

遺伝子組換え農作物検知法

— 遺伝子組換えアルファルファ定性検知法の開発 —

技術の特徴

・ 2005年、日本に於いて除草剤グリホサート耐性 [Agrobacterium CP4株由来改変型5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatesynthase protein (cp4 epsps) 発現カセットが導入された組換え体] アルファルファJ101、J163系統およびこれらのスタックの流通が認可された。このため、GMアルファルファの検知技術を開発した。

研究の内容

DNA抽出法の検討

・DNAを用いる検査では、検査対象に適した、短時間かつ操作が容易なDNA抽出法が必要とされている

・アルファルファの場合には、種子および葉(スプラウト)からのDNA抽出法が必要



・アルファルファ種子および葉について、PCR検査に好適なDNA抽出法をそれぞれ見出した(表1.)

定性検知用プライマーの設計

・アルファルファ特異的内在性プライマー HMGおよびPDI*、GMアルファルファ系統特異的プライマー2種(図1. A、B)、GMアルファルファ構造特異的プライマー1種(図1. C)の計5種のプライマーセットを設計した

* HMG=High mobility group protein、PDI=Protein disulfide-isomerase

定性検知用プライマーの特異性確認

・内在性プライマーは、アルファルファおよびアルファルファ他系統を鋳型とした場合のみ目的のバンドが確認でき、系統特異的プライマーおよび構造特異的プライマーでは、GMアルファルファを鋳型とした場合のみ、それぞれ目的のバンドが確認できた(図2.)



作製したプライマーは特異性が高く、GMアルファルファの定性検知に使用できる

今後の展開

- ・ 分析法の妥当性確認を行う
- ・ GMアルファルファのモニタリングに利用する

表1. アルファルファから抽出したDNAの品質

葉からのDNA抽出

DNA抽出法	DNA濃度 (ng/μL)		OD260nm / PicoGreen®
	OD260nm	PicoGreen®	
CTAB (JAS)	400.90	105.10	3.81
Mini kit	101.17	81.98	1.23

種子からのDNA抽出

DNA抽出法	DNA濃度 (ng/μL)		OD260nm / PicoGreen®
	OD260nm	PicoGreen®	
CTAB (JAS)	38.8	26.84	1.45
Mini kit	16.25	0.12	135.42
GM quicker (改変)	44.40	42.61	1.04

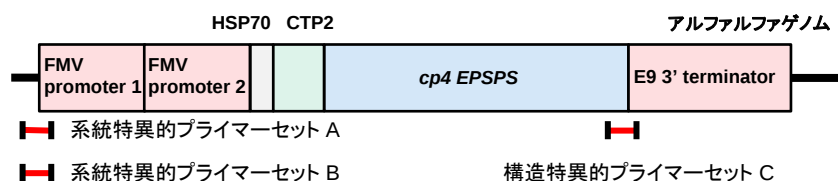


図1. GMアルファルファ組換えカセット模式図

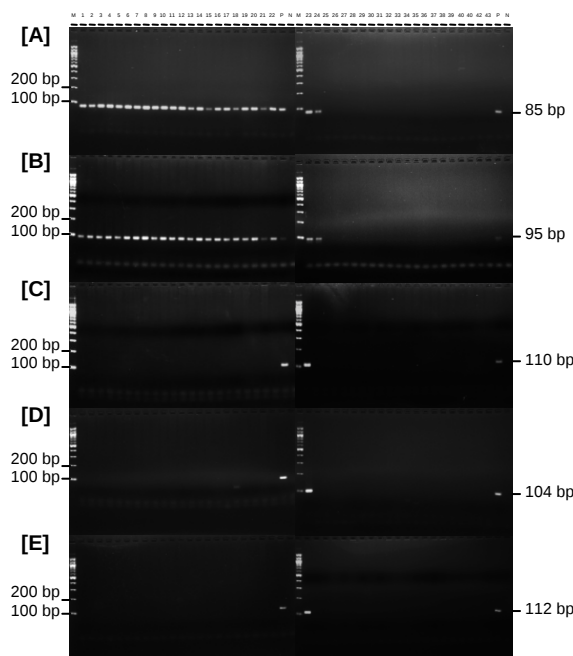


図2. 定性PCRによるプライマーの特異性検討結果

[A]; PDIプライマー、
[B]; HMGプライマー、
[C]; 系統特異的プライマーA、
[D]; 系統特異的プライマーB、
[E]; 構造特異的プライマー
M、100bp ladder マーカー
1、non GM アルファルファ
(葉) 2~22、アルファルファ
他系統 23、GM アルファ
ルファ (種子) 25~29、アル
ファルファ近縁種 30~37、
GM トウモロコシ 38、non
GM トウモロコシ 39、GM ダ
イズ 40、non GM ダイズ
41、イネ 42、コムギ 43、オ
オムギ P、ポジティブコン
ロール N、ネガティブコン
ロール (鋳型なし)