

◇生徒用実験テキスト

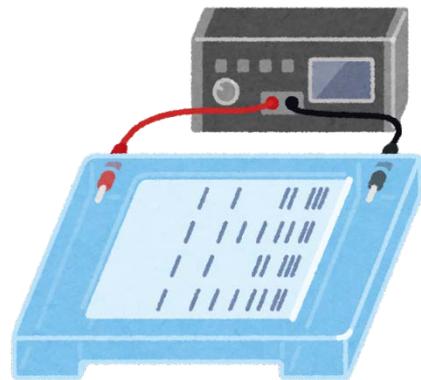
Ver. 310315

やってみよう遺伝子実験！！



PCR法を用いたイネの品種判別実験

のテキスト



目次

- 1 バイオテクノロジーとは? p. 1
- 2 実験に必要なテクニックを習得しよう! . . . p. 2
 - (1) 今回使用する実験器具の紹介
 - (2) 実習
- 3 電気泳動は何をしている? p. 6
- 4 覚えた技術を使って遺伝子判別実験に挑戦 . . . p. 7
 - (1) 今回調べてみる遺伝子とは?
 - (2) どうやって目に見えない遺伝子を判定する?
 - (3) 人力サーマルサイクラーに挑戦
 - (4) PCR の原理をペーパークラフトで学ぼう
 - (5) どのように社会や研究に役立てられている?
- 5 実験結果を考察しよう p. 12
- 6 参考資料 p. 13
 - (1) PCR を開発した科学者
 - (2) 意外なところに電気泳動
 - (3) ゲノム編集技術とは

