

## オオムギのECL法及びDIG法を用いたRFLPの検出

五月女敏範・小山内英一\*・長村吉晃\*\*

摘要：オオムギのRFLP分析において、非放射性検出法であるECL法及びDIG法の確立を目的に、RFLP検出条件を検討した。DIG法では、始めに、イネDNA及び同プローブを用いてハイブリダイゼーションバッファー、プローブ濃度、発光基質など基礎条件について検討した。結果は、標準バッファーを用いることにより、ほぼ安定してシグナルを検出することができ、プローブ濃度は20ng/mlが適当であった。発光基質のCDP-StarはCSPDより発光開始時間が早く、シグナルも強い発光特性を持つことが確認された。CDP-Starの最適濃度は露光時間を約1時間とした場合に約2000倍希釈と推定された。ECL法及びDIG法によるRFLP検出条件は、オオムギ他主作物DNAとイネ及びオオムギプローブを用いて、フィルターの種類とプロットング法について検討した。結果は、いずれの方法でもアルカリプロットング法が良く、フィルターはECL法ではHybond N+が最も良く、Positively chargedがこれに準じた。DIG法では、Positively chargedが良好で、Hybond N+は不適であった。検出感度は、DIG法の方が高く優っていた。また、今回の結果から、ゲノムサイズの大きいオオムギでもECL法やDIG法など非放射性検出法によるRFLP分析が十分可能なことが明らかとなった。

キーワード：オオムギ, ECL法, DIG法, RFLP

### Detection of RFLP by Non-Radioactive Labeling System, ECL and DIG, on Barley Genomic DNA

Toshinori SOTOME, Ei-ichi OSANAI, Yoshiaki NAGAMURA

Summary: The detectable condition of RFLP by non-radioactive nucleic acid labeling methods, ECL-system and DIG-system, were investigated for RFLP analysis of barley. In DIG-system, hybridization buffer, probe concentration and luminescent substrate were examined using rice genomic DNA and the probe of rice. The luminescent signals were stably detected by use of the standard buffer for DIG-system, in which the optimum probe concentration was 20 ng/ml. The luminescent reaction was earlier and the signals were stronger, using a new luminescent substrate, CDP-Star, than CSPD. The suitable concentration of CDP-Star was estimated approximately 2000 times dilution for one hour exposure.

Nature of membrane filter and the blotting methods for detecting RFLP by ECL-system and DIG-system were tested using barley genomic DNA and the probe of rice or barley. Alkaline-blotting methods showed better results than SSC-blotting for the both detective systems. In ECL-system, the Hybond N+ membrane was most appropriate for the detection and the positively charged membrane was next to that. On the other hand in DIG-system, the positively charged membrane was suitable for the detection. And the Hybond N+ membrane was inappropriate, in which the background was too over to detect polymorphic bands. DIG-system was superior to ECL-system in sensitivity. The detection of RFLP by non-radioactive nucleic acid labeling methods, such as ECL-system and DIG-system, were enough possible even on barley with large genome size than rice.

Key words : barley, ECL-system, DIG-system, RFLP

## I 緒言

近年、DNA 多型を検出する技術が開発され、それを利用した研究も多岐にわたっている。最近では、犯罪捜査における DNA 鑑定や病原性大腸菌レースの同定などで話題となっている。植物育種においては、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限酵素断片長多型) 分析法や RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA: 任意増幅断片多型 DNA) 分析法を用いた系統識別・分類や病害抵抗性遺伝子の選抜が行われている。また、これら分析法によるゲノム解析研究の推進により、多くの作物で RFLP プローブ、PCR (Polymerase Chain Reaction) プライマーをマーカー (以下、DNA マーカー) とする連鎖地図が作成され、イネやオオムギではこれらの DNA マーカーを用いた QTL (Quantitative Trait Loci: 量的形質遺伝子座) 解析による農業上重要な形質の遺伝子地図が作成されている<sup>1)</sup>。今後、これら DNA マーカーを用いて有用遺伝子の単離やその遺伝子の迅速かつ的確な選抜による育種の効率化が期待されている。

しかしながら、RFLP 分析法は放射線性同位元素標識を用いて RFLP 検出を行っている (以下、RI 法) が、そのためには専用の放射線利用施設や処理施設が無ければ研究ができないことが問題となっている。放射線を用いない方法として、科学発光系 (ペルオキシダーゼ、ジゴキシゲニンなど) を利用し非放射性発光物質 (ルミノール、CSPD など) 標識を用いる非放射性検出システム (以下、ノン RI 法) の ECL 法や DIG 法などがあるが、ECL 法はゲノムサイズの小さいイネでは手法が確立しているものの、ゲノムサイズの大きいオオムギなどではシグナルが弱く感度が低いため、その適応が難しく実用化されていなかった。オオムギでは ECL 法で山口ら<sup>2)</sup>の 1 例だけがある。また、シグナルの強い DIG 法ではノーザン、コロニーハイブリダイゼーション等で使用されているものの、サザンハイブリダイゼーションでは ECL 法より検出が不安定なこと、フィルターのリハイブリ性が劣ること、操作が複雑であることによりほとんど用いられていない。

