

## 植物防疫基礎講座：

## サンドペーパーを用いた新たな植物磨砕試料調製法

(独)果樹研究所 <sup>なか</sup>中 <sup>うね</sup>敵 <sup>りょう</sup>良 <sup>じ</sup>二

## はじめに

植物のウイルス病診断や各種遺伝子の解析を行うためには、核酸などを抽出しやすい状態にするため磨砕試料を調製することが多い。しかし、従来、枝などの硬い試料を材料とした磨砕試料の調製は、乳鉢・乳棒などを使用して多大な時間と労力を必要とする作業であった。筆者は、日常的にブドウのウイルス診断を行う機会が多く、枝からの試料調製に苦勞していた。本稿では、サンドペーパーを利用して枝から磨砕試料を調製する簡便な方法を考案したので紹介する。

## I サンドペーパーを利用した植物磨砕試料の調製法

なぜサンドペーパーなのか？ 葉や葉柄など比較的柔らかい材料から磨砕試料を調製する場合には、乳鉢・乳棒などを用いて容易に磨砕試料を調製できる。また、最近ではステンレスやタングステン製のピーズを用いた試料破砕機もよく使用されている。しかし、枝のような硬い材料から磨砕試料を調製するためには時間と労力を必要とし、磨砕の程度も十分とはいえない場合が多い。そこで、何かよい方法はないかと思案し、サンドペーパーを利用することで枝などの木質試料の磨砕を短時間・軽作業で行えることを見いだした (NAKAUNE and NAKANO, 2006)。サンドペーパーは1枚150円前後で販売されており、使い捨てなのでコンタミネーションの心配が少ないのも利点の一つである。筆者は、サンドペーパーとして研磨布 (A-P80: Okada MFG. Co. Ltd.) を使用している。研磨布を約5×5cmにカットして、試料の磨砕に使用する。

以下に、ブドウの枝から磨砕試料を調製する作業手順についてポイントを解説しながら説明する。用途に応じて磨砕時に使用するバッファーを選択する必要があるが、ここではブドウのウイルス診断用試料の調製法を説明する (図-1)。

- ① カミソリの刃を用いて枝から樹皮をそり落とし、緑色の師部組織を露出させる (図-1の写真1)。
- ② 適当な大きさにカットしたサンドペーパー (100番前後の粗目のものが使いやすい) の上に200 $\mu$ lの磨砕バッファー (中敵, 2003; NAKAUNE and NAKANO, 2006) をのせ、そのバッファー中で枝組織をすりおろす (図-1の写真2)。使用するサンドペーパーはオートクレーブなどで処理する必要はないと思われるが、取り扱いの際には不必要に汚すことがないように注意する。
- ③ 枝組織を前後や円を描くように20回程度擦ると、おろしわさび状の磨砕試料が得られる (図-1の写真3)。本法のポイントは、バッファーとともに枝試料を擦ることにある。枝試料のみをサンドペーパー上で擦っても、目詰まりするばかりで効率よく試料を磨砕することはできない。バッファーをのせたのちに、時間が経過すると、砂粒を接着している糊がふやけて砂粒が脱落しやすくなるので注意する。また、長時間同じ箇所を擦り続けていると砂粒が剥がれ落ち、磨砕効率が著しく低下する。いずれにしても手早く作業することが望

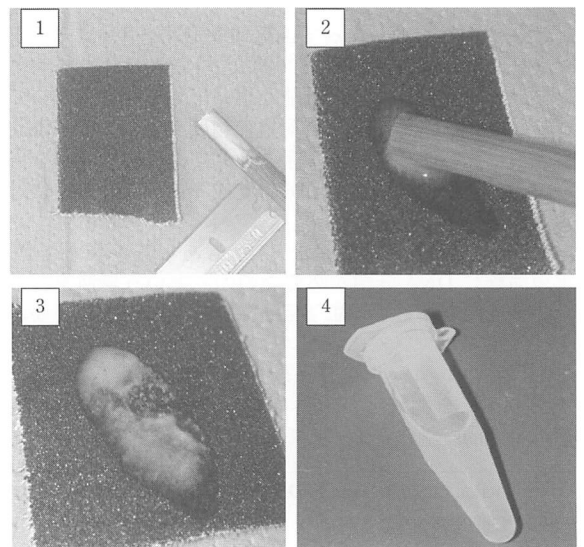


図-1 サンドペーパー法によるブドウ枝磨砕試料の調製

Novel Method for Maceration of Woody Plant Material. By  
Ryoji NAKAUNE

(キーワード: 果樹, サンドペーパー, 磨砕試料, ウイルス診断, 核酸抽出)