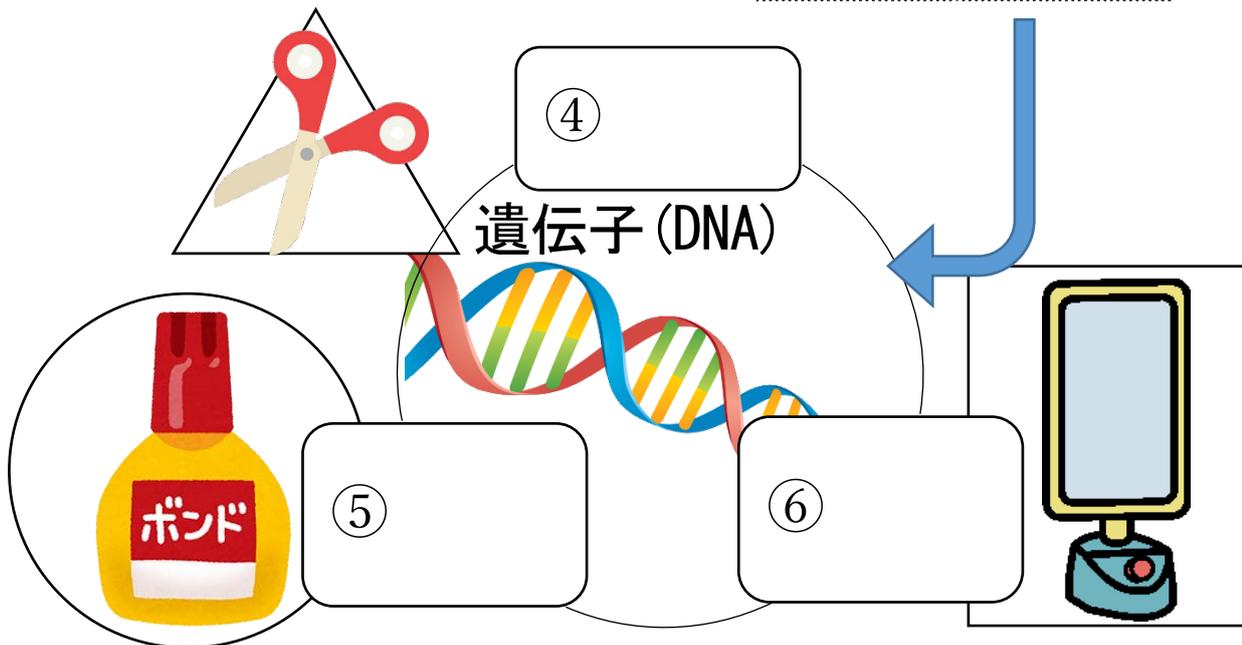
1 バイオテクノロジーとは？

☆ 生物の持つ① や② を上手に利用し、人間生活や環境保全に役立つ技術

↓ ①や②は何が決定しているのか？

③ が決めている

つまりバイオテクノロジーには、③を自在に操る技術が必要



このような技術は、**遺伝子組換え技術**や**遺伝子解析**に使われる。

・それぞれの技術を実現する方法

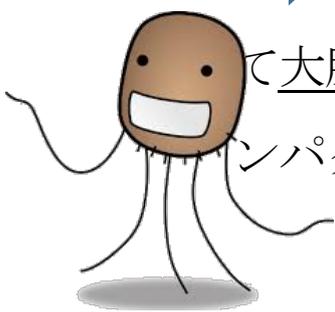
△ DNA を切る → ⑦

○ DNA をつなぐ → ⑧

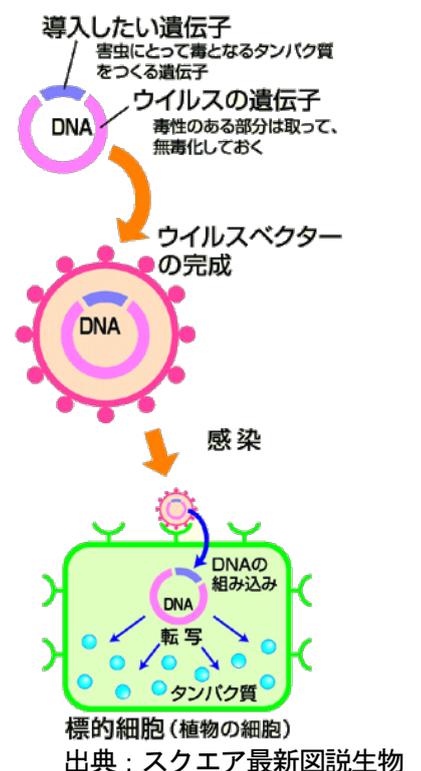
□ DNA を増やす → ⑨

↳ ⑦・⑧を応用し、⑩ を使っ

て大腸菌の遺伝子を組換え、遺伝子やタンパク質などを増やす方法もある。



©もやしもん



2 実験に必要なテクニックを習得しよう！

☆ まずは制限酵素 (*Hind* III) で λ (ラムダ) ファージ の DNA をばらばらにした λ マーカーを使って、実験器具の操作に慣れよう！

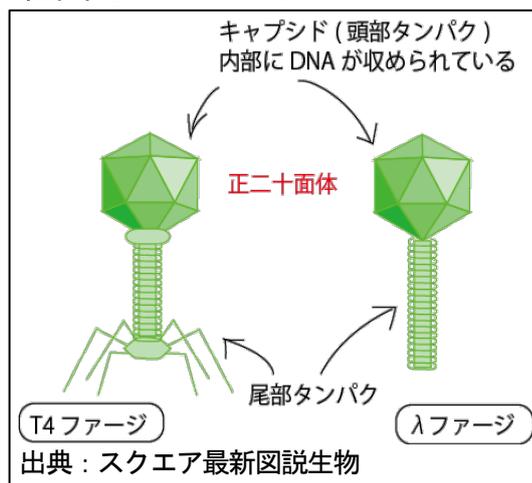
(1) 今回使用する実験器具の紹介

ア マイクロピペット

① マイクロピペット【図1】は 1.0 mL (= 1000 μL) 以下の液体を測り取る。P200, P20, P2 と表示してあるものは、それぞれ ⑪ μL ⑫ μL, ⑬ μL の容量を測り取ることを示している。

② 目盛り調節ダイヤルを回してセットする【図1】。ダイヤルはゆっくり回す必要はない。

③ 親指でプッシュボタンとチップイジェクターボタンを押せるようにハンドグリップを握る。



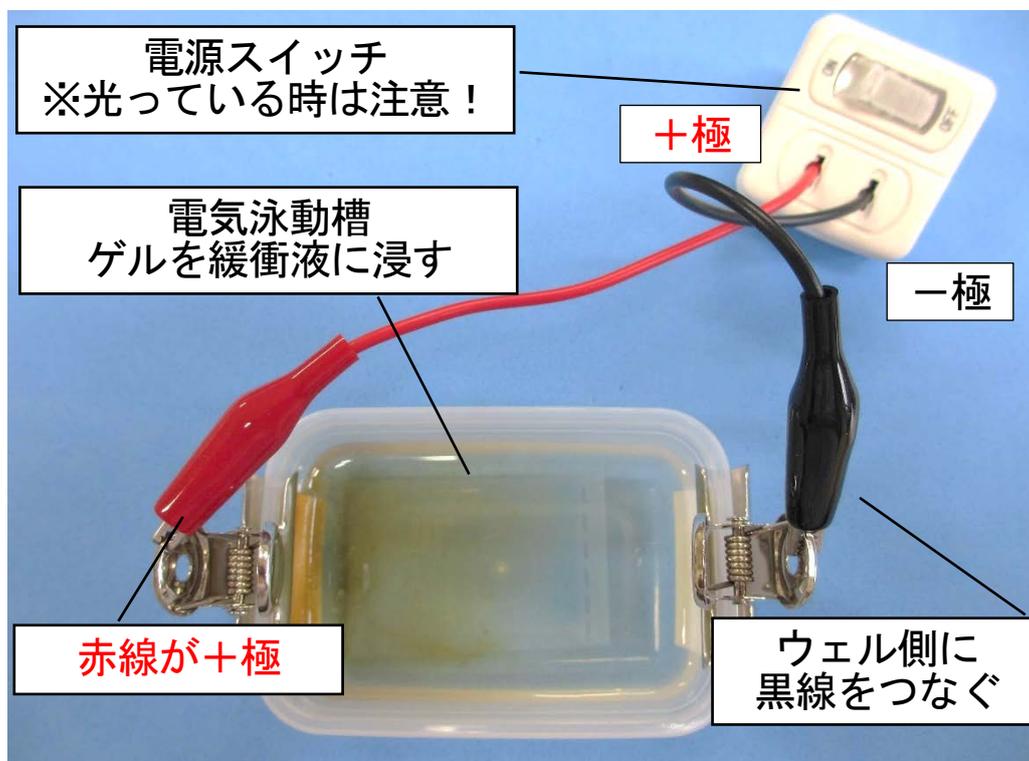
● マイクロピペット各部の名称		● 容量設定目盛りの見方		
		P20	P200	P1000
		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
		12.5μL	125μL	750μL
※注意！				
故障の原因となるため、目盛り調節ダイヤルを回す際には、 容量の範囲を超えて回さない ようにすること。				

【図1】 マイクロピペットの各部の名称と使用上の注意

イ 電気泳動装置(自作の装置で行う場合)

