

【研究ノート】

ブロッコリーのDNA抽出条件に関する検討

緒方英博⁽¹⁾ 川上延子⁽²⁾ 内藤聖子⁽³⁾ 都築廣久⁽¹⁾An Examination about the DNA Extraction
Conditions of Broccoli(*Brassica oleracea* var.
italica)

by

Fusahiro OGATA⁽¹⁾, Nobuko KAWAKAMI⁽²⁾, Seiko NAITO⁽³⁾, Hirohisa TSUZUKI⁽¹⁾

緒言

現在まで、様々な生物種からデオキシリボ核酸（以下「DNA」という。）を抽出する実験方法が数多く報告されている。その中でも安価で入手が容易なブロッコリーを原料として用いる DNA 抽出実験は、手軽で安全に行える生化学実験の一つとして広く知られている。1), 2), 3) その大きな理由として、遺伝情報を含むDNAが、台所用合成洗剤、食塩、エタノールなどの身近な材料を利用して比較的簡単に抽出されることが考えられる。一方、DNA が白い綿状のかたまりとして観察される様子は、DNAという言葉を知っていても実際に見たことがない人達に鮮明な印象を与えることから、本実験は遺伝の仕組みを一般の人達に分かりやすく解説する手段としても極めて有効で、実際に食物栄養学科では、オープンキャンパス等で実施する模擬実験として幾度となく採用してきた。

今回、本実験を実施した際、使用する台所用合成洗剤によって DNA 抽出に再現性が認められなかったため、特に台所用合成洗剤の種類と濃度が、DNA 抽出に与える影響を検討したので以下に報告する。

材料及び実験方法

1. 材料

台所用合成洗剤として以下の5種類を使用した。

(1) ジョイ

- ①成分 界面活性剤、31%アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、アルキルアミンオキシド、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、安定化剤、粘度調整剤、酵素

受理日 平成22年11月24日

- (1) 純真短期大学食物栄養学科 教授
(2) 純真短期大学食物栄養学科 助手
(3) 純真短期大学食物栄養学科 准教授

②販売元 プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン株式会社

(2) CHARMY「泡のチカラ」

①成分 界面活性剤、46%アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、ポリオキシエチレン脂肪酸アルカノールアミド、アルキルスルホン酸ナトリウム、アルキルアミンオキシド、安定剤、金属封鎖剤

②販売元 ライオン株式会社

(3)ファミリーフレッシュ

①成分 界面活性剤、33%、高級アルコール系（陰イオン）、アルキルヒドロキシシルホベタイン、アルキルアミンオキシド、アルキルグルコシド、安定化剤

②販売元 花王株式会社

(4)フォーレハーブメント

①成分 界面活性剤、30%、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、脂肪酸アルカノールアミド、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル、安定化剤

②販売元 カネヨ石鹼株式会社

(5) チャーミーコンパクト

①成分 界面活性剤、37%アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、アルキルアミンオキシド、脂肪酸アルカノールアミド、アルファオレフィンスルホン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルエーテル

②販売元 ライオン株式会社

上述した台所用合成洗剤以外に、塩化ナトリウム(食塩)、エタノール、すり鉢、すりこぎ、キムワイプ、漏斗、駒込ピペット、メスピペット、安全ピペッター、新鮮なブロッコリーを使用した。

2. 実験方法

(1) DNA抽出液の調製

塩化ナトリウム(食塩)6 g 及び台所用合成洗剤 10 ml を蒸留水に溶解させ、100 ml に希釈して 10%DNA抽出液を調製した。また、同様に台所用合成洗剤を 5 ml 及び 2.5 ml 量り取ってそれぞれ 5%DNA抽出液及び 2.5%DNA抽出液を調製した。

(2) DNAの抽出実験

ブロッコリーの先端の花芽の部分を鉢ですり鉢の中に切り落とし(約 4.5 g)、ペースト状になるまですりこぎでよくすりつぶした。その後所定の濃度のDNA抽出液を 10 ml 加えて 10 分間静置し、漏斗上に二枚重ねたキムワイプの中に内容物を注いでろ過し、緑色の抽出液を取り出した。抽出液約 1.5 ml を駒込ピペットで量り取り、別の試験管に入れたエタノール 5 ml の中に加え、DNAが上部のエタノール層に浮き上がってくる様子を観察した。

結果と考察

まず、台所用合成洗剤の種類の違いがブロッコリーのDNAの抽出に及ぼす影響を調べるために、5種類の 10%DNA抽出液を調製した。以下にこれらの 10%DNA抽出液を 1「ジョイ」、2「泡のチカラ」、3「ファミリーフレッシュ」、4「ハーブ」、5「チャーミー」と略すことにする。なお、すり鉢でブロッコリーをすりつぶす操作は、なるべく条件

