

緑茶葉からの DNA 抽出

A Simple Protocol for DNA Extraction from Green Tea Leaves

常吉 俊宏*

Toshihiro TSUNEYOSHI

Abstract: A simple and safe method has been developed for the DNA extraction from green tea leaves without using any toxic or dangerous reagent. About 50 g of commercially available dried green tea leaves was grinded into rough powder using a mill mixer. After mixing the powder with 300 ml of tap water, 5 g (5 ml) of table salt and 50 ml of kitchen detergent, the mixture was stirred gently and stayed still for 10 minutes. The mixture was then filtrated by the tea trainer and 100 ml of the filtrate was gently mixed with 60 ml of 2-propanol. Resulting DNA cluster was washed twice with 70% ethanol by using a glass rod, and stored in a culture tube.

1. はじめに

本報告にまとめた緑茶葉からの DNA 抽出法は、2003 年に「遺伝」に掲載された島根大学の中村宗一郎による、タマネギからの簡易・大量の DNA 抽出実験の報告¹⁾ からヒントを得て、静岡県の最も代表的な特産物の緑茶に応用できないかと種々検討した結果、比較的スムーズに大量の DNA 抽出ができたものである。この手法については 2004 年頃から学内や県内高校での出前を含めた高校生対象の実験講義、物質生命科学概論の新入生導入実験講義、オープンキャンパスでのデモ実験・体験実験などに活用し、DNA の塊の出現を肉眼で観察・体験させて「生命科学への誘い」をおこなってきた。最近では事務局の依頼を受けて小・中学生や一般の方々にも対象を拡大しつつある。さらに 5 年前頃からは、抽出した DNA の塊を 2 ml のミニチューブに小さく小分けしてケータイ用のストラップを付け、オープンキャンパスなどに訪れて来てくれた高校生や保護者におみやげプレゼントとして配布してきた。毎年好評で 200 本ほどが出ていくため、合計でそろそろ 1000 本を越えてきたと思われる。なお 2003 年度には当遺伝子工学研究室の卒業研究生の実験テーマとして本手法の最適化の試みを行わせた²⁾。緑茶葉についての大量 DNA 抽出の試みは、県内を含めて他には報告が見られていないようであるので、卒研のデータも含めて、本報告で当該手法を記述しておくこととした。

2. 実験

2.1 実験材料

市販中級煎茶の乾燥茶葉：約 50 g (体積で 100 ml ビーカー約 1 杯分)

2.2 試薬

台所用洗剤、食卓塩、
2-プロパノール (「イソプロピルアルコール」99%)、
エタノール (「エチルアルコール」99.5%)

2.3 器具・装置

電動お茶すり器 (ミキサー)、
各容量のビーカー (500 ml×2, 300 ml×2, 100 ml×2)、
メスシリンダー (100 ml×2)、
計量スプーン (大(15 ml)×1, 中(5 ml)×1)、
茶こし×4, ガラス棒, ピンセット, はさみ, スポイド,
カルチャーチューブ (50 ml) または、ミニチューブ (2 ml)

2.4 実験操作手順

- (1) 市販緑茶葉約 50 g を 100 ml ビーカー1 杯に秤り取り、必要ならば何回かに分けて、お茶すり器で粉砕する。
- (2) 500 ml ビーカーに、台所用洗剤を計量スプーンの大さじ (15 ml) で約 3 杯分入れる。続いて食卓塩を計量スプーンの中さじ (5 ml) で 1 杯分すなわち約 5 g 入れる。つぎに水道水をビーカーの大まかな目盛りで 300 ml の目盛りまで注ぎ込む。最後にガラス棒などでよく攪拌する。
- (3) (2)のビーカーに(1)の緑茶葉粉末を全量投入し、ガラス棒などでゆっくりよく攪拌したのちに、10 分ほど待つ。
- (4) (3)のビーカーの茶抽出物を改めてゆっくり大

2013 年 2 月 26 日受理

* 理工学部 物質生命科学科

きく攪拌したあと、茶こしを用いて、新しい 500 ml ビーカーや 300 ml ビーカー、100 ml ビーカーにろ過する。この時、茶の粉末自体ができる限り茶こしを透過しないように、ろ過初期は別の容器に液を入れるようにすると良い。さらに中盤から終盤にかけてのろ液は緑茶粉末の混入が比較的少ないので別の容器に入れるのがさらに良い。