今後、ノン RI 法による RFLP 解析がオオムギをはじめ種々の作物で適用されると考えられるが、現在これら方法での RFLP 検出の可能性や条件設定の研究はあまりされていない。

今回、オオムギの RFLP 解析に必要なとってくる非放射性検出システム (ECL 法、DIG 法) を用いた検出条件検討を行ったので、ここに報告する。

## II 試験方法

### 1. DIG法におけるRFLP検出

DIG 法はイネやオオムギでは方法が確立していないため、以下の検出条件の検討を行った。(1)ハイブリダイゼーションバッファー: Boehringer Mannheim 社推奨の高 SDS バッファーと標準バッファーを改善した方法 (第 1 表) を検討した。(2)プローブ濃度: 5, 20, 100 及び 200 ng/ml の 4 水準で検討した。(3)発光基質: 現在 CSPD が標準的に使用されているが、新しい発光基質の CDP-Star について適正濃度と発光特性について検討した。基質濃度は 200, 400, 800 及び 1600 倍希釈液 (メーカー推奨は 100 倍) に浸漬し露光開始後 30 分または 1 時間毎の発光量を調査し、検討した。発光特性は、400 倍希釈液に浸漬し露光開始後 30 分間は 15 分間毎、その後は 1 時間毎に 15 分間及び 45 分間の発光量を調査した。(4)リプローブ性: DIG 法では、リプローブ性 (フィルターの複数回使用) が劣ることが問題となるので、検出の終了したフィルターをストリッピング処理 (0.2M NaOH-0.1%SDS 30min) した後、異なるプローブをハイブリダイズさせ、前回ハイブリダイズさせたプローブの有無を確認した。これらの検討では、サザンハイブリダイゼーション用のナイロンメンブレンフィルターは Posistively charged (Boehringer Mannheim 社) を用い、DNA はイネ (品種名: 日本晴, Kasalath) を制限酵素 BamH I, Bgl II, EcoR V, Hind III, Apa I, Dra I, EcoR I 及び Kpn I でそれぞれ切断処理し、これら断片を 0.6%アガロースゲル電気泳動により分離した後、アルカリ法 (0.4M NaOH, 12hr) でプロットイングし、120 °C 20min で固定した。プローブは、(1)及び (3)の実験ではイネプローブを濃度 20ng/ml でハイブリダイズした。発光基質は、(1)及び(2)の実験では CSPD を 200 倍希釈で用いた。

第1表 DIG法における検討バッファー

バッファー名 (ハイブリ温度)	組成
高 SDS Buffer (42 °C)	5% SSC 2% Blocking reagent 0.1% Lauroylsarcosine 7% SDS 50% Formamid 50mM Sodiumphosphate buffer
標準 Buffer (68 °C)	5% SSC 1% Blocking reagent 0.1% Lauroylsarcosine 0.02% SDS

### 2. オオムギのノンRI検出システム

ノン RI 法として、ECL 法及び DIG 法を用いた。ECL 法は RGP (Rice Genome Reserch Program) で行われている

方法<sup>9)</sup>を、DIG 法は前記1. DIG 法における RFLP 検出により改善された方法で試験を行った。各法におけるサザンハイブリダイゼーションの条件としてフィルターの種類及びプロテイング法について検討した。フィルターは、Posistively charged, Hybond N (Amersham 社) 及び Hybond N+ (同) を用い、プロテイング法はアルカリ法及び SSC 法 (0.25N HCl 10min, 0.5M NaOH-1.5M NaCl 30min, 0.5M Tris (pH7.5)-1.5M NaCl 15min × 2, 20 × SSC 10min) を検討した。これらの検討に用いた DNA は、オオムギ(勳他, イネ(日本晴, Kasalath), ダイズ(小糸在来), コムギ(農林 61 号)で、それぞれ植物体の成葉より CTAB 法により抽出した。ハイブリダイゼーション用のフィルター作成は、各種 DNA を制限酵素 *Hind III*, *EcoR I* でそれぞれ切断処理し、これらの断片を 0.6%アガロースゲル電気泳動により分離した。DNA のアプライ量はオオムギ 2.0, 5.0, 8.0ng/well, イネ 2.0, ダイズ 4.0, コムギ 2.0, 5.0 とした。トランスファーはキャピラリー法、固定は 120 °C 20min で行った。プローブは、イネ (C9A), オオムギ (B388) プローブを用い、20ng/ml の濃度でハイブリダイズした。

