

部門研修：遺伝子の実験

著者	大橋 和義
雑誌名	技術報告
巻	21
ページ	24-26
発行年	2016-03-30
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00009499

部門研修 遺伝子の実験

大橋 和義

技術部 教育支援部門

1. はじめに

今年度の研修は、以前行った研修を踏まえて「遺伝子の実験」として2回にわけて実施した。1回は藤枝フィールドの協力の下、雌雄異株として有名な「キウイフルーツ」を試料としてその「雌雄を DNA レベルで見ることができるのか？」また、2回では身近な食物である「ヨーグルト」を試料として、「様々な種類のヨーグルトに含まれる乳酸菌などの微生物の違いを DNA レベルで見てみよう。」という目標に取り組んだ。実験には、DNA 抽出、PCR、制限酵素処理、電気泳動など遺伝子実験を行う上で必須の技術を組み込んだ。PCR 法は食品検査、農業など様々な分野で利用されている DNA を増幅する技術である。PCR で増幅した遺伝子のある特定の塩基配列で切断できる制限酵素で処理し、DNA の長さで分離することのできる電気泳動を利用した。本研修では、遺伝子や PCR などの先端技術を身近な食物であるキウイフルーツとヨーグルトを通して学ぶことを目的とした。

本研修2回目の「ヨーグルトの違いを DNA レベルで見てみよう」は、2014年度 静岡大学地域連携応援プロジェクトの生物部門、工学部化学バイオ工学科・生物学実験の一部と同様である。

2. 基本概念

2-1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR 法は、短時間かつ簡便に目的とする DNA 断片を大量に増幅する技術である。この技術は特定の遺伝子配列を人工的に増幅できるため、バイオサイエンスの研究において不可欠な技術となっている。

さらに PCR 法は、病原菌感染の検査や遺伝子組換え食物 (GM 食品) 混入の検査といった医療や食品の安全管理の分野、DNA 鑑定などの犯罪捜査などにも応用されており、その用途は多岐にわたっている。

PCR 法では、増幅したい塩基配列の両端に相補的な、20 塩基前後のオリゴヌクレオチド鎖からなるプライマーを足がかりとし、耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて DNA 塩基配列を増幅していく。この操作は3段階の温度変化を経て行われ、それを繰り返すことで大量の DNA 塩基配列が得られる。

2-2 制限酵素処理

制限酵素は、特定の2本鎖 DNA の塩基配列を認識して、切断する酵素である。

PCR で増幅した DNA に制限酵素処理すると、酵素が認識する塩基配列があるものは切断され断片になり、塩基配列がないものは切断されない。この反応を利用することで大きさの異なる DNA 断片ができる。これは塩基配列に違いがあるからで、微生物の種類により塩基配列に違いがあることがわかる。

切断面が同じであるということは、再び結合することもできる。さらには同じ断面を持つ DNA 断片同士も結合することができる。これを利用したものが遺伝子組み換えである。

2-3 電気泳動によるDNAの解析

DNA断片は、リン酸が負の電荷 (-) を持つため、陽極 (+) と陰極 (-) を持つ装置内に置くと陽極側に移動する。これを利用してゲルの中にDNA断片を置くと、移動するDNA断片とゲルとの間に抵抗力が働き、

移動速度に差が生じる。その結果、一定時間後には、DNAのサイズに応じた移動距離にDNAのバンドが確認される。

今回研修で用いたPCRで複製されたDNA断片は、制限酵素で処理され大きさの異なる数種類の断片がそれぞれ異なる移動距離を持つため、試料固有のバンドが観察される。

これを、適当な参照試料と比較することにより、DNAが何由来のものなのか解析することができる。

2-4 SNP (SNPs)

Single Nucleotide Polymorphism の略で、一塩基多型と訳される。

DNA は 4 つの塩基が連なってできており、その塩基の並び方は、例えば乳酸菌であればほぼ同じであるが、品種間においてわずかに異なる部分が存在する。個体間における 1 塩基の違い、その異なる部分を SNP という。(下図参照)