- (5) なるべく後半、最も良いのは終盤のろ液を中心に、なるべく底に沈殿している緑茶粉末を移さないようにしながら、1つの容器にまとめ、100 ml のメスシリンダーに 100 ml まで移す。
- (6) (5)のろ液 100 ml を新しい 300 ml のビーカーに移す。
- (7) (6)で空になったメスシリンダーを洗わずに2-プロパノールを、ろ液体積 100 ml の 0.6 倍量すなわち 60 ml、注ぎ入れる。この時、順調に DNA 抽出が成功しつつあれば、メスシリンダー底部に DNA の糸くず状の沈殿が確認できるはずである。
- (8) (6)のビーカーに 2-プロパノール 60 ml 全量を穏やかに注ぎ入れ、15 分ほど待つ。順調に進めば数分で混合液表面に DNA の塊が浮かび上がってくるはずである。
- (9) 100 ml ビーカーに 30 ml の水道水と 70 ml のエタノールを注ぎ、ガラス棒などで混合しメスシリンダーで 50 ml ずつ半分に分け、100 ml ビーカー2 つに「70%エタノール溶液」それぞれを入れる。
- (10) DNA の塊が成長したら、ガラス棒を用いて塊りだけを 70%エタノール溶液に入れ、ガラス棒を用いて塊を洗浄する。充分洗浄後、もう一度ガラス棒を用いてもう一つの 70%エタノール溶液に入れて同じように洗浄する。
- (11) 通常は(10)の最後のビーカーの内容物をそのまま 50 ml のカルチャーチューブに入れて保存するが、場合によっては DNA の大きな塊をほぐして小さくし、ミニチューブに少量移し、70%エタノール溶液も入れて保存する。

3. 結果および考察

本実験で使用した材料、試薬、器具、装置などの概観写真を図 1 に示した。2-プロパノール (99%) やエタノール (99.5%) は通信販売でも購入が可能であるので、家庭でも簡単に実験ができると思われる。お茶すり器は専用の装置でなくても各種ミキサーで数十 ml の容量のカップをつけられれば適用可能と考えられる。このようにして一般に市販されている乾燥緑茶葉を粉末にし DNA 抽出を可能にすることにより、中村

の報告の生野菜での DNA 抽出法を乾燥茶葉へ応用できた。ただし抽出時間として約 10 分を要する。DNA 抽出には細胞膜の分解のために通常の実験で用いる強力な界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の代わりに、本実験では家庭用洗剤を用いているが、特に問題は見られない。また、通常はタンパク質分解酵素のプロテナーゼ K を添加するが、これについても本実験では使用していない。このため抽出した DNA は一旦水溶液にすると、日数を経て比較的短期間で DNA 分解酵素等により分解が進むと考えられる。



図 1 緑茶葉の DNA 抽出に用いた材料、試薬、器具、装置など



図 2 実験操作 (7) でメスシリンダー中に出現する DNA の糸くず

図 2 には実験操作 (7) でメスシリンダー中に出現する DNA の糸くずの様子の写真を示した。この写真は平成 24 年 8 月 7 日 (火) に行われた夏休み小学生理科実験講座「お茶の葉から DNA を取り出そう」で袋井市内と近隣の小学 4 ~ 6 年生が参加して行ったものであるが、緑茶粉末の除去があまり良くなくメスシリンダーに注いだ 60 ml の 2-プロパノールの液面に DNA の糸くずが緑茶粉末を巻き込んでいるため緑色をした塊状になって浮遊している。ただ小学生たちのこの実験では DNA 抽出操作は試薬の入れ忘れなどがなく順調に推移しているということがこの時点で確認できる。

次に図 3 には実験操作 (8) で 60 ml の 2-プロパノールをろ液に注ぎ込んで DNA の塊が成長し始めた様子の写真



図3 実験操作(8)でビーカー液面に出現するDNAの塊(右上)

