

## 食用きのこ類の品種改良に関する研究 (第2報)

—プローブの単離及び精製と標識—

平成3年度～平成7年度 (県単)

加藤 龍一

### 要 旨

前年度実施した、RFLP (制限酵素断片長多型) の結果、DNAの泳動バンドのパターンの差異からキノコの種類や系統間の判別が可能であることが判った。しかし、イネのrDNA (pRR217) をプローブとするこの方法は、プローブの精製技術 (プラスミドベクターからのpRR217断片の回収) の良否がDNAの解析結果を大きく左右することが判った。このため、DNAの精製技術の問題点について検討を行い、検出力の向上を計った。

#### I. はじめに

前年の結果から、キノコの品種や菌株の違いをDNAレベルで判別出来ることが判った。

この方法は、キノコのDNAを電気泳動で寒天上に分画した後、これをナイロン膜に写しとる。

一方で、標識を付けたリボソームDNA (rDNA、試験ではイネのrDNAを用いた) を用意する。膜上のDNAとrDNAを化学処理 (ハイブリダイズ) して発色させると、ナイロン膜上にキノコのDNAバンドが分画されて現れる。

この方法は、RFLP (制限酵素断片長多型) といわれる。若干の説明を加えると、rDNAは、種間で相同性の高い遺伝子領域と種特異的な遺伝子間領域 (Intergenic spacer region: IGS) から構成されている。したがって、イネのrDNAをプローブ (標識) とした全ての植物のrDNAは相同性の高い遺伝子領域を介してハイブリダイズするが、種により塩基配列、長さが異なるIGSによりRFLPが検出される。このバンドパターンの現れ方の違いにより雑種の同定が可能である。したがって、この方法は、品種改良や新系

統作出の判定に際し、従来の培養や栽培特性、対峙培養やアイソザイム分析等の手法を補うものとして威力を発揮すると思われる。

ところで、これまでの試験結果から、本法の技術がいま一步であり、検出力に不安定なところがあった。そこで今回は、DNAの精製技術の向上に重点を置き試験を行った。

#### II. 実験方法

精製には、大腸菌由来のプラスミドベクターからのプローブDNAの単離、制限酵素処理と切断の確認、低融点アガロース電気泳動法によるベクター (pBR325: 5.5kb) とプローブ (pRR217: 7.7kb) 両断片の分画とその確認、pRR217断片の回収と確認、断片の標識処理の順序で実験を行った。

具体的方法は、以下のとおりである。

##### 1. ベクターからのプローブDNAの単離

(1) 試験管内のLB液体培地 (1% トリプトン、0.5% イースト、1% NaCl、0.5% 1N NaOH) で、37°C、1昼夜経過のプラスミド培

養液をマイクロチューブ（以下、チューブ）に移し、4°C、15,000rpmで3分冷却遠心（以下、遠心）後、上清を捨てた。

(2) A液 (25mM *Toris-HCl*、50mM グルコース、10mM EDTA、pH8.0) を沈澱に100 $\mu$ lを加えた。

(3) B液 (0.2N NaOH、1% SDS) を200 $\mu$ lを加えた。

(4) 3M 酢酸Na (pH4.8) 150 $\mu$ lを加え、-70~80°Cに10分静置した。

(5) 5分遠心後、上清に、TE飽和フェノール、クロロフォルム混合液 (1:1) を等量加え、3分遠心した。

(6) 上清に、等量のクロロフォルムを加え、3分遠心した。

(7) 上清に2.5倍容の99%エタノールを加え、-70~80°Cに5分静置した。

(8) 5分遠心後、沈澱に70%エタノールを1.5ml加え、5分遠心した。

(9) 沈澱を乾燥し、TE (10mM *Toris-HCl*、1mM EDTA、pH8.0) 30 $\mu$ lに溶解した。

(10) (9)液から3 $\mu$ lとりこれにDYE (0.2% BPB、40%シュークロース、0.15% SDS、) 2 $\mu$ l、TE5 $\mu$ lを加え、マーカーと同時にアガロース電気泳動後、EtBr染色、UV照射でバンド位置を確認した。

## 2 制限酵素処理と切断の確認

(1) バンド確認後のDNA (1-(9)) を、37°C、1時間、以下の調製液 (合計100 $\mu$ l) で切断処理した。

(調製液の内訳:  $\mu$ l)

DNA 25、H<sub>2</sub>O 10、バッファ-50、RNase 5、2メルカプトエタノール 5、Eco

R1 5、

(2) 3M 酢酸Naを処理液の1/10倍量、99%エタノールを同2.5倍容加え、-70~80°Cに15分静置後、15分遠心した。

(3) 沈澱に70%エタノールを加え、5分遠心した。

(4) 沈澱を乾燥後、TE 23 $\mu$ lに溶解した。

(5) 上記DNAから3 $\mu$ lを、1-(10)と同じ操作でバンド位置を確認した。

## 3 pRR217断片の回収と確認

(1) 25mlのTAE (40mM *Toris-HCl*、1mM EDTA) に、0.7%濃度の低融点アガロース (SIGMA: TYPE-VII) を溶かし、EtBr 25 $\mu$ lを加え、ゲル床で固化させた。