高い電圧を一定の範囲の水溶液中に流すことができる装置、

感電や土のつながかたに注意する【図2】。



【図2】自作の電気泳動装置の説明

ウ 緩衝液(TAE 溶液)

電気泳動の際に⑭を保護する液体で、電気や温度変化によって性質が変化しにくい特徴を持つ。

(2) 実習

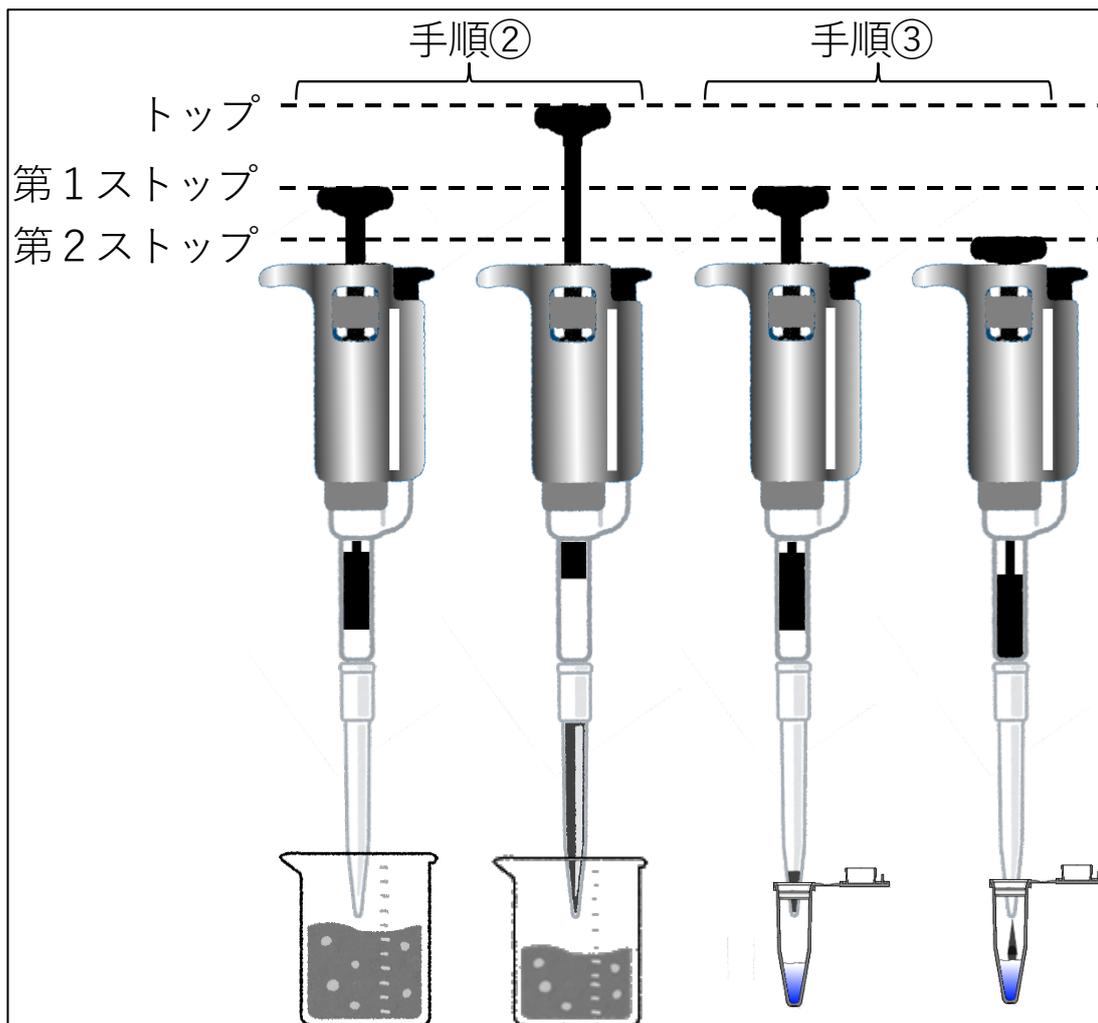
ア 使ってみようマイクロピペット

挑戦! マイクロピペットで、10 μ Lの液を取り出し、別のチューブに移してみよう。

- ① P20のピペットを10 μ Lに設定し黄色のチップを取り付ける。
- ② プッシュボタンを第1ストップ【図3】まで押し込み、その状態のままチップの先端をチューブ内の液につけ、ゆっくりプッシュボタンをトップまで戻して液を吸い上げる。

③ 別のチューブにチップの先端を入れ、プッシュボタンを第1ストップまで押し下げて液を排出する。さらに第2ストップまで強く押し下げ、チップ内に残った液を完全に排出する。

④ チップの先端を出し、プッシュボタンをゆっくりと戻し、イジェクターボタンを親指で押してチップを取り外す。



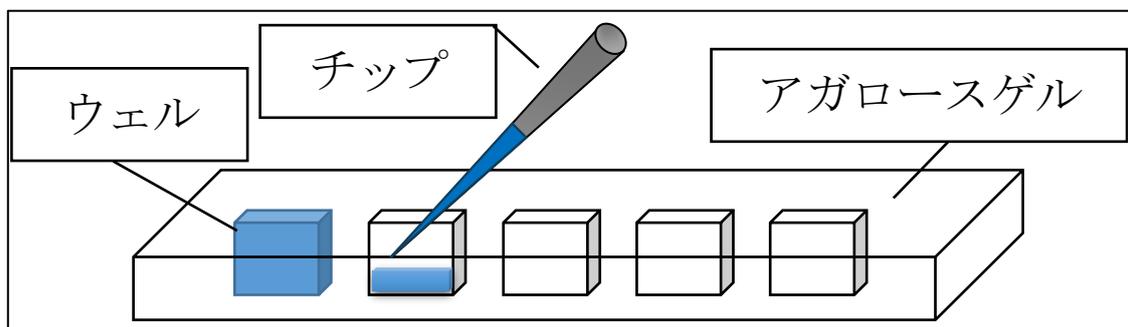
【図3】 プッシュボタンの動かし方

※注意！

- 必ずピペットチップを装着せよ！
- マイクロピペットを逆さまにしない！
- 急激に吸い込むと本体に液が入り、故障の原因となるので注意！
- 本体まで液を吸い込んでしまった場合は正直に報告！