尚、以上の実験は、1996 年 1 から 2 月に実施した。

### III 結果及び考察

#### 1. DIG法におけるRFLP検出

##### 1) ハイブリダイゼーションバッファー

標準バッファーでは多少バックの濃淡が出る場合もあるもののほぼ安定してシグナルを検出することができた(第 1 図)。メーカーの推奨する高 SDS バッファーでは、バックの上昇が著しく、洗浄条件を厳しくしても安定したシグナルを確認することができなかった。高 SDS バッファー法は、ハイブリ温度が高温でないため操作上は有利であるが、この方法を用いるためにはバックの濃度を下げる種々の検討が必要と思われる。

##### 2) プローブ濃度

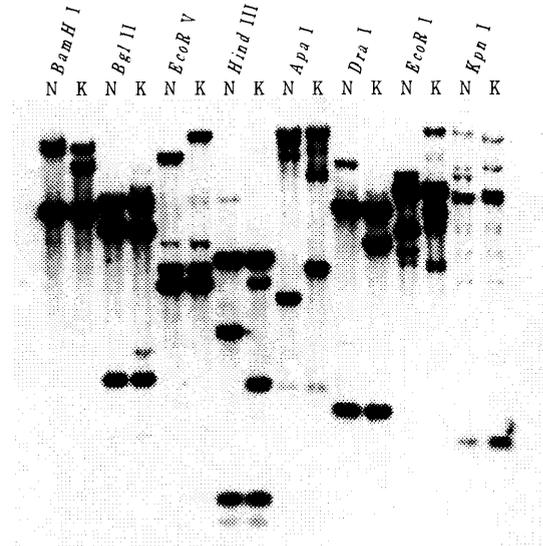
プローブ濃度とシグナルの強さ、バックの上昇の度合いを調査した結果は、シグナルの強さはプローブ濃度が増すにつれて強くなったが、濃度に比例しなかった。バックは 20ng/ml では低く像は鮮明であったが、100ng/ml 以上ではかなり高くなった(第 2 図)。これらの結果から、プローブ濃度は 20ng/ml 前後が適当と考えられた。

##### 3) 発光基質

CDP-Star の各濃度での露光は、濃度が濃くなるに従いバック、シグナル共に高くなった。今回の結果では、1600 倍希釈液でも露光開始直後の 30 分間で十分な発光量が得られ、それより濃い濃度ではバックも著しく高くなった(第 3 図)。発光特性は、CSPD は露光開始後 2 時間より発光が活性化し

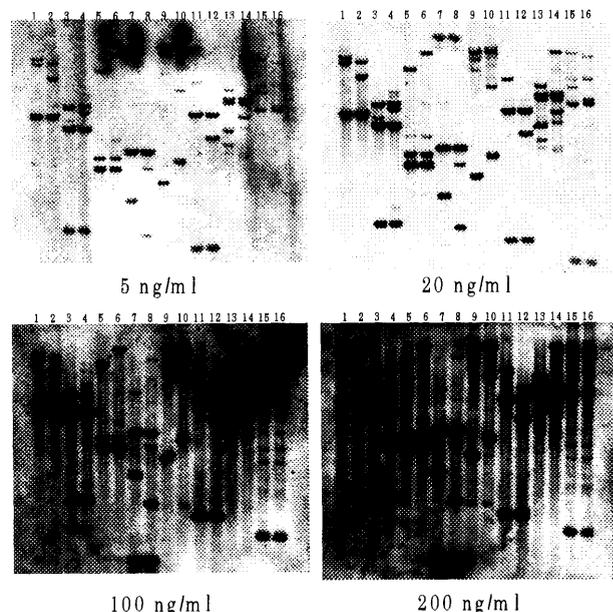
3 時間位でピークに達するが、CDP-Star は発光活性化が早く露光開始後の 15 分後から発光が強くなり、1~2 時間後からほぼ最高(平衡状態)に達し今回の調査では約 7 時間後まで発光量は安定していた(第 4 図)。

これらの結果から、CDP-Star の最適な濃度は露光時間を約 1 時間とした場合には約 2000 倍希釈、約 30 分した場合は約 1000 ~ 1500 倍希釈と推定された。CDP-Star は CSPD よりも発光開始が早く、強くかつ長時間にわたる発光