ましい。

- ④ 磨砕試料約 200 mg (耳かき 1 杯程度) を 1 ml の磨砕バッファーに懸濁し (図-1 の写真 4), 遠心分離 (10,000 回転/分, 4℃, 10 分間) する。ブドウのウイルス診断では, この上清を RT-PCR に使用している。

筆者らは, 本法で調製した試料を用いて, ブドウ葉巻随伴ウイルス (GLRaV) 1, GLRaV-2, GLRaV-3, ブドウ A ウイルス, ブドウ B ウイルス, *Rupestris stem pitting-associated virus*, ブドウフレックウイルス, ブドウファンリーフウイルス等の診断を行っており, 良好な結果を得ている。なお, RT-PCR によるブドウのウイルス診断法については関連文献 (中畝, 2003; NAKAUNE and NAKANO, 2006) を参照していただきたい。また, サンドペーパー法で調製した磨砕試料はエライザ法によるウイルス検定にも使用できる。

## II 核酸抽出への応用

果樹や木本植物の種類によっては RT-PCR 反応を阻害するポリフェノール類や多糖類などを植物組織中に多く含むものもあり, ウイルス診断などの目的に応じて核酸を抽出・精製する必要があると思われる。そこで, サンドペーパー法で調製した磨砕試料から核酸 (DNA および RNA) の抽出を試みたので紹介する。

### 1 DNA の抽出

サンドペーパー法で調製した磨砕試料から DNA を抽出するが, 磨砕バッファーは核酸抽出に適したものを使用する。筆者は TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) を使用している。磨砕バッファー中には SDS などの界面活性剤は入れないほうがよい。界面活性剤の作用によりバッファーが砂粒の間に浸透してしまい, 試料を磨砕できなくなるからである。ここでは MagExtractor Plant Genome キット (TOYOBO) を用いた DNA 抽出の手順を紹介するので参考にさせていただきたい。

- ① サンドペーパー上に 200  $\mu$ l の TE をのせ, TE 中で枝組織をすりおろす (図-1 の写真 2)。
- ② 磨砕試料 (図-1 の写真 3) 約 200 mg を 300  $\mu$ l の溶解液 (MagExtractor キットに付属) に加え, 上下に振ってよく混合する。
- ③ 65℃ で 10 分間処理する。この間 3 回程度混和する。
- ④ 300  $\mu$ l のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え, 上下に激しく振ってよく混合する。
- ⑤ 15,000 回転/分で 1 分間遠心分離し, 約 200  $\mu$ l の上清を新しいチューブに移す。

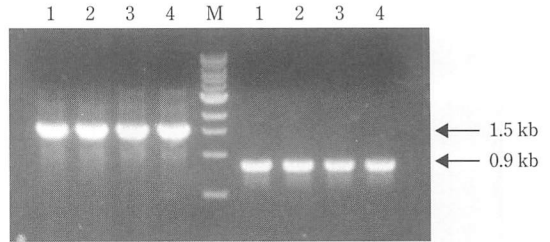


図-2 サンドペーパー法を利用して抽出した DNA を用いた PCR による遺伝子増幅  
4 種のブドウ枝から DNA を抽出し, 異なる 2 種のプライマーペア (東暁史氏 (果樹研) より分譲) で *Myb* 遺伝子を増幅した。

- ⑥ 以下, DNA の磁性ビーズへの吸着・洗浄および溶出はキット説明書に従って行い, 100  $\mu$ l の TE で DNA を溶出する。

冷蔵庫で 3 か月間保存したブドウの休眠枝から DNA を抽出し, PCR で目的遺伝子を増幅することができた (図-2)。また, 同じ方法でカキの枝から DNA を抽出し, PCR 実験に供試できることを確認している。

### 2 RNA の抽出

DNA と比べて RNA は分解されやすく, 抽出などの操作には注意を払う必要があるとされている。RNA の抽出は, 前節「DNA の抽出」に従ってブドウ枝から磨砕試料を調製し, WANG et al. (2000) の方法を改変した以下の方法で試みた。

- ① 磨砕試料 (図-1 の写真 3) 約 200 mg を 1 ml の抽出液\*に加え, 激しく振って混合する。
- ② -80℃ で 1 時間凍結させた後, 37℃ の水槽で融解する。
- ③ 1 ml のフェノール/クロロホルム (1:1) を加え, 激しく振って混合する。
- ④ 15,000 回転/分で 5 分間遠心分離し, 上清を新しいチューブに移す。
- ⑤ 1 ml のクロロホルムを加え, 激しく振って混合する。
- ⑥ 15,000 回転/分で 5 分間遠心分離し, 上清を新しいチューブに移す。
- ⑦ 1/10 量の 2 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加えた後, さらに等量のイソプロパノールを加え,