イ ゲルへのアプライ(注入)の練習【図4】

アプライとはアガロースゲル上のあけられたウェルと呼ばれる穴にマイクロピペットで液体を注入すること。



【図4】 アプライの方法

挑戦! アガロースゲルのウェルに $2\mu\text{L}$ ずつ λ マーカーを入れてみよう。

- ① P2 のピペットを $2\mu\text{L}$ に設定し 白色のチップ を取り付ける。
- ② λ マーカーを吸い取る。
- ③ もう 片方の手をピペット本体に添えた状態 でウェルの中にチップの先端を入れ、ゆっくりと第2ストップまでボタンを押し込む(空気を入れないように注意する)。
- ④ λ マーカーを入れ終わったら、ゆっくりと引き抜く。

※ 多少ウェルの上から液体があふれても大丈夫です。あわてて ゲルを破壊しないように注意 してください。

ウ 電気泳動で λ マーカーを見てみよう

挑戦! 電気泳動し、UV トランスイルミネーターで観察する。

- ① 電源装置の 黒線(-極) をウェル側に接続する。
- ② 赤線(+極) を反対側に接続する。
- ③ 感電防止のため、端子に 金属や服が触れていないか確認 する。
- ④ 電源を入れて、約 15~20 分間電気泳動 する。

- ⑤ スイッチを切る。緩衝液を捨てる。
- ⑥ 泳動槽を UV トランスイルミネーターにのせて観察する。(→右のバンドが確認出来たら成功！)

※注意！

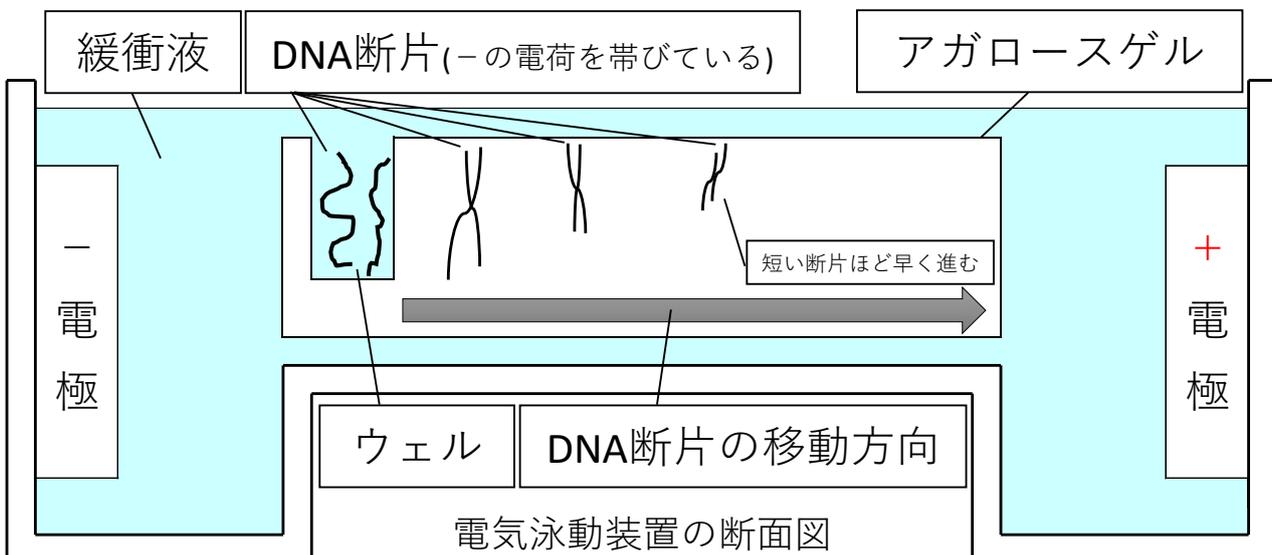
- ・高電圧に注意する！
- ・必ず電源は OFF にしてから装置に触れる！
- ・スイッチを入れるときは班員に言うこと！
- ・異常が起きたら教員にすぐに報告する！

λ-HindIII マーカー	
バンド	bp (塩基対)
	23130
	9416
	6557
	4316
	2322
	2027
	564
	124

3 電気泳動は何をしている？ (参考資料2)

☆ 電気泳動とは？

多くの物質は、⑮ の電荷を持っており、高い電圧をかけると、⑯ に移動させることができる。これを電気泳動という。この原理を利用して、⑰ (寒天のようなもの) など一定の抵抗を持った物質内を通り抜けさせ、⑱ のように物質を分けることができる。他に物質を分ける方法として光合成色素を分離する⑲ がある。



4 覚えた技術を使って遺伝子判別実験に挑戦

(1) 今回調べるイネの遺伝子とは？

① ⑳ 抵抗性遺伝子 (*Pii*)

