

Paper-disc 法：PCR のためのイネいもち病菌 DNA の簡易調整法

農研機構 中央農業総合研究センター ^{はやの}早野 ^{ゆりこ}由里子・^{はやし}林 ^{けいこ}敬子

はじめに

現在は、イネいもち病菌の個体識別や薬剤耐性菌の遺伝子診断等の場面では、少量の DNA を鋳型にした Polymerase chain reaction (PCR) による検出法が主流となっている。遺伝子増幅酵素の改良が進む一方で、DNA の抽出法の簡略化もすすめられている。本病菌では、菌体や培地成分から溶出される PCR 反応阻害物質の影響などが不明であることから、市販のキットによる抽出が一般的である。しかし、市販キットの使用により、収量、質ともに安定した DNA が得られるが、時間とコストを要することから簡便な抽出法とは言い難い。つまり、強固な細胞壁を有する菌体からの DNA 抽出は、キットを用いても簡易には行えず、また、数回の PCR のためだけに、キットを用いることは経済的であるとは言い難い。特に、モニタリングやスクリーニングのように多検体を扱う場合は、キットを用いない簡易な DNA 調整法を開発することがコスト削減のために不可欠である。筆者らは、PCR 反応に利用可能なイネいもち病菌 DNA の簡易調整法「Paper-disc 法」を開発した（早野ら、2015）。本稿では Paper-disc 法による DNA 調整の概要およびその注意点等について概説する。

I 開発のポイント

PCR 反応液調整や電気泳動の操作段階における大幅な簡略化は難しいことから、PCR において最も重要なステップの一つが、DNA 抽出（調整）手順を効率化することである。DNA 抽出作業は対象生物である菌の特性や状態等に左右されるため、その調整には細心の注意を払う必要がある。しかし、この点をクリアできれば大幅な簡略化が可能となる。イネのいもち病菌を採取～利用するまでの一般的な作業では、①圃場から病斑を採取、②単胞子を分離、③培養・増殖、④分離菌株として保存、そして、分離菌株としてのち、様々な解析が行わ

れる。菌株の保存方法であるろ紙法は、ろ紙片を置いた寒天培地でいもち病菌を培養し、菌が付着したろ紙片を回収・乾燥、凍結させて保存する。本方法は長期間よい状態で菌を保て、検体の取り扱いや運搬等も容易である。そこで、保存用に作製される培養乾燥ろ紙片を利用し、簡便かつ安定に、多検体処理にも適した抽出方法について検討を行った。

II DNA 調整手順

Paper-disc 法による簡易 DNA 調整の操作工程は以下の通りである（図-1）。

- ①複数の滅菌ろ紙片（No.1, $\phi 6$ mm, アドバンテック 東洋）を載せた 0.5% ショ糖加用オートミール寒天培地（ $\phi 60$ mm）を作成する。
- ②いもち病菌片を培地の中央部に静置後、26°C で 7 日間培養する。
- ③菌体が付着したろ紙片（培養ろ紙片）を回収する。
- ④培養ろ紙片は、シリカゲル入り密閉容器もしくはデシケーター内で乾燥する。
- ⑤乾燥した培養ろ紙片を 1.5 ml マイクロチューブに入れる。
- ⑥ TE バッファー（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）200 μ l を添加チューブに添加する。
- ⑦遠心分離（15,000 rpm, 4°C, 30 分間）する。

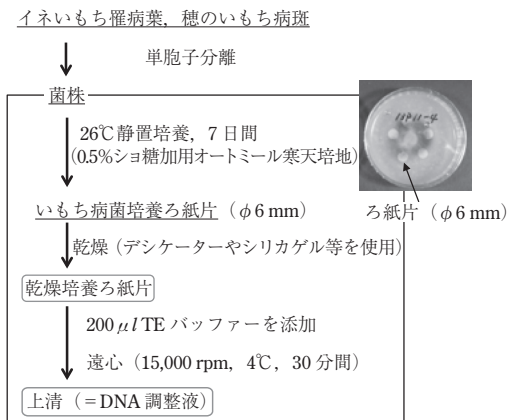


図-1 Paper-disc 法による DNA 液の調整手順

Paper-disc Method: Rapid DNA Preparation for PCR from Rice Blast Fungus. By Yuriko HAYANO-SAITO and Keiko HAYASHI

(キーワード: イネいもち病菌, DNA, 簡易調整法, PCR, Paper-disc 法)