

遺伝子組換え実験及び食品からの DNA抽出と PCRによる組換え遺伝子の検出

岡山県立川上農業高等学校

中川陽介

1 はじめに

平成 14 年 8 月に筑波大学遺伝子センターで行なわれた新産業技術等指導者養成講習会に参加し、教育用キットを用いた遺伝子組換え実験及び食品からの DNA 抽出と PCR による組換え遺伝子の検出についての実験ならびに教育現場で組換え DNA 実験を教える意義及び指導すべきことなどに関する教育研修を受けた。

この内容を科目「生物工学」、「生物工学」の授業に取り入れ、新技術の導入による魅力的な授業展開として実施した。

2 目的

遺伝子組換え作物の必要性やその安全性、また許可されるまでの検査や手続きなどについて理解させる。また、実際に教育用キットを用いて遺伝子組換え実験及び食品からの DNA 抽出と PCR による組換え遺伝子の検出などの基本的な技術を体験させ、生命科学への興味を深める。

3 「教育目的組換え DNA 実験」の新設

文部科学省が制定している組換え DNA 実験指針の改定にともない、平成 14 年 1 月に「教育目的組換え DNA 実験」項目が新設され、中学校・高等学校における生物実験として生徒自ら組換え DNA 実験を体験することが可能となった。

教育目的組換え DNA 実験は、組換え DNA 実験に関する教育及び啓発を図ることを目的として、安全性が特に高い宿主 - ベクター系と DNA を組み合わせる実験である。

実際に実験を指導する教員は次の手続きを行

う。

実験計画の立案・・・基準に適合しているか
校長の同意・・・申請書の作成
実験準備・・・安全のための事前学習
実験実施・・・安全面に配慮
実験後の処理・・・組換え体の廃棄、器具の滅菌
記録書類の保管・・・報告書作成

4 実験の計画

平成 14 年 9 月

遺伝子組換え DNA 実験 (実験 1)

平成 15 年 4 月

食品からの DNA 抽出と PCR による組換え
遺伝子の検出 (実験 2)

平成 15 年 6 月

まとめ

5 実験 1 遺伝子組換え実験

本実験では、オワンクラゲが持つ緑色蛍光タンパク質である GFP の遺伝子を大腸菌へ導入し、形質転換して光る大腸菌を作製した。

その結果 GFP 遺伝子を持つ大腸菌を作ることができ、その発光を GFP 遺伝子を持つ大腸菌を作ることができ、その発光を UV 照射下で写真 1 のように確認することができた。非組換え体の大腸菌に対して、組換え体の大腸菌が発光していることがわかった。

6 実験 2 食品からの DNA 精製と PCR による組換え遺伝子の検出

(1)食品からの DNA 精製について

この実験では、材料としてトウモロコシ葉だ

けでなく油揚げや冷凍コーンなど市販されている大豆製品やトウモロコシを用い、1区から7区に設定した。

試薬はイソプロパノールや70%エタノールの他にDNA精製キットに付属した試薬を使用した。

<方法>

- ・食品をすりつぶしマイクロチューブに取る。
- ・タンパク質分解酵素を加え、激しく混ぜる。
- ・遠心分離後、DNAの含まれる水層を取り出す。
- ・磁気粒子を入れてDNAを吸着させた後、磁気スタンドに立て余分な液体を捨てる。
- ・70%エタノールで磁気粒子のDNAを洗い、滅菌蒸留水を加えてDNA溶液として回収する。

(2)PCRによる特異的DNA断片の増幅

PCRとは、耐熱性のDNAポリメラーゼを用いて連鎖反的にDNAを増幅する方法である。

1サイクルで標的DNAは2倍になる。従って、nサイクルで 2^n 倍に増幅することになる。

PCR溶液を調整し、DNA溶液を入れ、サーマルサイクラーにサンプルをセットしてPCRを行う。

35Sプロモーターは、現在ほとんどの遺伝子組換え作物に用いられているため、150bpの遺伝子が検出されたら遺伝子組換えされたものであると判断できる。

(3)電気泳動による分析

PCR産物をアガロースゲルで電気泳動後、DNAを染色してUV照射下でバンドとして検出し、バンドサイズと濃さを比較して訓に買え遺伝子の有無を判定する。電気泳動を行なうにあたり、作製したゲルのウェルにサンプルを入れる。また、8区としてポジティブコントロールを入れ、同時にDNA分子サイズマーカーを入れた。

(4)実験結果

150bpが組換え遺伝子を表す。1区と8区はコントロール、2区と4区は組換えトウモロコ

シ、3区と7区は非組換え大豆のDNAが含まれることが分かった。5区はDNA精製が充分でなく油が多く残ったためにPCRが正常に反応しなかった。油揚げのような加工製品からもDNAを精製しPCRによる検出を行なうことができるが、一部のものは精製が不十分でPCRが阻害された。また、6区はPCRは正常であったが、DNAがうまく取り出せなかったものと思われる。加工食品の製造過程においてDNAが分解されてDNAを精製できない可能性がある。

この実験は定性試験であり0.1%混入でも検出できるが、日本の規定では5%以下の混入は非遺伝子組換えとなるので、定量試験を行なう必要がある。また、150bpの標的DNA CaMV 35S promoterは、植物に感染しているウィルスを検出した可能性もあるため別の検定結果とあわせて解釈する必要がある。

7 まとめ

DNA実験を授業に導入することにより、生徒の興味・関心は高まり、長時間の実験にもかかわらず前向きな姿勢を見ることができた。また、今日的话题となっている組換え食品など、自分たちの食に対する関心も高まった。