いもち病は、イネに付着するカビの一種が原因の感染症で、日本で最も大きな被害を出しているイネの病気である。



葉いもち



いもち病病斑

② ㉑ 由来の塩基配列

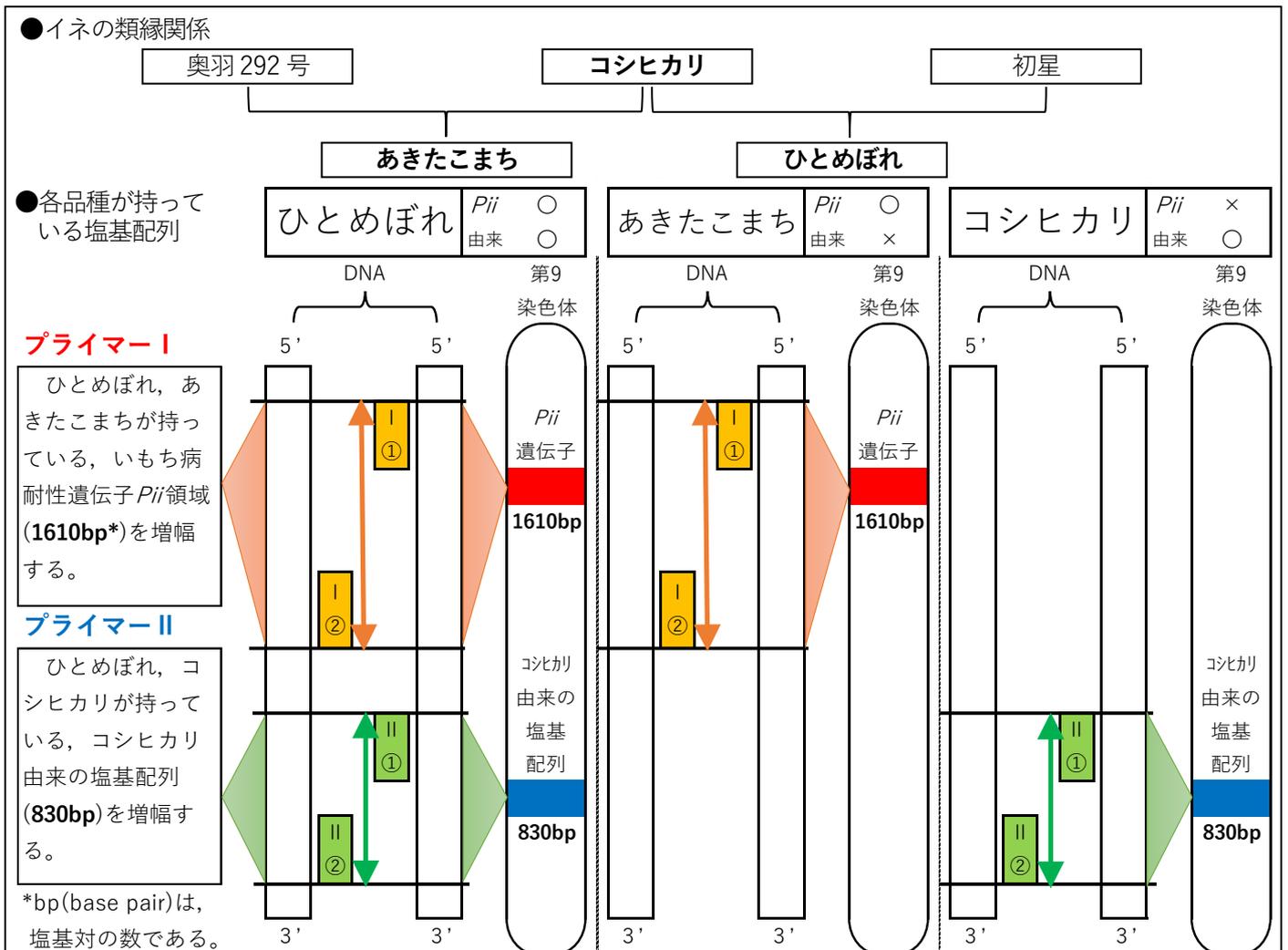
イネや米粒は外見で品種を区別できず、DNA を比較して品種判別を行っている。優秀な品種のコシヒカリは、様々な品種の親となっているためコシヒカリ由来の塩基配列を持っている品種も多い。



穂いもち (首いもち)



穂いもち多発圃場



※ ①, ②の㉑ によってこれらの品種判別が可能となる。

品種名	遺伝子名	いもち病抵抗性遺伝子 <i>Pii</i>	コシヒカリ由来の塩基配列
コシヒカリ			
あきたこまち			
ひとめぼれ			

③ 今回調べる品種は、岩手県で開発された品種です！



A 金色の風

2017年に岩手県農業研究センターで開発された。岩手県最高級品種で食味・食感が優れている。



B 銀河のしずく

2016年に岩手県農業研究センターで開発された。炊き上がりの白さと冷めてもおいしい食味が特徴である。

挑戦！ 二つの岩手県産品種が、いもち病抵抗性遺伝子 *Pii* とコシヒカリ由来の塩基配列を持っているか調べてみよう。

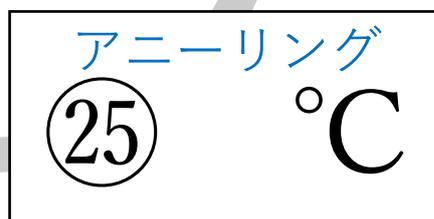
(2) どうやって目に見えない遺伝子を判定する？

A. 目に見えるくらい増やせば OK！

☆その方法を PCR 法 (②③) という。(参考資料1)



