RT-PCR のためのキュウリモザイクウイルスおよび キク矮化ウイロイドの簡易抽出法

楠 幹生・寺見文宏*・十河和博

(香川県農業試験場・*野菜・茶業試験場)

近年, RNA をゲノムとするウイルスやウイロイドの超高度検出法として RT-PCR (逆転写-Polymerase chain reaction) が利用され始めている。すでに, キュウリモザイクウイルス (CMV) およびキク矮化ウイロイド (CSVd) においても RT-PCR による検定法が報告されている^{1,2)}。しかし, これらの検定法は核酸の抽出が複雑で, 多検体の処理には必ずしも適していない。一方, 非フェノール性試薬と蛋白吸着剤を利用した核酸抽出キットが動物細胞等の核酸を抽出するのに用いられている。これらのキットは核酸を迅速に効率良く抽出・回収でき, 操作性が優れていることから, 医学分野での遺伝子診断に利用されている。そこで, 核酸抽出キットを用いて, 抽出した CMV および CSVd の核酸が RT-PCR による検定に利用できるかを検討した。

材料および方法

1) 供試植物

CMV が感染した数種植物および CSVd に感染したキクの生葉, -80°C で 7~60 日保存した凍結葉およびシリカゲル乾燥し, -20°C で 7~60 日保存した乾燥葉を用いた。

2) CMV および CSVd の抽出

核酸の抽出は, フェノールを用いない市販の核酸抽出キット「Sepa Gene」(三光純薬社製: 第 1 図) を用いた。0.05 g の検定試料 (乾燥葉は 0.01 g) をパワーホモジナイザー (池田理化社製) で磨碎し, 100 μl の試薬 I を加えさらに磨碎する。100 μl の試薬 II、50 μl の試薬 V を加えピペットで静かに混合する。700 μl の試薬 III、300 μl の試薬 IV を同時に加えて乳化するまで約 10 秒間上下に激しく振とうさせる。高速遠心 (14,000 rpm, 10 分間) 後, 上清 (水層) をデカンテーションにより別の新しいマイクロチューブに分取する (第 1 図)。水層 500 μl のイソプロピルアルコールを加え, -80°C で約 5 分間静置後, 高速遠心して沈澱を得た。得られた粗核酸沈澱は, CMV の場合には 1 ml の

70%エタノールで洗浄後, 沈澱を減圧下で乾燥し, 50 μl の滅菌蒸留水に溶解して RT-PCR 試料とした。粗核酸試料が RT-PCR に適さないキクなどの植物では CF-11 セルロースによる簡単な精製を行った。全核酸沈澱を 700 μl の STE に溶解し, 300 μl のエタノールと 0.06 g の CF-11 セルロースを加えて 5 分間攪拌後, 3,000 rpm で 2 分間遠心し, 上清を捨てる。沈澱したセルロースに 30%エタノール/STE を加えて同じ操作を 2 回繰り返した後, セルロースを減圧下で乾燥した。乾燥したセルロースに 500 μl の STE を加えて 5 分間攪拌して高速遠心し, セルロースに吸着している核酸を溶出した。400 μl 上清を別のチューブに取ってエタノール沈澱後, 50 μl の滅菌蒸留水に溶解した。さらに精製する場合は, 沈澱を 1.25 M K_2HPO_4 の 400 μl に溶解し 2 メートキシエタノール 400 μl を加え 5 分間攪拌後, 高速遠心を行った。上清 (600 μl) を別のチューブに移し, 等容の 0.2 M 酢酸ナトリウムと半容の 1% 臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) を加え攪拌後, 室温に 30 分間静置し, 高速遠心を行った。沈澱を 0.1 M 酢酸ナトリウムを含む 70%エタノールで洗浄後, 沈澱を減圧下で乾燥し, 50 μl の滅菌蒸留水に溶解した。

3) cDNA 合成反応および PCR 反応

cDNA 合成反応および PCR 反応は, GeneAmp RNA PCR Kit (宝酒造社製) を用いて行った。逆転写酵素, 基質等を含む cDNA 合成反応液に, 上記の方法により抽出した核酸, 相補的なプライマーを 20 pmol 加え, 42°C で, 15 分 cDNA 合成を行った。反応終了後, さらに相同的なプライマーを 20 pmol, DNA ポリメラーゼ等を含む PCR 反応液を加え, CMV の場合は 95°C , 30 秒 $\rightarrow 50^{\circ}\text{C}$, 1 分 $\rightarrow 72^{\circ}\text{C}$, 2 分を 1 サイクルとするインキュベーションを, CSVd の場合は 95°C , 1 分 $\rightarrow 60^{\circ}\text{C}$, 1 分を 1 サイクルとするインキュベーションを 30 サイクル繰り返し, 反応液 5 μl を 2.0%アガロースゲル電気泳動で分析した。プライマー