\* 抽出液: 0.2 M Tris-HCl (pH 8.5), 0.3 M LiCl, 10 mM EDTA, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40 を組成とする液をオートクレーブ滅菌し, 滅菌後に 1.5% SDS, 1 mM aurintricarboxylic acid, 5 mM thiourea, 10 mM dithiothreitol をそれぞれ添加する。

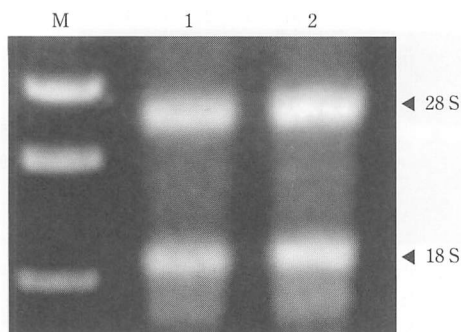


図-3 サンドペーパー法で調製したブドウ枝磨砕試料から抽出した total RNA の確認

2種のブドウ枝から抽出した total RNA を1%アガロースゲルで電気泳動した。レーン1および2:ブドウ枝から抽出した RNA (28Sおよび18Sリボソーム RNA), レーンM: DNA用分子量マーカー。

-80℃で1時間冷却する。

- ⑧ 15,000回転/分で15分間遠心分離した後、沈殿を70%エタノールで洗浄する。
- ⑨ 沈殿を軽く乾燥させた後、適当量の RNase free 滅菌水に溶解して RNA 溶液とする。

冷蔵庫で3か月間保存したブドウ枝から抽出した total RNA をアガロースゲル電気泳動でチェックしたところ、明瞭な28Sおよび18Sリボソーム RNA を確認することができ(図-3)、本法で抽出した RNA は RT-PCR やノーザン解析といった分子生物学的研究に使用できるものと思われた。本法でブドウ枝から RNA を抽

出した場合、200 mg の磨砕試料から 30  $\mu$ g 以上の total RNA が抽出されていると推定された。また、MagExtractor RNA キット (TOYOBO) を使っても RNA を抽出できることを確認している。この場合、磨砕試料を 800  $\mu$ l の溶解・吸着液に加え、ボルテックスミキサーでよく混和した後、10分間室温に静置する。遠心分離 (15,000回転/分, 1分間) した後の上清を前処理液とし、以降の操作はキットの説明書に従った。

## おわりに

本稿で紹介したサンドペーパーを利用した新たな植物磨砕試料の調製法は、ウイルス診断用粗汁液の調製だけでなく、DNA や RNA の抽出にも利用できる。目的に応じて磨砕量を多くすることも可能であり、果樹をはじめ木本植物の分子生物学的研究を行ううえで大いに役立つものと思われる。最近、澤岬ら (2007) はカンキツグリーニング病の迅速簡易診断法として、サンドペーパーを利用して植物体内のデンプン含量を調べる方法を報告している。今後、サンドペーパーを利用した植物磨砕試料の簡易調製法は成分分析試料の調製などへの応用も期待される。

## 引用文献

- 1) 中畝良二 (2003): 植物防疫 57: 548 ~ 551.
- 2) NAKAUNE, R. and M. NAKANO (2006): J. Virol. Methods 134: 244 ~ 249.
- 3) 澤岬哲也ら (2007): 日植病報 73: 3 ~ 8.
- 4) WANG, S. X. et al. (2000): BioTechniques 28: 292 ~ 296.

(新しく登録された農薬 36 ページからの続き)

### ●トリネキサパックエチル液剤

21959: プリモマックス液剤 (シンジェンタ ジャパン) 07/05/09

トリネキサパックエチル: 11.2%

日本芝, 日本芝 (のしば, こうらいしば): 草丈の伸長抑制による刈込み軽減

日本芝 (こうらいしば), 西洋芝 (ブルーグラス, ベントグラス): 芽数増加及び根量増加

西洋芝 (ブルーグラス, ベントグラス, パーミュエダグラス): 草丈の伸長抑制による刈込み軽減

### 「展着剤」

#### ●展着剤

21963: ホールドガード (大塚化学) 07/05/23

ポリオキシエチレン脂肪酸エステル: 20.0%

果樹類, 稲, 麦類, 茶, 野菜類, いも類, 豆類, てんさい, 雑穀類: 殺虫剤, 殺菌剤に添加

## 登録が失効した農薬 (19.5.1 ~ 5.31)

掲載は, 種類名, 登録番号: 商品名 (製造者又は輸入者) 登録失効年月日

### 「殺菌剤」

#### ●カスガマイシン・キャプタン水和剤

8926: ホクコーカスミン C 水和剤 (北興化学工業) 07/05/10

#### ●トルクロホスメチル粒剤

19009: キンググランサー粒剤 (キング化学) 07/05/31