←通常はサーマルサイクラーという機械を使う…が、今日は



(3) 人力サーマルサイクラーに挑戦

挑戦! 通常機械が行っている温度変化を、自分たちで再現して DNA を増幅させてみよう。

<p>●機械を使う場合</p> <p>98°C 60 秒</p> <p>↓</p> <p>98°C 5 秒</p> <p>↓ 冷却</p> <p>64°C 5 秒</p> <p>↓ 加熱</p> <p>68°C 45 秒</p> <p>↓</p> <p>68°C 60 秒</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0; width: fit-content;"> 機械が温めたり、冷やしたりするので時間が余計にかかる。 </div> <p style="text-align: center;">28 回繰り返し</p> <p>作業全体にかかる時間 約 60 分※</p> <p><small>※高速反応可能な試薬で通常より時間短縮しています。</small></p>	<p>●人力で行う場合</p> <p>98°C 60 秒</p> <p>↓</p> <p>98°C 5 秒</p> <p>↓ 次の槽へ移動</p> <p>63°C 5 秒</p> <p>↓ 次の槽へ移動</p> <p>68°C 45 秒</p> <p>↓</p> <p>68°C 60 秒</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0; width: fit-content;"> 移動するだけなので余計な時間がかからない。 </div> <p style="text-align: center;">28 回繰り返し (30 回でも OK)</p> <p>作業全体にかかる時間 約 30 分※</p> <p><small>※高速反応可能な試薬でさらに時間短縮しています。</small></p>
---	--

【図5】 実は機械よりも早い人力サーマルサイクラー

☆まずは、DNA 増幅に必要なものを混ぜ合わせよう！(PCR 反応液)

- ① PCR 用のマイクロチューブを 3 本用意し、どのコメの DNA を入れたか分かるようにシールを貼り、下記の表の通りに試薬を入れる。(蒸留水がすでに入っています。チューブが壊れてもれていないか必ず確認すること)

〈今回使用するイネの品種〉

- 金色の風 ● 銀河のしずく ● コシヒカリ

PCR 反応液の内容		
試薬の種類	1 品種あたり	最終濃度
Sapphire Amp Taq (DNA 合成酵素)	12.5μL	1 倍
プライマーミックス液(4 種類混合済み)	2.0μL	0.2 μM
蒸留水	9.5μL	
DNA 抽出液	1.0μL	
計	25.0μL	

- ② 遠心分離機で混ぜ合わせる。
- ③ マイクロチューブ固定具に3本をセットする。
- ④ 3種類の温度に設定された恒温槽を使って、温度変化のサイクルを、5サイクルごとにパートナーと交代しながら、28 サイクル温度変化を繰り返して



DNA を増幅する。(時間については教員が測定してお知らせします。) また、人力サーマルサイクラーを行っていない人は、『(4)PCR の原理をペーパークラフトで学ぼう』を行う。



(4) PCR の原理をペーパークラフトで学ぼう

- ① 絵柄の書いてある紙を指示通りに切ったり切れ込みを入れる。
- ② 点線に従って折り曲げ、のりで貼り付ける。
- ③ 絵柄が正面から見える状態で真ん中から開く。
- ④ 4面全てを開くことができ、元の絵柄に戻るかどうか確認する。



挑戦2! 人カサーマルサイクラーで得られた PCR 産物を電気泳動して、どのような結果が出るか確認しよう。



ウェルの番号							
1	2	3	4	5	6	7	8
マ	金	銀	コ	※5～8は予備です。 ウェルを壊してしまった 場合などに使用します。			
カ	色	河	シ				
カ	の	の	ヒ				
カ	風	し	カ				
		ず	リ				
		く					

(5) どのように社会や研究に役立てられている？

ア 生物の祖先を探る。

→ 同じ技術は⑳にも使われている。

イ 優れた遺伝的な特性を㉑。

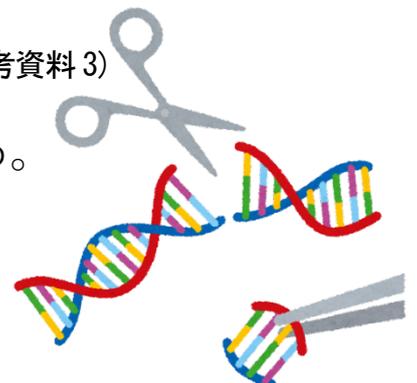
→ 新品種の開発にかかる時間の短縮が可能になった。

ウ 病気の㉒を発見できるようになった。

→ 治療困難な病気もやがて治るかもしれない！

エ 増幅した遺伝子を、高性能なはさみで好きな場所に入れる㉓が開発された。(参考資料3)

