

PCR 実験ことはじめ

－ コメの品種判別を題材とした分子生物学実習の導入－

宮城県古川工業高等学校化学技術科教諭 阿部 勲

1. はじめに

本校は土木情報科，建築科，電気電子科，機械科（2クラス），化学技術科の5学科6クラス，学年定員240名の工業高校である。筆者の担当である化学技術科は，平成7年度に学科改編が行われ，化学工学科から化学技術科へと学科改編された。学科改編にあたり生物系実習が可能な設備が設置され，化学技術科2年生において微生物工学実習として，「ニンジンの組織培養」を中心とする実習テーマが実施されている。

高校における分子生物学分野の実験は文科省のスーパーサイエンスハイスクール（SSH）において実施例が報告されているが，専門高校での実施例はあまり見られない。一方，大学の化学系学科においては化学・バイオ工学科，生命応用化学科等の学科名が見られる。このような背景で，専門高校において分子生物学実習を実施する必要性を強く感じていた。

筆者はこれまでに平成26年度より課題研究において分子生物学分野の研究テーマを指導している。その中で平成27・28年度は「PCR法によるコメの品種判別」というテーマを実施した。更に平成30年度から3年実習において「分子生物学実習～DNAによるコメの品種判別」を実施している。宮城県で日常的に食されている「ヒトメボレ」を中心として，主に東北地方で作付けされているコシヒカリ，ササニシキ，アキタコまちを試料として，PCRによる米の品種判別を目的とした実習を行っている。本稿ではその実施手順と改善の経過について報告す

る。

2. 実習の導入準備

これまでに実施した分子生物学に係る課題研究について「みやぎクラフトマン21事業（宮城県教育委員会，宮城県経済商工観光部）」の支援の下，東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター川渡フィールドセンターの中井裕教授（現新潟食料農業大学副学長），助教福田康弘先生に施設の利用と実験の指導をいただいている。

「PCRによるコメの品種判別」を実施するにあたっては，参考文献（p.28）に掲載されている試薬及びプライマーを準備した。また，実験技術や試薬調製については，平成27・28年の課題研究の際に博士研究員（当時）森裕美先生に本校にお出でいただき，生徒と一緒にマイクロピペットの使い方からご指導いただいた。



図1 マイクロピペット及びチップ

十数年前であれば大学の研究室でのみこの分野の実験が可能であったと思われるが，近年，実験機器の低価格化，試薬の安全性の向上，実験方法の改良が進み，高校レベルでの実験が可

能となった。3年実習は1班8名で5分野のローテーションで、毎週火曜日の2～6校時で実施している。現在、実習で使用している機器・器具は下記の通りである。

マイクロピペット (1000, 100, 10 μ L の3本セットで4組)/ 恒温槽(ヒートブロック, 2mL $\times$ 9本)/ 微量高速遠心機 (2mL $\times$ 12本)/ 微量遠心機 (0.2mL 8連チューブ用)/ ボルテックス / サマリニ型電気泳動装置 / 青色 LED イルミネータ / サーマルサイクラー (0.2mL $\times$ 48本)

機器と機材を一気に揃えることは難しいため、課題研究を実施しながら徐々に揃えていった。電気泳動の結果の撮影は暗室を使用した。試薬については各実験操作の項目で記載する。

3. 導入実験

本格的な DNA の分析を行う前に導入実験としてブロッコリーやバナナを材料として簡易的に行える DNA の抽出実験を行っている。材料を乳鉢ですり潰して、塩水に食器用洗剤を加えただけの抽出液を加えろ過した液に、冷却したエタノールを加えると、DNA を含む白いモヤモヤが現れてくる。その様子は、生徒に驚きとその後に続く実習に対する興味を持たせてくれる。



図2 簡易的な方法で抽出される DNA

この実験は比較的短時間で終わるため、残りの時間を次回以降に使用する実験器具の使用方法と練習に充てている。特にピペットは使用頻度が多く、正確な操作が求められるためにピペットの容量別に上皿天秤を利用し目的の容量が正確に分注できているか、水を試料としてその質量でチェックしながら繰り返し練習する。