(2) EtBr 300 $\mu$ lを混和した300mlのTAE溶液にゲル床を置いた。

(3) 2-(4)の切断確認済みのDNA (5.5、7.7kb) 20 $\mu$ lにDYE 2 $\mu$ lを加え、ゲルのコームに注入し、50V、2時間通電した。

(4) UV照射下で、7.7kbのゲル断片を切り出した。

(5) 分画した断片をチューブに移し、TEをチューブの500 $\mu$ lラインまで加え、65°C、10分加温した。

(6) 溶けたゲルに、TEフェノール、クロロフォルム混合液 (1:1) を等量加え、3分遠心した。

(7) 上清に再度、上記の操作を加えた後、上清に等量のクロロフォルムを加え、3分遠心した。

(8) 上清に、3M 酢酸Na 1/10倍容、99%エタノール 2.5倍容を加え、-70~80°Cに15分

静置後、15分遠心した。

(9) 沈澱を乾燥後、TE 18  $\mu$ lに溶解した。

(10) 前述と同じ操作で、pRR217断片のバンド位置を確認した。

#### 4 7.7kb断片(pRR217)の標識

(1) チューブに、単離精製した断片

(pRR217)を15  $\mu$ l入れ沸騰水で10分加熱後5分急冷した。

(2) (バイアル-5) 2  $\mu$ l、(同-6) 2  $\mu$ l、(同-7) 1  $\mu$ lを入れ、37°Cでオーバーナイト加熱した。

(3) 4M 塩化リチウム(LiCl) 2  $\mu$ l、99% エタノール 80  $\mu$ l加え混和した。

(4) -70~-80°Cに15分静置後に、10分遠心した。

(5) 沈澱に70%エタノール 80  $\mu$ l注入し、10分遠心した。

(6) 沈澱(標識済pRR217)を乾燥後、50  $\mu$ lのTEに溶解した。

なお、ハイブリダイゼーションの場合は、沸騰水で10分加熱後、5分急冷し、DNAを1本鎖化した。標識試薬や標識方法の詳細は、ベーリンガーのDig ELISA Kitの説明書に従った。

### III. 結果と考察

写真-1は、キノコから抽出した全DNAのアガロースゲル電気泳動像である。レーンの濃淡は、DNA抽出量の差となって現れた。

写真-2は、実験の最終結果(RFLP解析)である。高いバックグラウンド(像の汚れ)がみられ、キノコからDNAが抽出されたにもかかわらず(写真-1)実験が失敗したことを示している。

そこで、失敗の原因について各実験段階ごとに以下の順序で再検討を行った。

#### 1 プラスミドベクターからのプローブDNAの単離に関して

まず、出発段階(実験方法-1)での失敗の主な原因は、LB培養液でのプラスミドDNA(pBR325、pRR325)の単離の過程での操作にミスがあったものと思われた。

写真-3がこの結果である。単離したDNAをみると、各レーンは汚れ、バンドの位置も一定していない。これは実験の過程で、フェノール抽出や洗浄等の操作を誤ったため、DNAにクロモソーム(大腸菌の染色体)等の蛋白質が混入したことが原因であると推察された。

写真-4の(A)レーンの泳動像が、単離に成功した結果を示している。この場合、定位置に分画された2本のバンドが現れる。

OC(Open-Circular)及びCCC(Co-valententry-Closed-Circular)

なお、写真-3、4下部の白斑はRNAである。(操作過程で、RNase処理を行わないため)

#### 2 制限酵素処理と切断の確認に関して

単離を確認(OC、CCCバンド)したDNAを制限酵素のEcoRIで切断した泳動像が、写真-4の(B)レーンである。ここにみられるように、7.7kb(pRR217)と5.5kb(pBR325)の位置にバンドが分画されており、一応操作は成功しているが、レーンがやや薄く汚れて(スメアー)みえる。

この状態のDNA(2断片)に標識を付けてキノコのDNAとハイブリダイズさせた結果、DNAの解析像に高いバックグラウンド(像の汚れ)が現れた。(写真-1)

これまでの検討の結果、最終段階での失敗の原因がDNAの純度にあると思われた。

つまり、キノコのDNAはプローブとするrD

NA (pRR217) と直接ハイブリダイズするが、他にもベクターである大腸菌由来のDNA (pRR325)、クロモソーム、RNase処理で失活しなかったRNA (写真-3、4の白斑) にも同時に標識反応をおこすためと推察された。

そこで、最終結果でのバックグラウンドを取り除くため、まず、クロモソーム等の蛋白質やRNaseの混入しないDNAの分画を試み、泳動によって2断片のバンド位置及び精製の程度を確認した。この結果が、写真-5である。

