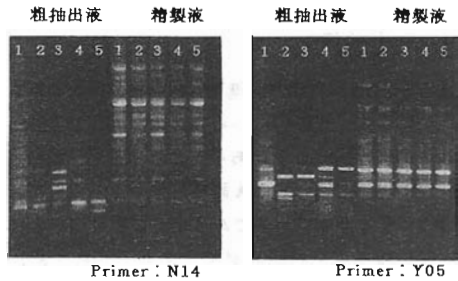


図-2 クロマツの胚乳DNAのRAPD分析の結果

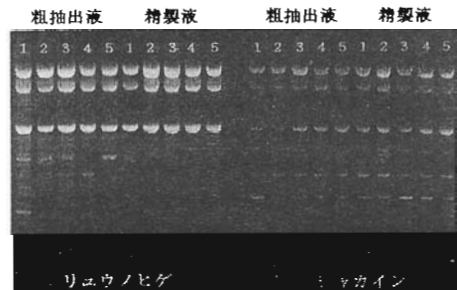


図-3 プライマー A08 によるスギの針葉 DNA の泳動結果