4. 試料の準備と DNA 抽出

試料はすべて白米である。米の胚乳は約 16 万個の細胞からなり、その細胞壁はごく薄いいため、ペンチで砕いた程度で容易に DNA の抽出が行える。米を PCR の試料としたことは結果的に良い選択であった。実験を進めるに従って、確実に DNA 抽出ができる試料であること、様々な品種が手に入りやすいこと、研究資料が豊富なことなど、試料としての優れた特徴を見出すことができた。

試料となる米粒を 1 粒選び、数回折り畳んだアルミホイルに挟みペンチで砕く。粉碎された米粉を 1.5 mL チューブに入れ、DNA 抽出液を 500 μ L 加えてヒートブロックを用いて 65℃ で 1 時間程度加温する。DNA 抽出液の組成は下記のようなものである。

DNA 抽出液 (5 mL 調製)/ 1M Tris-HCl 2 mL / 1M NaCl 1.25 mL / 0.5M EDTA 0.5 mL / 10 % SDS 0.25 mL / 蒸留水 1 mL

加温後に遠心機で 10 分間遠心して、米粉が混入しないように注意しながら上澄みのみピペットで取り出す。この後にタンパク質を除去する必要がある。課題研究で実施していた時点では、フェノールクロロホルム液によって 2～3 回程度のタンパク質除去操作を行っていた。この手順は生徒には難しく、抽出の際のネックであった。しかし、タンパク質分解酵素であるプロテナーゼ K を抽出に際して 10 μ L 加えることで、フェノールクロロホルム液によるタンパク質除去操作を省くことができ、DNA の抽出を容易にした。

上澄みを新しいチューブに分注後、2-プロパノールを加えて DNA の沈殿を生成する。ここからは、DNA の沈殿は目に見えないことを意識させる必要がある。10 分間遠心してチューブ内の液体を全て排出する。遠心によってチューブの壁に DNA の沈殿が貼り付いていることを説明し、目には見えないが DNA がチュー

ブ内に存在すると信じて実験操作を行うようにと注意する必要がある。抽出した試料に 50 μ L の TA または水を加えて DNA を溶解し、冷凍庫で保管する。

5. 電気泳動による抽出 DNA の確認

この実習で使用する試薬は下記である。

50 xTAE(電気泳動液)/アガロースゲル(2%)
/ DNA ラダー (0.1 - 10.0 kbp)/ ローディング
ダイ (6 倍)/DNA 蛍光染色試薬

この回は電気泳動に用いるアガロースゲルの調製から実験操作を始める。寒天状のゲルの調製は比較的簡単ではあるが、電子レンジでのアガロースの溶解、DNA 蛍光染色試薬の添加、トレイへの流し込みと、逐一操作手順と温度をチェックし、失敗が無いように指導を行っている。ゲルトレイは小 (16 cm³) である。

ゲルが固まる時間を利用して、ゲルに打ち込む試料の調製を行う。分子量の目安となる DNA ラダーの調製、及び各自が抽出した DNA 試料と液比重の増加と色素の添加のためローディングダイを混合する。

30 分程度でゲルが固まり次第、ゲルへの試料の打ち込みを行う。4 名 1 グループで 1 枚のゲルに各 1 本の試料を打ち込む。初めての操作であるため、ゲルを穿孔してしまいがちである。生徒の隣で 1 人ずつピペット操作をアドバイスしながら打ち込みを行う。PCR 後に再度電気泳動を行うことを考慮して、チップの先端から試料がウェルの中に落ちていく様子を印象付ける。



図3 ゲルへの試料打ち込み操作

45 分程度で電気泳動が終了する。DNA 蛍光染色試薬をゲルに添加しているため、ゲルの染色の必要はない。暗室にて青色 LED イルミネータでゲルを照射し撮影を行う。画像の写真を各自に配布し、実習室にて大型ディスプレイで DNA マーカーのサイズ、抽出 DNA の影を確認して写真に書き込ませ、レポートに添付する資料とする。抽出の失敗はほぼ無い。