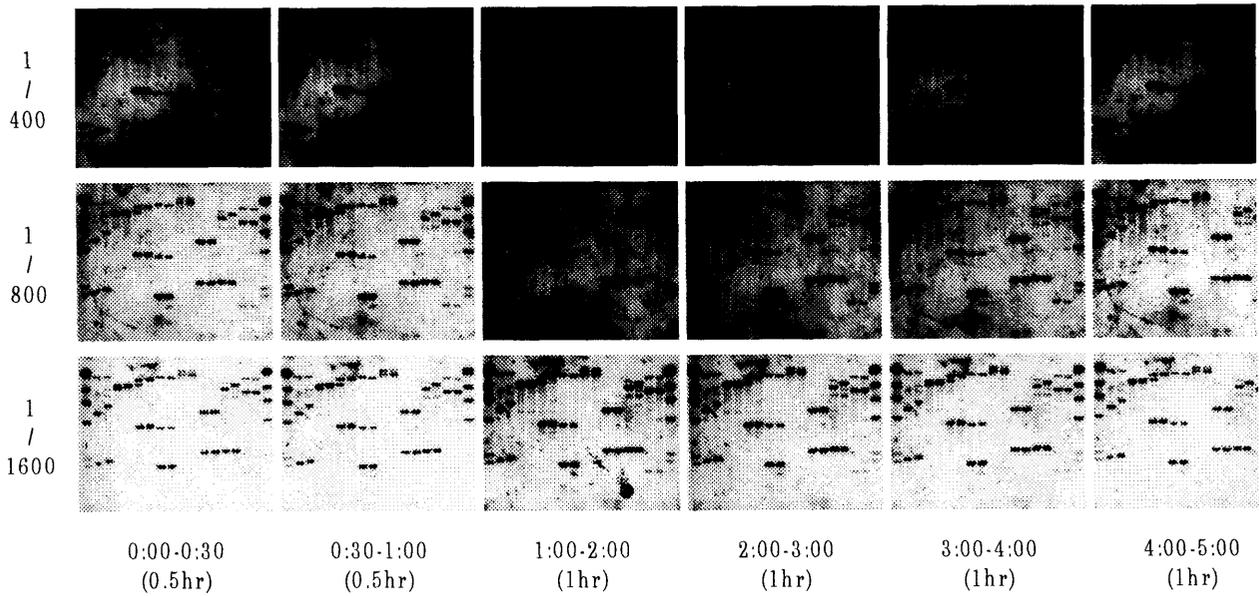
第1図 DIG標準バッファー法におけるRFLP結果

プローブ:イネ C9A, ハイブリ条件: 20ng/ml, 1/200CSPD, 露光条件: 37 °C, 3hr, N: 日本晴, K: kasalath.



第2図 DIG法におけるプローブ濃度

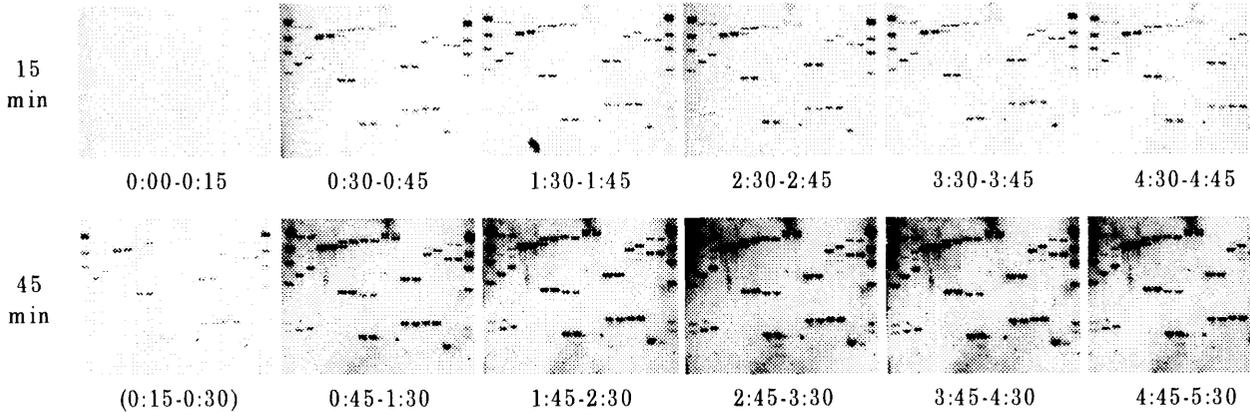
ハイブリ条件は、プローブ濃度以外は第1図と同じ。



第3図 CDP-Starの濃度とシグナルの変化

時間は露光開始後からの経過時間(hr:min), ( )は累積露光時間. 1/200 はバックの上昇が著しくシグナルを検出することができなかった.