を統一させるために5分間で行い、完全に形がなくなるまで十分にすりつぶした。それぞれすりつぶしたブロッコリーに、1～5の10% DNA抽出液10 mlをメスピペットで加え、すり棒で軽くかき混ぜたのち10分間静置した。漏斗にキムワイプを二枚重ねで置き、内容物を固形物と抽出液をこしわけ、各抽出液の約1.5 mlを駒込ピペットで別の試験管に入れたエタノールに静かに滴下後約5分間静置した。その結果を写真1に示した。

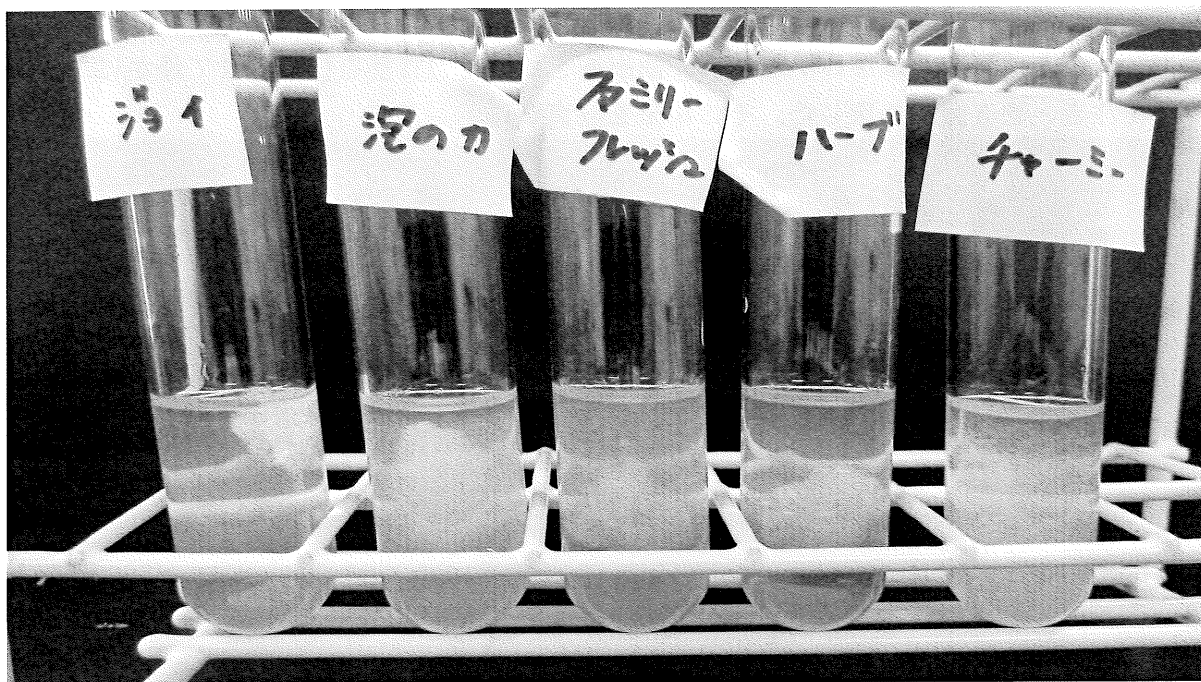


写真1 市販の5種類の台所用合成洗剤でDNAを抽出した結果。左から順に1「ジョイ」、2「泡のチカラ」、3「ファミリーフレッシュ」、4「ハーブ」、5「チャーミー」

滴下した抽出液は徐々に試験管の底の部分にたまり、時間とともにDNAのからみあった白い綿状のかたまりが観察された。写真1に示したように、5分後にはDNA抽出液1「ジョイ」を使用した場合、DNAが白い綿状のかたまりとしてエタノール層に浮上してきた。次に、2「泡のチカラ」を使用した場合、白い綿状のかたまりがエタノール層に浮上する途中の段階である様子が観察された。一方、3「ファミリーフレッシュ」と4「ハーブ」を使用した場合、DNAが複雑に絡みあったものと思われる白い綿状のかたまりがエタノール層の下部部分に見える状態であった。さらに5「チャーミー」を使用した場合は他のDNA抽出液とは異なり、DNAのかたまりと思われるものがみられず、糸状のものがエタノール層全体に広がった様子が観察された。以上の結果に基づき、DNA抽出液には1「ジョイ」が最も適していることが判明した。なお、2「泡のチカラ」、3「ファミリーフレッシュ」、4「ハーブ」も静置時間を延長したとき、白い綿状のかたまりがエタノール層に浮上したが、例えばオープンキャンパス等での演習実験に採用するには時間がかかりすぎるため不相当であると考えられる。さらに、5「チャーミー」はDNAがかたまりにならず、合成洗剤の種類による影響だけでは判断し難いが、DNA抽出に不相当であると考えられる。