右端のマーカー (kb単位で表示) と対比すると、2断片のバンドは各レーン上の定位置 (上段: pRR217、7.7kb及び下段: pRR325、5.5kb) に分画されており、写真-4の(B)レーンにみられる汚れもなかった。

### 3 pRR217断片の回収と確認に関して

以上、各実験段階でのチェックのうえ、単離したプラスミドDNA (7.7kb及び5.5kb) から、標識用のプローブDNA (pRR217:7.7kb) 断片のみを、低融点アガロース電気泳動法 (実験方法-3) により分画した結果が、写真-6である。

写真-7は、以上の過程を経て精製したプローブ (pRR217) を用いたDNAの解析結果である。

これら実験操作の再検討と各段階での結果の確認から総括すると、本法を用いるRFLPの解析結果が安定しないのは、とりわけ、標識に関与するプラスミドDNA (環状のDNA) の精製が完全でなく、夾雑物 (クロモソーム、蛋白、RNase等) の混入が除去されていないことが大きな原因になっていると推察された。

## IV. おわりに

実験にあたり、実験室の使用を快諾くださった東京大学農学部放射線遺伝研究室、平井篤志教授はじめ、直接御指導頂いた大学院生の中園幹生氏、並びに同研究室の皆様へ深く感謝の意を表します。

## V. 参考及び引用文献

- 加藤龍一：食用きのこ類の品種改良に関する研究 (第1報) - DNAによるキノコの種類及び系統の判別法 -、愛知県林業センター報告、NO.29、P.27~30、1992

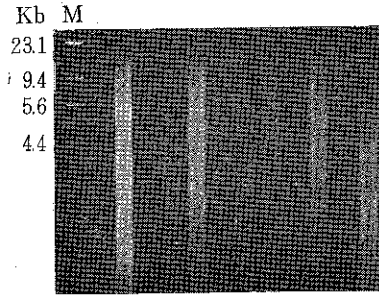


写真-1 全DNAのアガロース電気泳動像

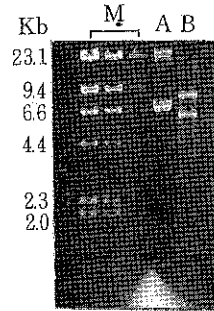


写真-4 プラスミドDNAの単離(A)と制限酵素処理(B)結果  
(A) レーン：(OC：上段, CCC：下段)  
(B) レーン：(pRR217：7.7Kb, pBR325：5.5Kb)

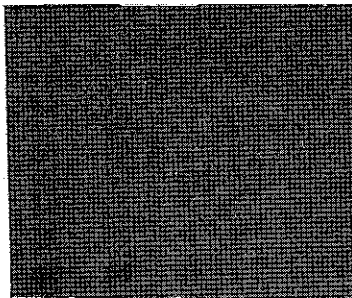


写真-2 全DNAのRFLP解析結果  
—バックグラウンドの出現—

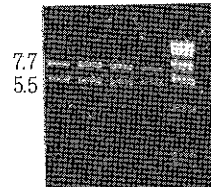


写真-5 プラスミドDNAの制限酵素処理結果  
処理成功 (pRR217：7.7Kb, pBR325：5.5Kb)

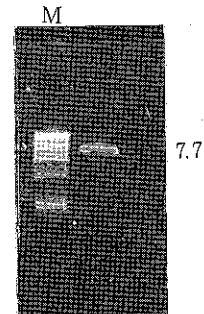


写真-6 プローブDNA (pRR217) 断片の単離結果  
—単離成功 (pRR217：7.7Kb)—

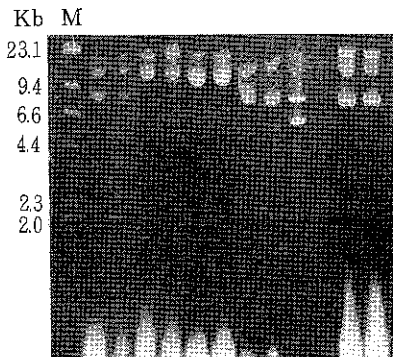


写真-3 LR培養液からのプラスミドDNAの単離結果  
—単離失敗 (pRR217, pBR325)—

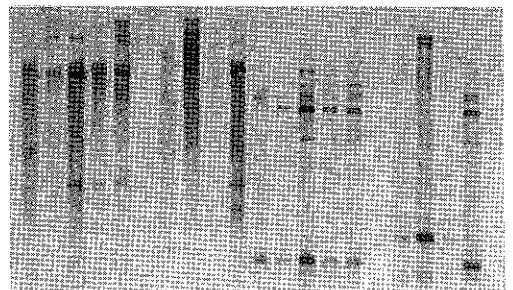


写真-7 全DNAのRFLP解析結果  
—pRR217によるハイブリダイゼーション—

M：マーカー