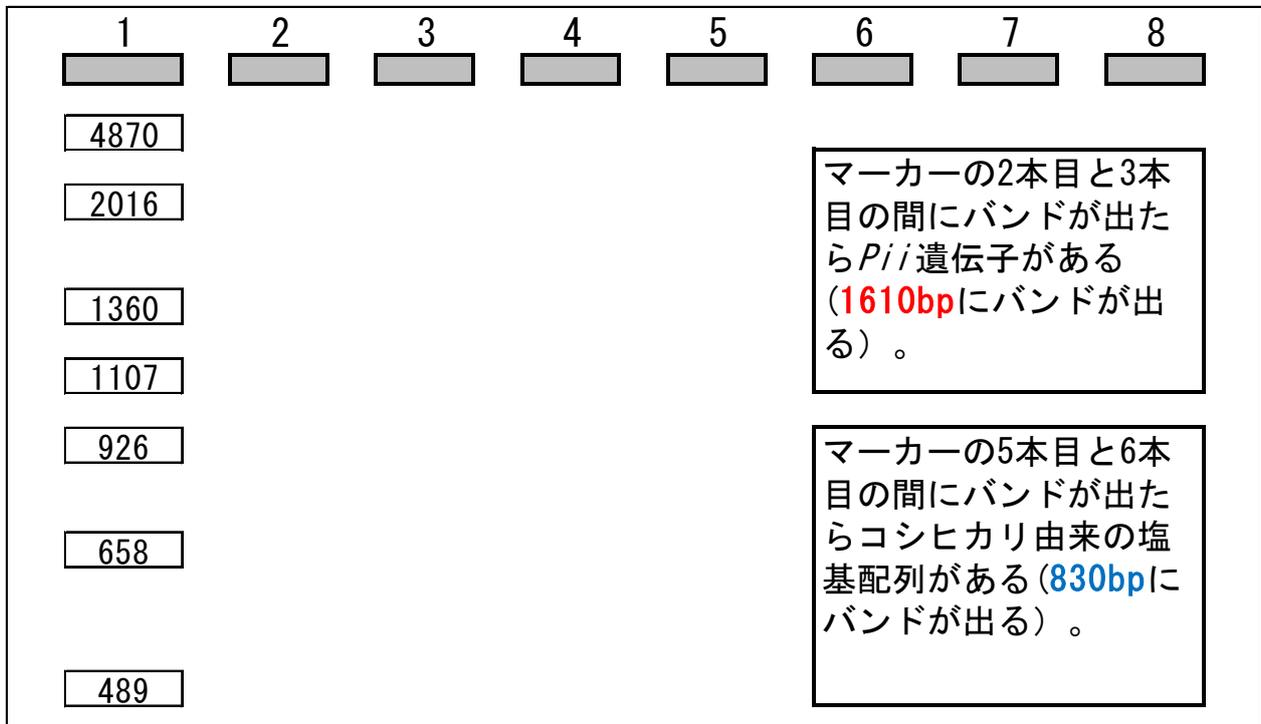
→ 治療できなかった病気を克服できる。



5 実験結果を考察しよう

(1) 電気泳動結果の確認

一番左側にあるサイズマーカー(pHY マーカー)が基準となります！



(2) 考え方

☆実験結果から分かったことを、空欄に書き込んでみよう。

品種名	遺伝子名	
	いもち病抵抗性遺伝子 <i>Pii</i>	コシヒカリ由来の塩基配列
コシヒカリ	×	○
あきたこまち	○	×
ひとめぼれ	○	○
金色の風		
銀河のしずく		

(3) 自分なりの言葉で結論を書いてみよう。

○ **金色の風**は、

○ **銀河のしずく**は、

6 参考資料

(1) PCR を開発した科学者

PCR法を開発したキャリー・マリス (Kary Banks Mullis) 博士は、子どもの頃から物置に実験室を作り、ロケット燃料を調査しては頻繁に事故を起こしていたそうです。高校生の時には、科学の同好会の会長となって近くの小学校でサイエンス・ショーを行ったとき、ヨウ素と過塩素酸カリウムの反応実験をやっている最中に爆発事故を起こしたなど、その破天荒なエピソードに事欠かない人物です。



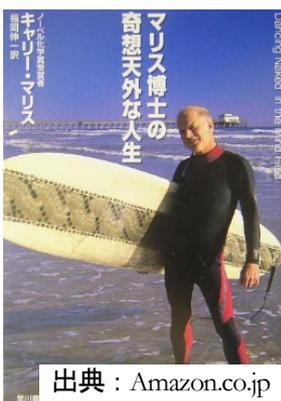
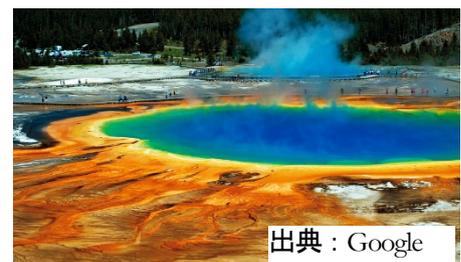
※良い子はまねしないように！！

そのきわめつけともいえるのが、PCRの理論を思いついた時のエピソードです。彼は1983年5月の夜に、恋人のジェニファーを助手席に乗せ、カリフォルニアの森林地帯をホンダシビックで軽快に飛ばしていました。頭の中には恋人のことではなく、研究室の仕事が蘇ってきて、ヘッドライトは木々を照らしていたが、彼の目はなかばDNAがほどこかれていく様子を見ていたそうです。(危険運転ですね…)



その時に恋人と何度も訪れたイエローストーン国立公園の温泉を思い出しました。その温泉の中にいる好熱性細菌ならば、PCRの条件に耐えられるのではないかとひらめいたのです。彼はすぐに車を止めてその方法をメモしたそうです。(その後怒ったジェニファーとは別れてしまったそうですが…)

その後、1987年にPCRについての初論文を投稿し、なんと1993年にはノーベル化学賞を授与されます。そのニュースを聞いて殺到してきたテレビ局のカメラ・クルーは、マリス博士がサーフィンをしているところに殺到したとか。翌日の新聞の見出しは、もちろん「サーファーがノーベル賞獲得！」だったそうです。