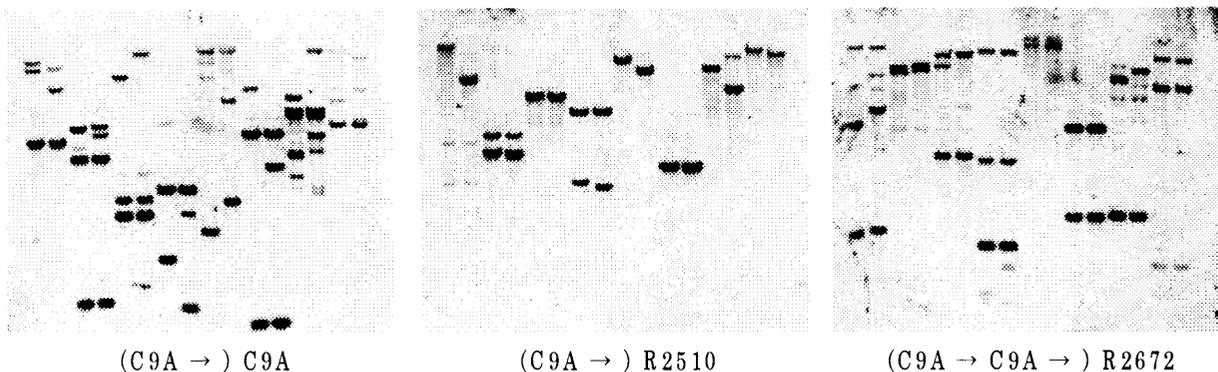
プローブ:イネ R2672, ハイブリ条件:発光基質, 露光時間以外は第1図と同じ.



第4図 CDP-Starの発光特性;シグナルの経時的変化

下段数字は露光開始後からの経過時間(hr:min), 左数字は累積露光時間.

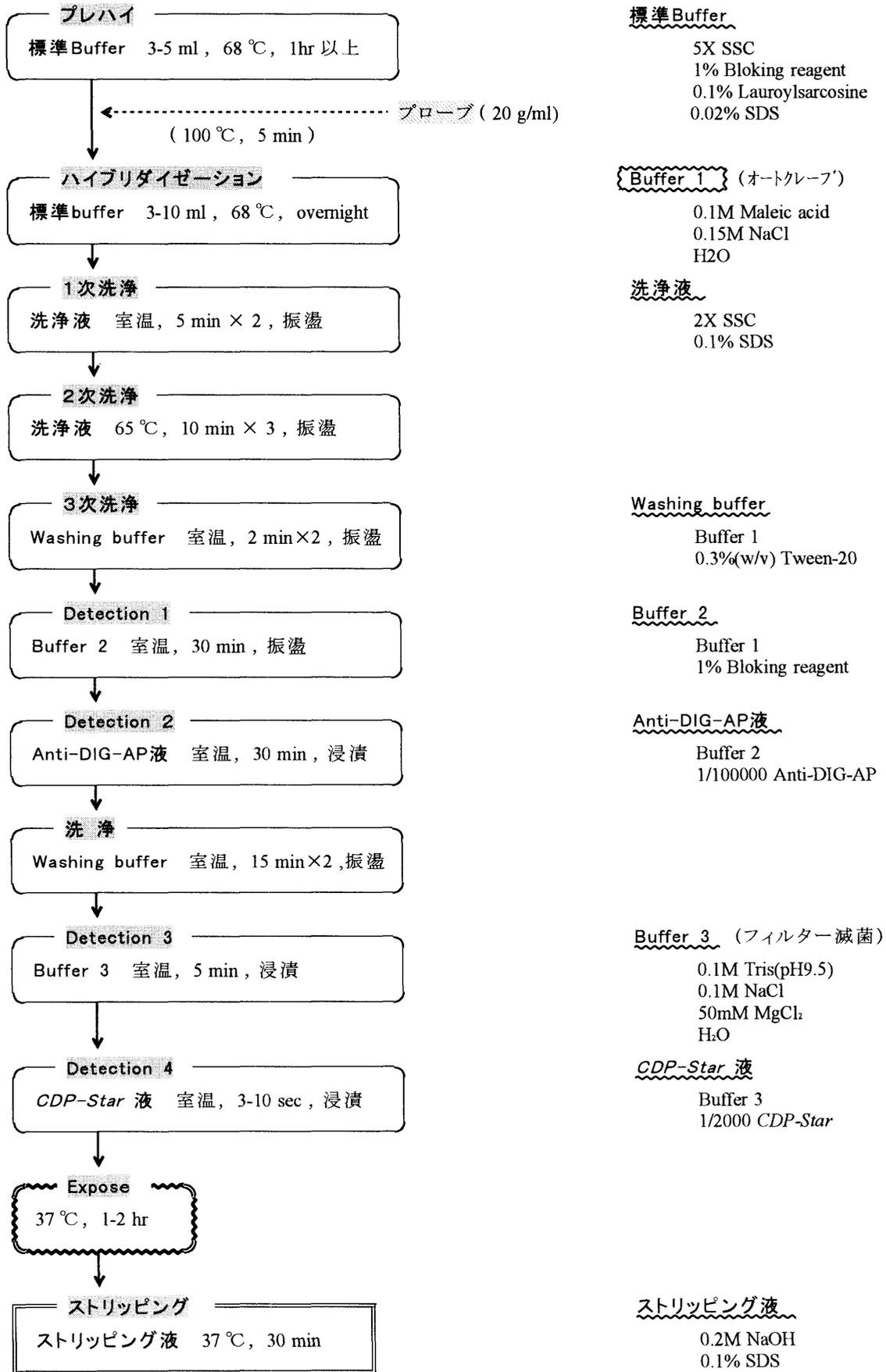
CDP-Star:1/400, プローブ:イネ R2672. ハイブリ条件:発光基質, 露光時間以外は第1図と同じ.



