

オオムギのECL法およびDIG法を用いたRFLPの検出

1. 試験のねらい

現在、イネをはじめ多くの植物（作物）でRFLP（制限酵素断片長多型）分析法などを用いて、ゲノム解析研究が盛んに進められている。オオムギでは、NABGMP（北米大麦ゲノムマッピングプロジェクト）らによりDNAマーカー連鎖地図やQTL（量的形質遺伝子座）地図が作られている。今後は、これらのDNAマーカーを用いて有用遺伝子の同定や選抜の効率化が期待されている。

ところが、RFLP分析法は主に放射線を利用して行われているため、専用の放射線利用施設や処理施設がなければ研究ができず、また、放射線を用いないECL法やDIG法は、オオムギのようなゲノムサイズの大きい植物ではその適用が難しいことが問題となっている。当然、それらの適用性や条件設定の研究も少ない。

そこで、一般施設で利用のできるDIG法やECL法によるRFLP検出条件の検討を行い、その手法を確立し、実用化を図った。

2. 試験方法

(1) DIG法の基礎条件検討

イネDNA及びイネプローブを用いて、ハイブリダイゼーションバッファー（高SDSバッファー、標準バッファー）、プローブ濃度（5、20、100、200ng/ml）、発光基質（CSPD、CDP-Star）、リプローブ性について、検討を行った。

(2) ECL法及びDIG法によるオオムギRFLP検出条件検討

主に、フィルターの種類（Positively charged、Hybond N、Hybond N+）とプロットティング法（アルカリ法、SSC法）について検討を行った。DNAはオオムギ他、イネ、コムギ、ダイズ主要作物を用い、供試濃度はゲノムサイズの大きいオオムギ、コムギはそれぞれ3、2水準で行った。プローブはイネとオオムギを用いた。

3. 試験結果および考察

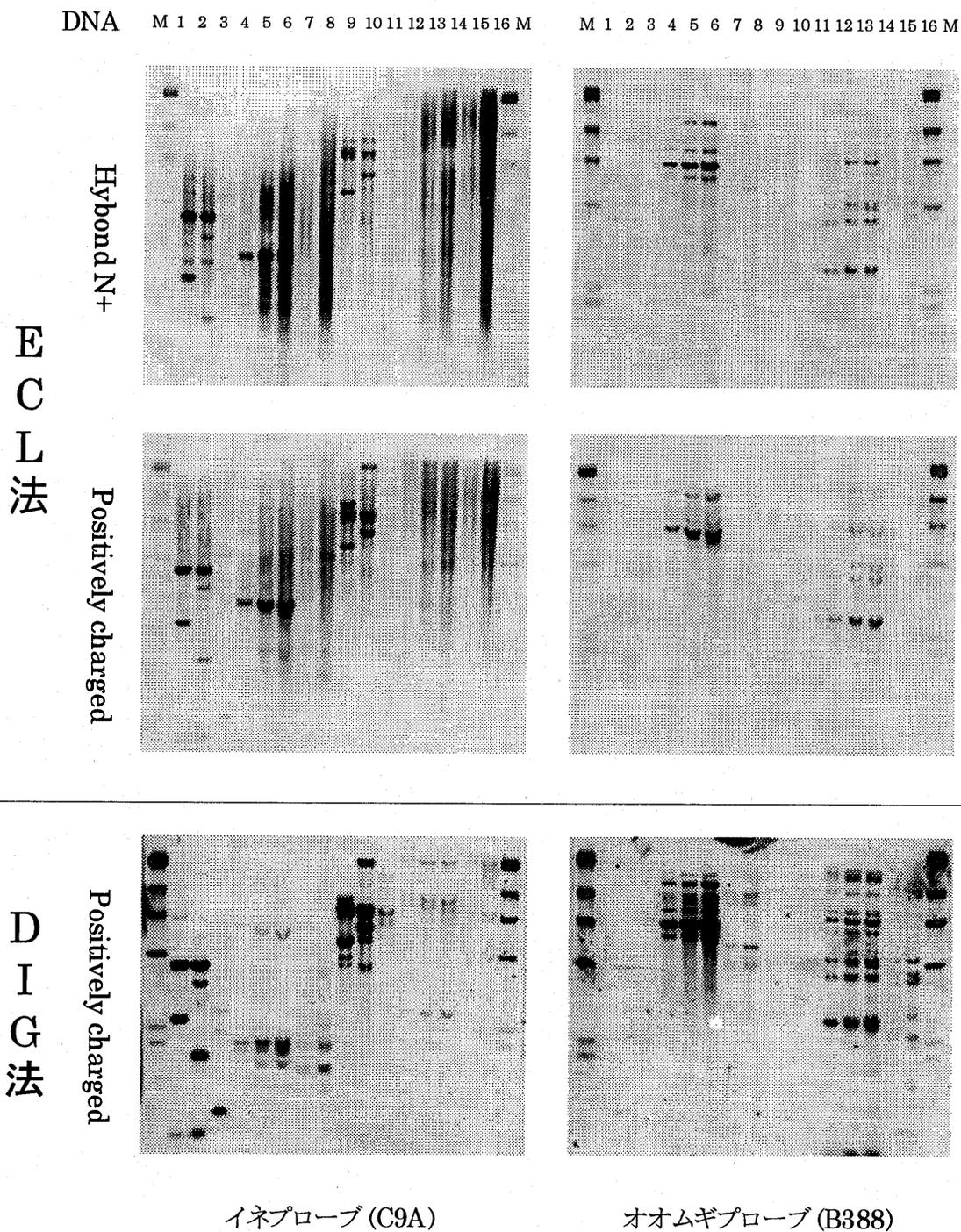
(1) 標準バッファー（5% SSC、1% Blocking reagent、0.1% Lauroylsarcosine、0.02% SDS）を用いることにより、ほぼ安定してシグナルを検出することができた。プローブ濃度は20ng/mlが適当であった。新しい発光基質のCDP-StarはCSPDより発光開始時間が早く、シグナルも強い発光特性を持つことが確認された。CDP-Starの最適濃度は、露光時間を約1時間とした場合には約2000倍希釈と推定された。

(2) いずれの方法でもアルカリプロットティング法が良く、フィルターは、ECL法ではHybond N+が最も良く、Positively chargedが準じた。DIG法では、Positively chargedが良好で、Hybond N+はバックが著しく上昇したため不適であった。ECL法とDIG法による検出感度は、DIG法の方が高く優れていた。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を用いてもRFLP分析が十分可能なことが明らかになった。

4. 成果の要約

ゲノムサイズの大きいオオムギのRFLP検出を目的とし、非放射性検出法のECL法やDIG法の検出条件を検討した。その結果、オオムギ等でこれら方法においても、RFLP検出は十分可能であり、放射線利用施設等を持たない研究所でもRFLP分析ができることが明らかとなった。また、ECL法とDIG法による検出感度は、DIG法の方が優れていた。

（担当者 栃木分場・ビール麦育種部 五月女敏範）



イネプローブ (C9A)

オオムギプローブ (B388)

図 ECL法およびDIG法におけるRFLP検出結果

DNA : 1, 2, 9, 10. イネ (2 ng/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. λ /HindIIIダイジェストマーカー. 酵素処理: 1-8 .HindIII, 9-16. EcoRI. プローブ濃度20ng/ml. プロットティング:アルカリ法. 4 hr. expose. Positively charged・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.