そんな博士の書いた自叙伝が出版されています。興味がある人は読んでみてください。科学者のイメージが変わると思います。

マリス博士の奇想天外な人生

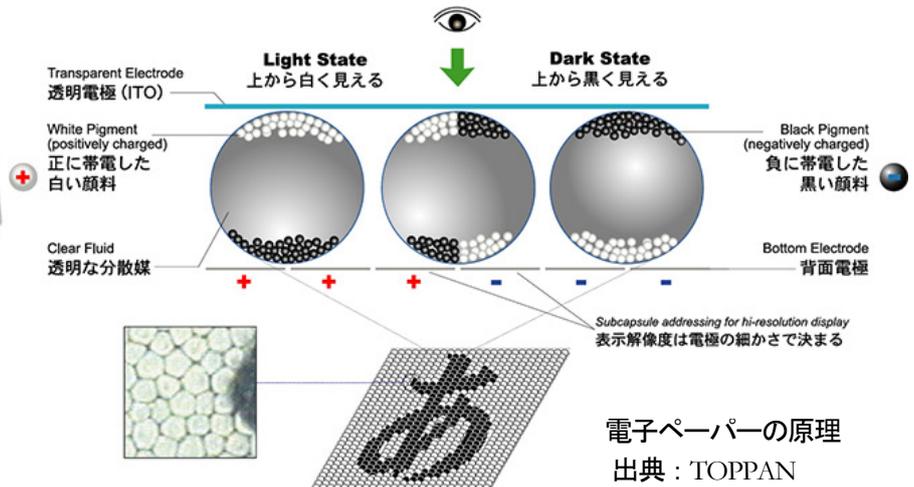
(ハヤカワ文庫 NF) 文庫 - 2004/4/9

キャリー・マリス (著), 福岡 伸一 (翻訳)

(2) 意外なところに電気泳動

これまでパソコンやスマートフォンなどの表示装置(ディスプレイ)は、ブラウン管、液晶、LED、有機ELなどと進化してきましたが、現在注目されつつあるのが電子ペーパーです。電気泳動を応用したもので、これまでのディスプレイよりもさらに省電力で薄くできるのが特徴です。これまでは白黒表示しかできませんでしたが、カラー表示のものも研究が進んでおり、やがて紙のような感覚で電子ペーパーを使う時代が来るかもしれません。

ディスプレイの進化

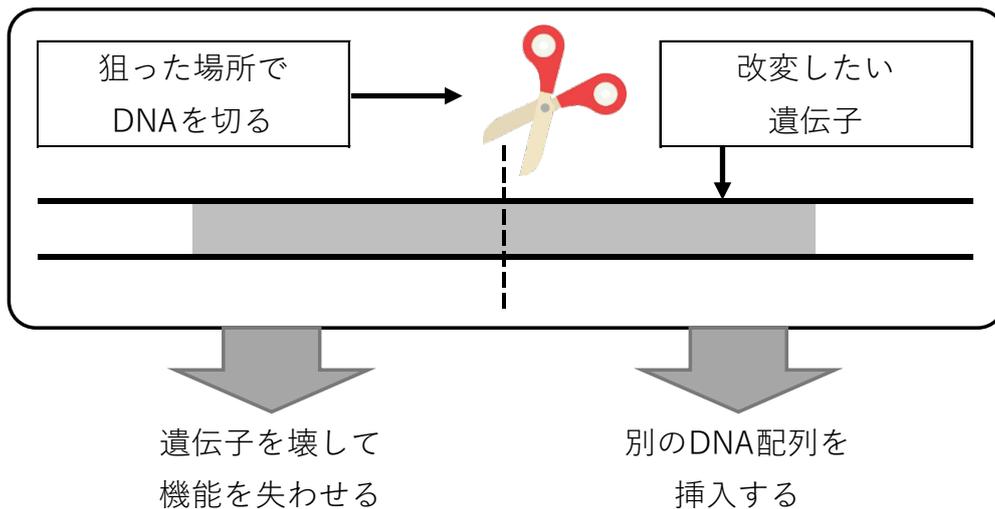


近未来には、ほとんど電力を消費しないディスプレイがスマートフォンに搭載されているかも知れません。

(3) ゲノム編集技術とは

制限酵素は、DNA を決められた配列の部分で切る酵素ですが、意図しない部分にも影響する可能性があるという問題がありました。しかしゲノム編集技術は狙った部分の遺伝子のみを切断したり、新しい遺伝子を挿入することができます。品種改良にかかっていた時間を飛躍的に短くすることができるため、今後数多くの分野で使われることになる技術です。

ゲノム編集のイメージ



遺伝子を正確に切り貼り

※農業生物資源研究所、中央大、京都大、内閣府の資料を基に作成

酵素の「はさみ」が活躍

狙った場所でDNAを切断できる酵素
遺伝子情報の編集が可能に

DNA

塩基
アデニン チミン
シトシン グアニン

標的となる遺伝子の塩基配列をDNA上で探し出し、その場所で切断

広がる応用の可能性

品種改良

- トマト: 張りを失いにくくして日持ちを向上
- マグロ: 激しく泳ぎ回らないようにして養殖しやすくする
- ジャガイモ: 芽に有害物質を作る遺伝子を破壊
- イネ: アレルギー物質を作る遺伝子を破壊

遺伝子の編集方法

破壊: 切れ目を入れ破壊、機能しない状態に

導入: 外部から別の遺伝子を導入

産業利用

- バイオ燃料: 油を作る藻を改良して生産量を増大
- 生物工場: カイコの体内で医薬品や化粧品を原料を生産

医療研究

- 実験用マウス: 病気を発症させ新たな治療法を開発
- 難病治療: 患者のiPS細胞で病気の原因遺伝子を修復

出典：産経ニュース