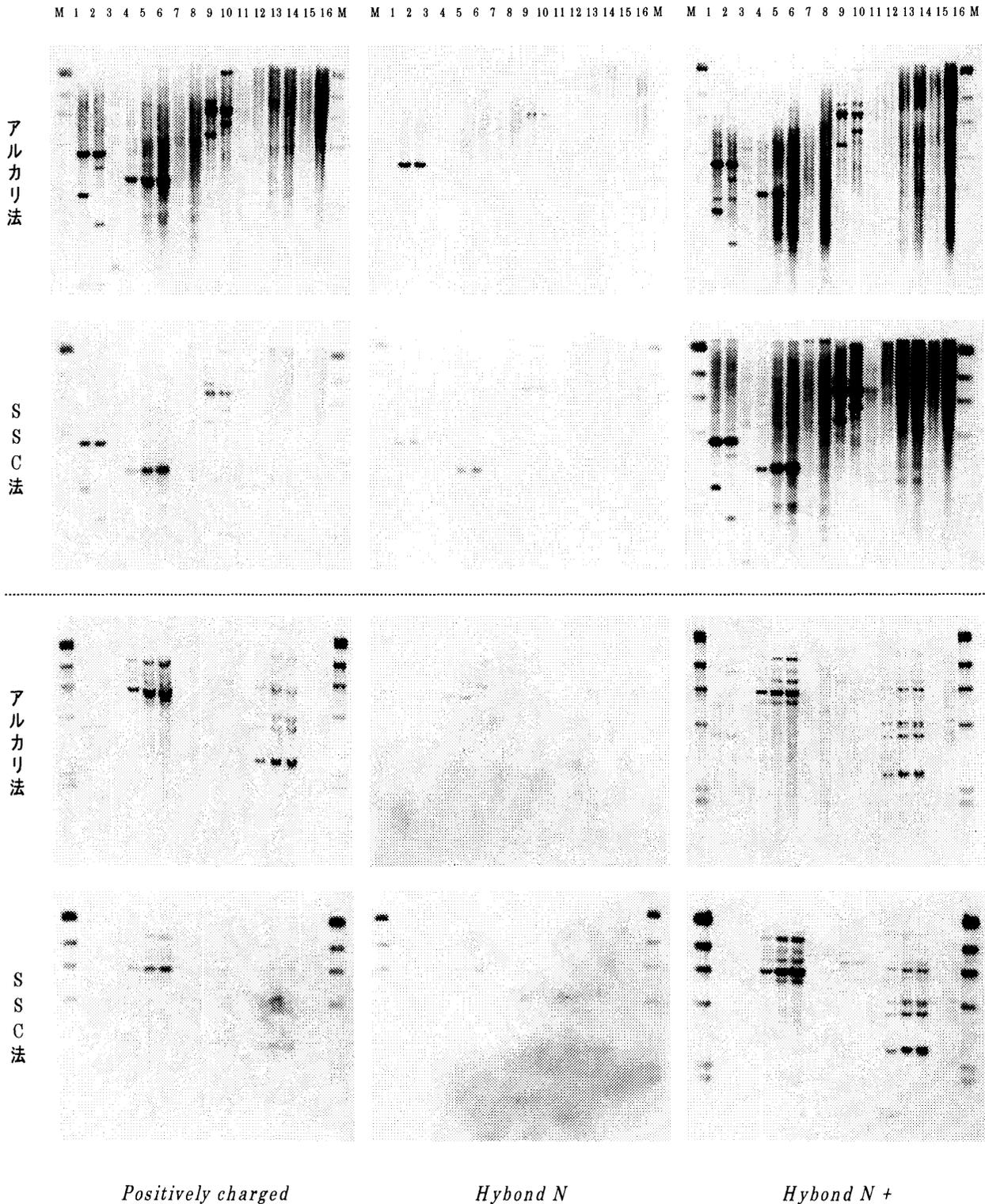
第5図 DIG法におけるリプローブ結果

各フィルターとも前回または前々回 C9A をハイブリダイズし, 0.2M NaOH-0.1%SDS でストリッピング処理.