を示す。写真右上のメスシリンダーの隣のビーカーの液面に緑茶の黄緑色がかったDNAの大きな塊が浮遊しているのがわかると思う。図4には卒業研究で緑茶粉末を極力

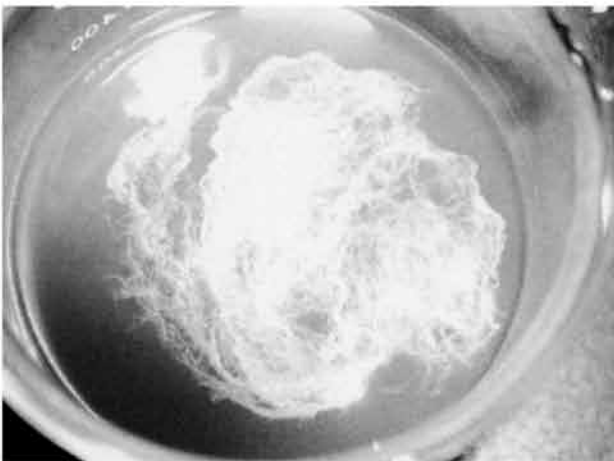


図4 実験操作(8)でビーカー液面に出現するDNAの塊。緑茶粉末を極力排除すれば白い糸くずの塊が得られる。

排除したDNA塊を示す。

この塊をガラス棒で回収し、乾燥させて重量を測定したところ、約50-60 mgとなった。すなわち、50 gの乾燥茶葉からほぼ1000分の1、約0.1%強のDNAが得られたことになる。なお、260 nmと280 nmの吸光度の比率は1.70~1.80の値をとったため、純度はかなり良いと考えられる。

図5には、上記のDNA塊を液中の黄緑色が抜けるまで70%エタノールで数回洗浄して、50 mlカルチャーチューブあるいはストラップ付きの2 mlミニチューブ中に同じ70%エタノール中の標本として保存したものを示した。いずれもチューブの底に白いDNAの塊や糸くずが見える。

4. まとめ

静岡県を代表する特産物で生産高日本一の緑茶から、簡易で安全、大量にDNAを抽出することに成功した。小・中学生から高校生・大学生はもちろん、一般あるいは高齢者

まで、あらゆる世代の人々に、生命科学への導入口として、静岡県特産の緑茶を材料にして、本物のDNAの出現を手と肉眼で楽しんでもらえる手法を記述した。県内の各教育機関で生命科学への誘いの導入手段として活用して頂ければ幸いである。

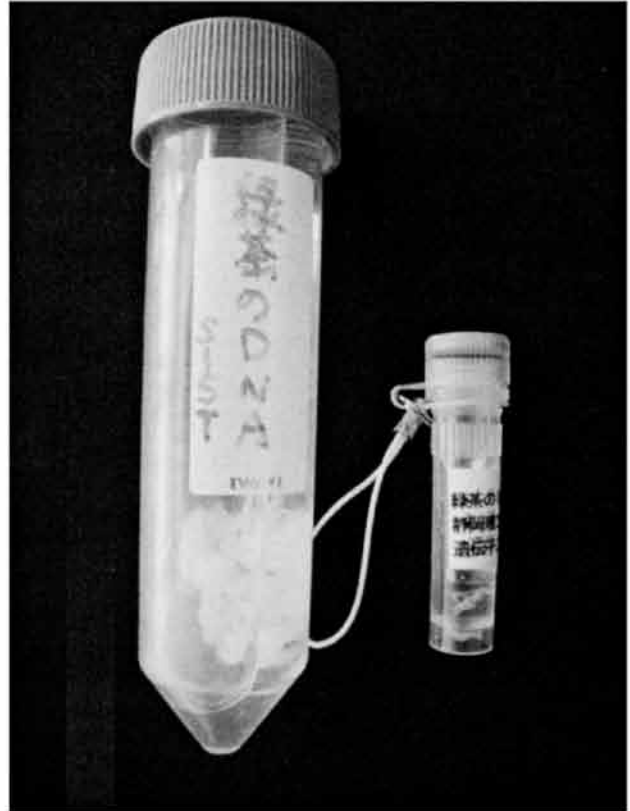


図5 DNA塊を保存した70%エタノール入りカルチャーチューブおよびストラップ付きミニチューブ

謝辞

本手法の最適化を卒業研究として遂行いただいた2003年度卒業生の坪内功氏に深く感謝する。

参考文献

- 1) 中村宗一郎, “実験・観察のページ(299)タマネギからDNAを抽出し食べてみよう--家庭科室でのDNA実験”, 遺伝, 57(2003) 14.
- 2) 坪内功, “簡易・大量・高純度の緑茶DNA抽出方法の検討”, 静岡理科大学理工学部物質科学科・2003年度卒業研究論文.