今回の実験では、PCR 法によって増幅した DNA の SNP の部分の違いを制限酵素処理により上手く検出することで、試料の個体差を分類した。

塩基配列におけるSNPの例

品種1	ATGGTCCCTTGAACTAAGGTAGGCTAGG
品種2	ATGGTCCCTTGAACTGAGGTATGCTAGG
品種3	ATGGTCCCTTGAACTAAGGTATGCTAGG
品種4	ATGGTCCCTTGAACTGAGGTAGGCTAGG
品種5	ATGGTCTCTTGAACTAAGGTAGGCTAGG
品種6	ATGGTCTCTTGAACTGAGGTATGCTAGG

↑ SNP I ↑ SNP II ↑ SNP III

図 1 SNP 例

3. 実験

1 回目「雌雄異株植物の塩基配列の違いを見ることができるのか？」

2 回目「ヨーグルトの違いを DNA レベルで見よう」

ともに、試料から DNA を抽出、PCR でゲノム DNA 上の 16SrRNA と 18SrRNA 遺伝子内の領域 1 kbp 弱を増幅、制限酵素処理、電気泳動、観察という手順で行った。

以下に、実施の様子と 2 回目の研修のタイムテーブルを示す。



図 2 1 回目試料 キウイフルーツ葉



図 3 1 回目 バンド観察の様子

タイムテーブル

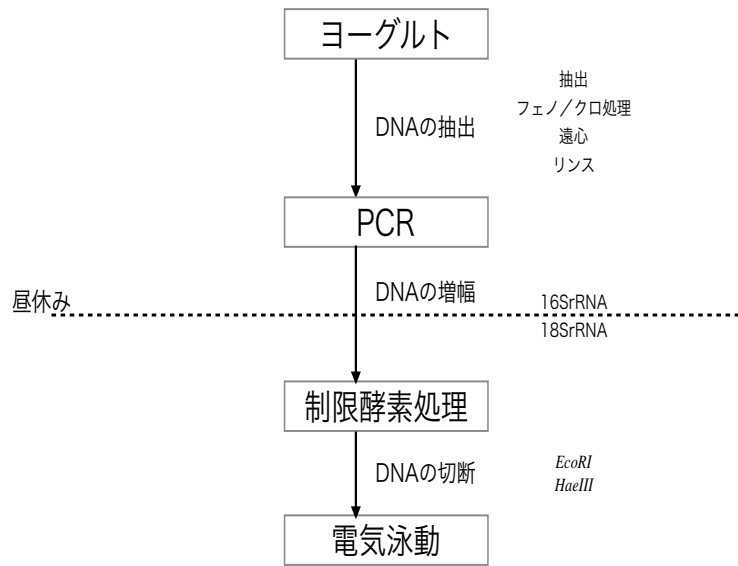


図 4 実施タイムテーブル

4. 結果

1 回目の実験では、増幅したユニバーサル領域に雌雄遺伝子が存在しないようで、7 種類の制限酵素を使用したにもかかわらず、バンドが見られなかった。

2 回目では 参加者ほぼ全員バンドを観察することができた。



図 5 使用したヨーグルト

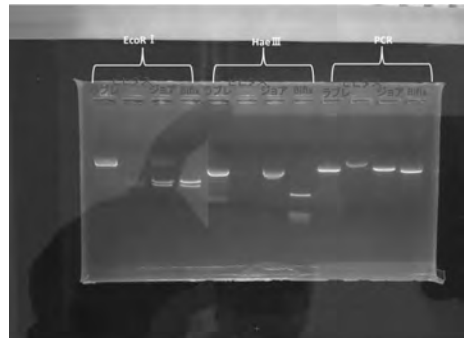


図 6 結果の一例

5. 謝辞

本研修に参加された、阿部沙織・喜多野哲也・中本順子・江上智恵・清水ひかる（敬称略）研修にあたり様々ご協力をいただきました、百瀬与志美・上田瑞恵（敬称略）の皆様はこの紙面を借りてお礼申し上げます。