オオムギの ECL 法及び DIG 法を用いた RFLP の検出



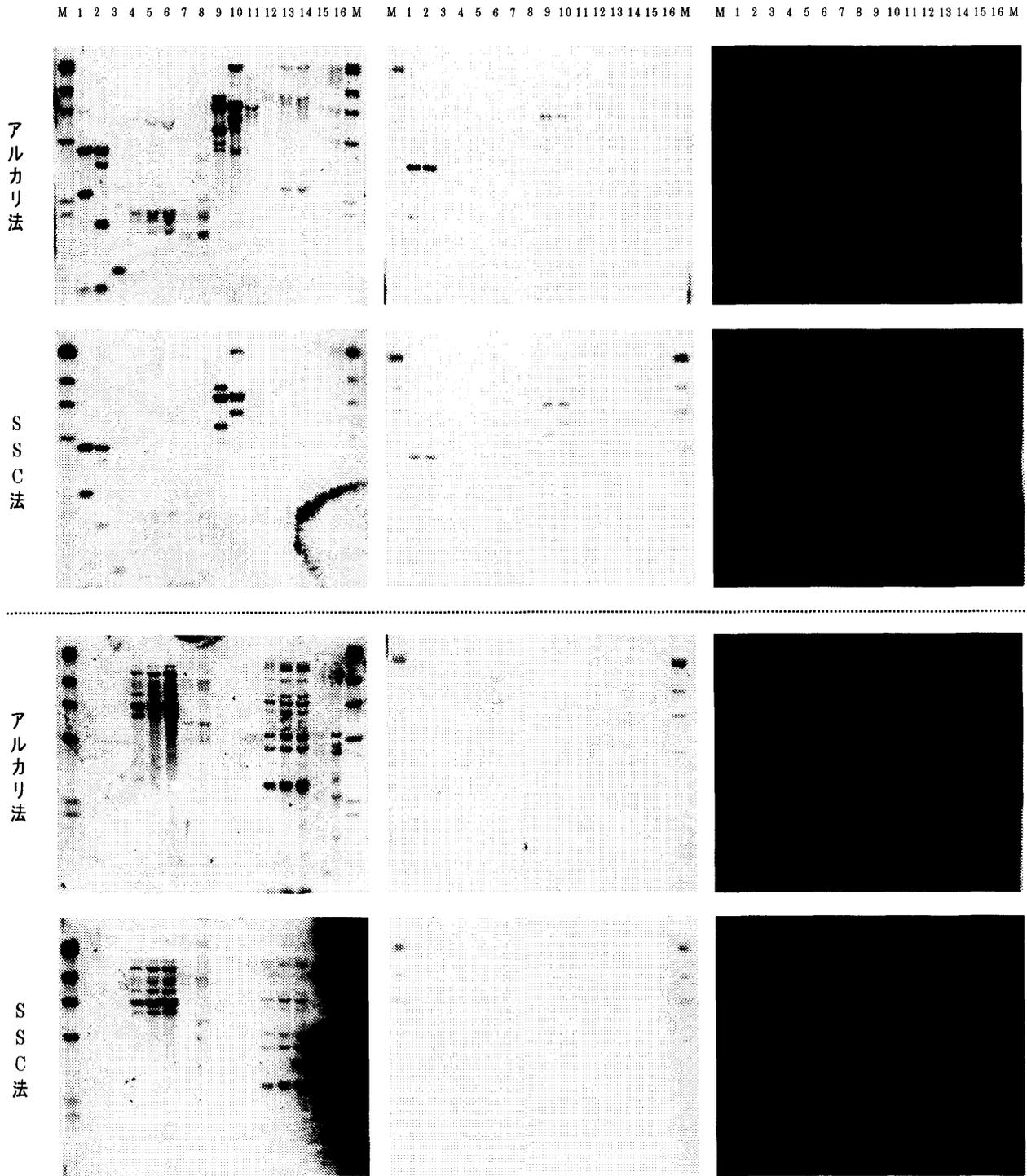
第6図 DIG法を用いたRFLP検出プロトコールフロー図



第7図 ECL法におけるフィルターの種類及びプロットング法の検討結果

DNA : 1,2,9,10.イネ (2ng/well), 3,11.ダイズ (4), 4,12.オオムギ (2), 5,13.同 (5), 6,14.同 (8), 7,15.コムギ (2), 8,16.同 (5), M.  $\lambda$  / *HindIII* ダイジェストマーカー. 酵素処理: 1-8. *HindIII*, 9-16. *EcoRI*. プローブ: イネ C9A (点線上), オオムギ B388 (点線下), 20ng/ml. 4hr. expose. *Positively charged*・アルカリ法プロットングフィルターは, 電気泳動ゲルにエチジウムブロマイドが入っていたためにややスマイリングを起こしている.

オオムギの ECL 法及び DIG 法を用いた RFLP の検出



*Positively charged*

*Hybond N*

*Hybond N +*

第8図 DIG法におけるフィルターの種類及びプロット法の結果

標準 buffer, 1/200 CSPD, 37 °C 3hr.expose. 各種条件は第7図と同じ.