今回使用した市販の台所用合成洗剤の中では、1「ジョイ」がDNA抽出に最も適していることが判明したため、次に合成洗剤の濃度がDNA抽出に及ぼす影響について検討し

た。10%DNA抽出液を使用したとき、抽出液の粘性が高く白い綿状のDNAのかたまりが浮上するのに時間を要する様子が観察されたため、台所用合成洗剤の濃度を5%及び2.5%に希釈したDNA抽出液を使用してDNA抽出の様子を比較検討した。

その結果、10%、5%、2.5%DNA抽出液を用いてそれぞれブロッコリーから抽出した抽出液を、試験管中のエタノールに滴下したところ、いずれも白い綿状のDNAのかたまりは見られたが、わずかに緑の着色が観察された。この結果は、抽出液をエタノールに直接滴下したことが原因ではないかと考え、抽出液を試験管の管壁を伝わらせて静かにエタノールに注ぎ、約5分間静置した。その結果を写真2に示した。

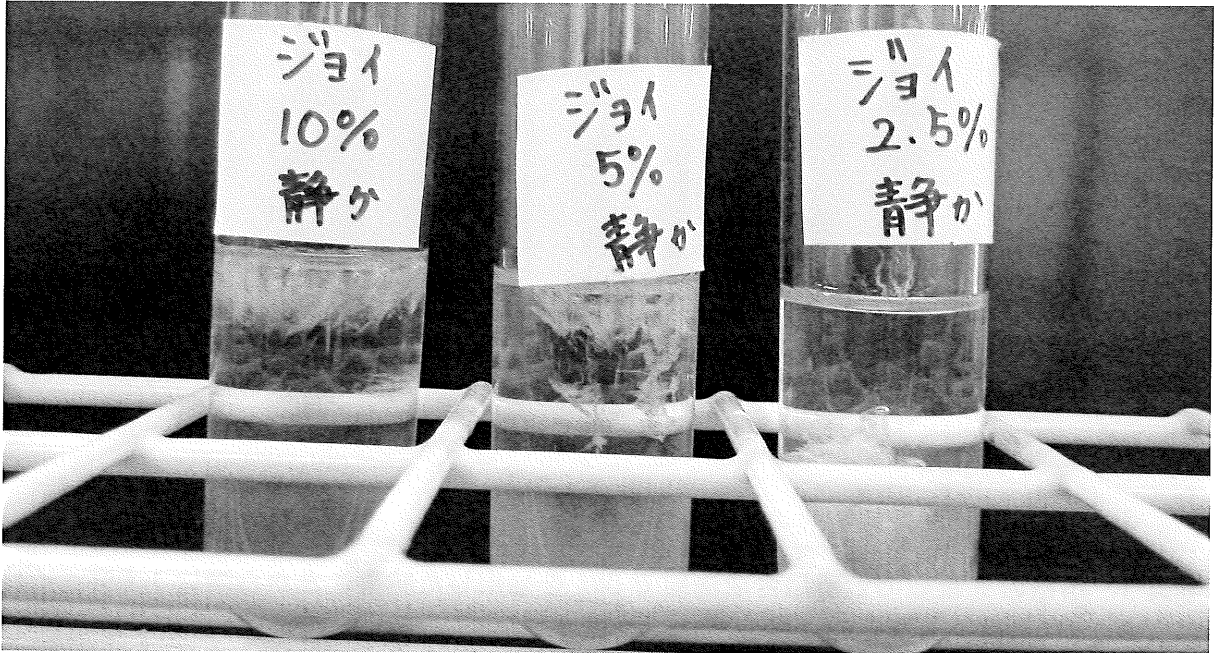


写真2 10%、5%、2.5%DNA抽出液で抽出後、試験管壁を伝わらせ静かに加えた結果

10%DNA抽出液と5%DNA抽出液を用いた場合、試験管の底に沈んだ抽出液とエタノールの境界付近から、1分程度で白い綿状のDNAが浮上してきた。一方、2.5%DNA抽出液を用いた場合、エタノールと抽出液の境界面付近に白いもやもやとした綿状のものが認められたが、エタノール層に浮上しなかった。

まとめ

ブロッコリーから効率よくDNAを抽出する最適条件を検討した。その結果、今回使用した市販の合成洗剤の中では、1「ジョイ」を用いて、10%あるいは5%DNA抽出液を良くすりつぶしたブロッコリーの花芽に加え、得られた抽出液をエタノールに静かに加える方法が優れていることが明らかとなった。

参考文献

- 1) くらしとバイオプラザ21 <http://www.life-bio.or.jp/school/school1.html>
- 2) DNA抽出実験 <http://www.takajo-hs.gsn.ed.jp/SSH/es3/07report/011.pdf>
- 3) 伊佐治錦司、松本省吾：高等学校におけるDNA簡易抽出実験に関する教材開発。岐阜大学教育学部研究報告 教育実践研究 第7巻(2005), 69-78.