

PCR反応のための 孢子・菌糸・植物体からの簡便核酸溶出法

研究の内容

糸状菌や植物など強固な細胞壁を有する生物から簡便に核酸を溶出できる方法を開発した。溶出液は直接PCRに利用でき、2 kb以下のPCR産物の増幅が可能である。

技術の背景:

- 生物の遺伝子検索および分類にPCR法が一般に用いられている。
- カビ、きのこ、植物などは細胞の周りに強固な細胞壁を持っている。
- 細胞壁を持つ生物ではPCRによって遺伝子を解析するためには、細胞壁の破碎や溶解など細胞壁の除去操作が必要である。
- 細胞壁の除去操作が煩雑かつ時間がかかるため、多数の生物体を同時に処理することは難しい。
- 近年細胞壁を破碎する機械が販売されはじめたが、高価で実験規模が大きすぎる。
- 生物体から核酸を溶出するため、凍結融解や界面活性剤の利用なども報告されているが、生物体によって効果が異なり、PCR産物が得られないことも多い。

技術の特徴

細胞壁を有する生物体において、低塩濃度または塩の非存在下に熱処理すると生体外に核酸が溶出する。

核酸の溶出は外液の塩濃度に依存しており、高塩濃度溶液下では、溶出が抑制される。

高塩濃度存在下で熱処理することで核酸分解酵素を失活させた後、塩濃度を下げて熱処理することで核酸を溶出させる。これによってPCRに直接供することのできる核酸溶液が得られる。

限外ろ過膜の遠心フィルターがセットされた微量遠心チューブを利用することで、核酸の溶出を20分以内で行うことができる。

今後の展開

本方法のキット化(遠心フィルター利用)を検討する。

近年、生物の分類はPCRによってrRNAの遺伝子配列をPCRで増幅しその配列に基づいて行われる。多くの場合1 kb以下の遺伝子配列が対象となるため、本方法は極めて有効である。

植物では溶出液にPCR反応を阻害する物質がいっしょに溶出されるため、さらに精製が必要である。したがって、植物のためのキット化も検討する。

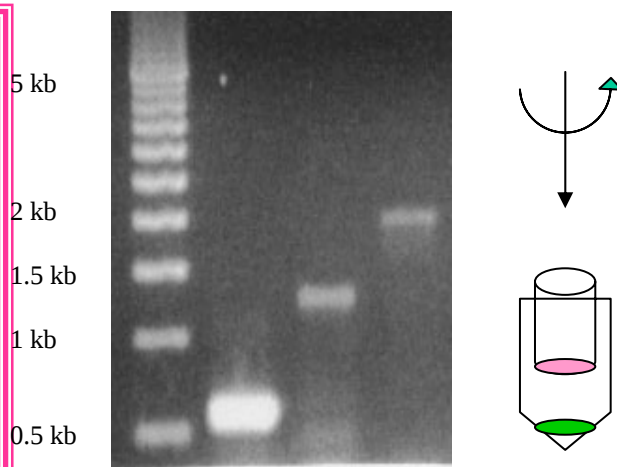


図1. 本溶出法を利用したカビ孢子遺伝子のPCR産物

参考:「生物体から核酸を溶出する方法」特願.2001-212281



代表研究者: 矢部 希見子
所 属: 生物機能開発部 細胞機能研究室

問い合わせ先: 研究交流科 関谷 修三
e-mail: atunisi@nfri.affrc.go.jp

独立行政法人
食品総合研究所