Mikio KUSUNOKI, Fumihito TERAMI* and Kazuhiro SOGOU (Kagawa Pref. Agr. Exp. Sta., Nat. Res. Inst. Veg. Orn. Plants&Tea): A Simple Method for Extracting RNA of Cucumber Mosaic Virus and Chrysanthemum Stunt Viroid by the Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction.

1993 年 2 月 24 日受理

は、CMV および CSVd のいずれの場合も既報のものを使用した^{1,2)}。

第1図 核酸抽出剤とデカンテーションによる核酸の分取

結果

1) 数種の CMV 感染植物からの抽出した核酸の RT-PCR

Sepa Gene を用いた抽出法で得られた CMV 感染タバコ、キュウリおよびカボチャの粗核酸をそのまま RT-PCR に供試したところ、CMV の感染を示す約 650 bp の DNA 断片が増幅したが、健全キュウリの場合では約 650 bp の DNA 断片は増幅しなかった(第2図)。増幅された DNA 断片量は生葉、凍結葉および乾燥保存葉で大きな差は見られなかった。タバコおよびキュウリの生葉、凍結保存葉および乾燥保存葉、カボチャの乾燥保存葉から抽出した粗核酸の場合は、約 650 bp の DNA 断片以外の DNA 断片はほとんど増幅しなかった。カボチャの生葉、凍結保存葉から抽出した粗核酸の場合は、約 650 bp の DNA 断片とは異なる大きさの DNA 断片も増幅する場合があったが、それらの DNA 断片のバンドは薄く、目的の DNA とは明瞭に区別できた。

第2図 RT-PCR 法による CMV の検出

A : 健全キュウリ, B : 罹病タバコ,

C : 罹病キュウリ, D : 罹病カボチャ。

① : 生葉, ② : 凍結葉, ③ : 乾燥葉を示す。

M は分子量マーカー。

2) CSVd 感染キク葉から抽出した核酸の RT-PCR

キクの CSVd 感染葉から Sepa Gene を用いた抽出法で得られた粗核酸を RT-PCR に供試したところ、CSVd の感染を示す約 350 bp の DNA 断片は増幅されなかった(第3図 A)。しかし、CF-11 セルロースで簡易精製したものでは、目的の DNA 断片の十分な増幅が認められた(第3図 B)。簡易精製核酸から増幅した DNA 断片量は、さらに、2-メトキシエタノールと CTAB で精製した試料の場合と同等であった(第3図 C)。凍結保存葉および乾燥保存葉から抽出した核酸を用いても、生葉の場合と同様の結果が得られ、核酸抽出に要した時間は、簡易精製を含めても、従来の 1/3 に短縮された。

第3図 RT-PCR 法による CSVd の検出

A : SepaGene 抽出, B : CF-11 セルロース処理,

C : CTAB 処理まで精製した試料。H : 健全葉,

① : 生葉, ② : 凍結葉, ③ : 乾燥葉を示す。

M は分子量マーカー。

考察

医学分野の遺伝子診断では、効率的な検定を実施するため、非フェノール系試薬を用いた市販のキットが利用されている。本試験では、そのようなキットの一つである Sepa Gene を CMV の RNA および CSVd の抽出に応用するとともに、精製方法を簡略化して、それぞれの RT-PCR による検定の実用性を向上させることができた。CMV については、タバコ、キュウリおよびカボチャから検出する場合は、抽出後の精製が必要でなかったため、従来法の 1/2 の時間で RT-PCR に適した核酸調製が行えた。CSVd については、従来法で実施していたメトキシエタノールおよび CTAB 処理を省略し、CF-11 セルロース処理の簡略化により、核酸調整に要する時間が 1/3 に短縮された。また、CMV および CSVd とともに検定数や必要性に応じて試料を凍結および乾燥保存して検定できることが明らかになった。

引用文献

- 1) 楠 幹生・寺見文宏・寺内英貴・十河和博 (1992) 関西病虫研報(35): 7-12.
- 2) 高松 進 (1993) 今月の農業 37(9): 86-89.