図4 電気泳動の結果

ゲルの撮影に当たっては、当初エチジウムブロマイドによる染色が必要と考えていた。しかし、発ガン性の疑われるエチジウムブロマイドを高校の実習で使用することは困難であった。安全性の高い DNA 蛍光染色試薬を使用してのゲル撮影が可能となり、高校での実習に踏み切ることができた。また、実習施設として暗室が設置されていたことも幸いであった。

6. PCR による DNA の増幅

この実習の最も核となる操作である PCR であるが、酵素、試薬等の改良により、高校生の実験としても十分に実施できるレベルの操作である。先行した課題研究では、実験中も冷却が必要な酵素及び反応液の取り扱いに常に気を付ける必要があった。そのような中、常温で取り扱いが可能でかつローディングダイがあらかじめ混合されているマスターミックスタイプの酵素反応液を知り、そちらに切り替えることでこの問題を解決できた。コストを抑える効果もある。実習に際しては反応液中に酵素、dNTP (ヌクレオチドの単体の混合物) が含まれていることを PCR に必要な要素として説明することを心掛けている。

品種判別には参考文献に掲載されているコンヒカリポジキットの 4 種類のプライマーを使用

し（ササニシキ用に1種類変更）、1人1種類のプライマーを担当することとする。各自で担当するプライマーと反応液を混合したマスターミックスの調製、PCRチューブへの分注、DNA試料の添加を行う。マスターミックス調製は4人1班毎に行い、2人1組で互いに補助しながら行わせている。特にDNA試料の添加は1μLというごく少量のため、チップの先端に採取したDNA試料を目視で確認すること、PCRチューブの壁面に確実に付着させることを徹底している。

全員のPCRチューブへのマスターミックスの分注及びDNA試料の添加が終わった後、サーマルサイクラーにセットしてPCRスタートとなる。従前の酵素では3時間半を要したが、現在は反応性の良い酵素のため、1時間半程度で反応終了となる。

PCRの終了を待つ間、次の電気泳動で使用するゲルの調製を行う。4名1班で12本の試料を打ち込むため、大きいサイズのゲル（32cm³）を2枚調製し、泳動液中で冷蔵保存する。またPCR反応が終了次第、PCRチューブをトレーに置いて冷凍庫で保管する。

7. バンド確認とコメの品種判別

ゲルへの試料打ち込み→電気泳動→ゲルの撮影のサイクルを2班の操作をずらしながら、2サイクル行う。全ての試料の電気泳動とゲルの撮影が終了し、図5の画像（マークは入っていない）を配布し、班毎に図6の研究論文掲載の



図5 PCRによるバンドの確認

データと比較しながら品種判別を行う。品種判別の結果が判明次第、班毎に結果を報告し、配布時の品種との照合を行う。

研究論文のデータ				
プライマー	WKA9	B43	M11	G22
バンド	1600bp	870bp	770bp	650bp
ササニシキ	—	—	+	—
コシヒカリ	—	+	+	+
アキタコマチ	+	—	+	—
ヒトメボレ	+	+	+	+

図6 品種判別用のデータ

8. 実験条件の検討と今後の課題

すべてのプライマーが酵素のマニュアルで指定された条件では良好な結果を得ることができないことが実習を通して分かってきた。予備実験を行い、主にアニーリング温度を適切に設定することが必要である。図5の右側の試料においてゲルの上部に位置する2本のバンドはターゲットではないバンドである。このようなバンドが明瞭に出ないような反応条件の設定が必要である。

現時点でこの実習を通して得た知識・技能が生かせる高卒者向けの求人はないと思われる。しかし、本校化学技術科の生徒全員がこの新しい分野の実習に取り組むことで、高校卒業後の進学先や就職先で出会うであろう新たな分野や産業の変革に、臆することなく取り組めることを期待して行っている。

9. 参考文献

- ・「米のPCR品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発」(日本農芸化学会誌(2002)4号, 大坪研一, 他2名)
- ・「米粒からの簡易なDNA抽出とRAPD法による兵庫県奨励品種の識別」(兵庫農技研報(農業)(2000), 吉田晋弥, 他3名)
- ・バイオ実験イラストレイテッド(秀潤社)
- ①分子生物学実験の基礎/②遺伝子解析の基礎/③本当にふえるPCR