特性を持っているため、露光時間の長短によりシグナルコントロールが容易であり、また短時間露光による実験時間の効率化を図ることも可能と考えられた。さらに、オオムギなどゲノ

ムサイズが大きくシグナルの弱い植物でも RFLP 検出が有効と思われた。

4) リプローブ性

リブローピングの結果では、異なったプローブをハイブリダイズした場合、前回のゴーストバンドが極めてわずかながら検出されたが、実用上は問題ないと考えられた(第 5 図)。今回の実験では3回までの使用が確認されたが、フィルターの耐用回数がどれ位なのか、また、使用を重ねた場合にこのゴーストバンドシグナルの強さがどの様になるかは不明であった。

以上の結果から、DIG 法を用いた RFLP 検出法のプロトコールフロー図を第 6 図の通り作成した。

## 2. オオムギのノンRI検出システム

### 1) ECL 法

DNA の吸着は、フィルターでは *Hybond N+* > *Positively charged* > > *Hybond N* の順で、プロテイング法では、*Hybond N+*を除いて、アルカリ法 > SSC 法の順であった。RFLP バンドのシャープさではアルカリ法 > > SSC 法であった。(第 7 図)。

ECL 法におけるオオムギの RFLP 検出結果では、今回用いたオオムギ及びイネプローブではシグナルを十分確認することができた。

### 2) DIG 法

今回の結果では、*Hybond N+*はいずれのプロテイング法でもバックの上昇が著しくシグナルの検出は困難であった(第 8 図)。バックの上昇の程度は *Positively charged* ではやや高く、*Hybond N* はほとんどバックの上昇が見られなかった。DNA の吸着、バンドのシャープさは ECL 法と同様で、フィルターでは *Positively charged* > > *Hybond N*、プロテイング法ではアルカリ法 > > SSC 法の順であった(第 8 図)。各条件におけるストリッピング状況はいずれも良好であり、リプローブは可能と考えられた。

DIG 法でのオオムギの RFLP 検出結果は良好で、特にオオムギプローブをハイブリダイズした場合には ECL 法に比べてシグナルも強く、検出バンド数も多かった。

以上の結果から、ECL 法においてはフィルターは *Hybond N+*でアルカリプロテイング法が最も良く、*Positively charged* でアルカリプロテイング法が準じた。同様に DIG 法ではポジティブチャージでアルカリ法が良いと考えられた。さらに、RFLP 分析を ECL 法と DIG 法で行う場合には、*Positively charged* を用いてアルカリ法でプロテイングし、サザンハイブリダイゼーション用フィルターを作成すれば、1 つのフィルターで両方法により検出ができると考えられた。

また、今回の結果より、ゲノムサイズの大きいオオムギでも ECL 法や DIG 法などのノン RI 法により RFLP 分析が十分可能なことが明らかになった。

### 3. ECL法とDIG法の検出感度の違い

オオムギのノン RI 検出システムにおいて、ECL 法と DIG 法の結果で、*Positively charged*、*Hybond N* フィルターでのシグナルの検出感度を比較した場合、ECL 法ではややスムーズにシグナルが検出されているのに対し、DIG 法ではクリアことなどから、DIG 法の方が特異性が上がる条件にもかかわらず、検出されるバンドの数及びシグナルの強さは DIG 法の方が上回っていた。このことから、検出感度は DIG 法の方が高いと考えられ、また、DIG 法においては洗浄等の条件によって特異性の強弱を変えることによりシグナルコントロールもできると推定された。

### 謝 辞

本研究は、(社)農林水産先端技術産業センター 農林水産先端技術研究所にて実験を行ったが、実験遂行にあたり、技術的指導を頂いた R.G.P.の諸氏に心より感謝の意を表す。

### 引用文献

1. Kurata,N., Y.Nagamura, K.Yamamoto, Y.Harushima, N.Sue, J.Wu, B.A.Antonio,A.Shomura, T.Shimizu, S.Y.Lin, T.Inoue, A.Fukuda, T.Shimano, Y.Kuboki, T.Toyama, Y.Miyamoto, T.kirihara, K.Hayasaka, A.Miyao, L.Monna, H.S.Zhong, Y.Tamura, Z.X.Wang, T.Momma, Y.Umehara, M.Yano, T.Sasaki and Y.Minobe (1994) A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequence. *Nature Genetics* 8:365-372.
2. Hayes,P.M., B.H.Liu, S.J.Knapp, F.Chen, B.Jones, T.Blake, J.Franckowiak, D.Rasmusson, M.Sorrells, S.E.Ullrich, D.Wesenberg and A.Kleinhofs (1993) Quantitative trait locus effects and environmental interactin in a sample of North American barley germ plasm. *Theor Appl Genet.* 87:392-401.
3. 山口修, 矢野昌裕, 佐々木卓治 (1996) 日本のビール大麦系統間の RFLP 検出頻度 育雑. 46(別 1):98
4. 分子マーカーを利用した有用形質の遺伝解析方法 農林水産先端技術振興センター