

実習会(1994年8月23日~26日)

バイオテクノロジーの基礎技術

神奈川県立平塚江南高等学校 齋藤隆政

本実習会は「バイオテクノロジーの基礎技術(①植物のDNAによる系統診断, ②動物細胞の培養)」というテーマで, 1994年8月23日から26日まで, 横浜市立大学生物学教室で行われた。

これは, 横浜バイオテクノロジー懇談会・(財)バイオインダストリー協会が主催し, 横浜市立大学木原生物学研究所・文理学部及び本研究会が協力する形で行われたものである。

4日連続の実習会で, その内容はかなり盛りだくさんであった。

I. 植物細胞のDNAによる系統診断

(目的) 植物細胞からDNAを抽出し, その遺伝子を解析する手法を学ぶ。

(手順—実習項目)

1. DNA抽出
2. 制限酵素処理
3. 電気泳動
4. DNAプロットング
5. ハイブリッドを形成したDNA断片の検出: サザン・ハイブリダイゼーション(E-CL法)
6. DNA診断・解析(RFLP法)

次に手順の概略を報告する。

1. DNA抽出(簡便法)

参加者各人が持参した材料(新鮮な葉, 約2g)から, 各人でDNAを抽出した。

この方法に必要な機材や薬品類は, 比較的容易に用意でき, 各学校でも実施可能と思われるので, 少し詳しく報告する。但し, 振とう装置付きの恒温水槽は, 各学校で簡単には入手できないかもしれないが, 何らかの代替策を考えられそうである。会員諸氏の研究結果を報告して下されば幸いである。

準備する試薬類

*液体窒素

*DNA抽出液

20mM EDTA

100mM Tris-HCl (pH8.0)

1.4M NaCl

2% Cetyl trimethyl ammonium bromide^{*}

0.2% 2-メルカプトエタノール^{*}

注) ^{*}は, オートクレーブ滅菌後に加える。

室温保存

*クロロフォルム試薬

クロロフォルム 480ml

イソアミルアルコール 20ml

注) 遮光ビンに入れ, 室温保存

*イソプロパノール

*RNA分解酵素入りのTE緩衝液 (pH8.0)

1M Tris-HCl (pH8.0) 1 ml

0.5M EDTA (pH8.0) 0.2ml

滅菌水 98.8ml

注) オートクレーブ滅菌後, これにRNA分解酵素を10mg/ml TE緩衝液の濃度になるように入れる。

*フェノール試薬

フェノール 100g

8-キノリノール 0.1g

TE緩衝液 (pH8.0) 50ml

注) 湯煎し完全に溶かす。室温まで冷ました後, 4℃で遮光ビンに入れて保存。フェノールは皮膚を侵すので要注意。

*フェノール/クロロフォルム液

前述のフェノール試薬とクロロフォルム試薬を1:1に混合したもの。

方法

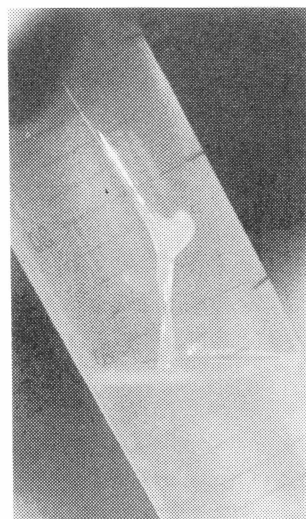
①乳鉢と乳棒を-20℃の冷凍庫に入れ, 30分以上冷却する。(これを行わないと, ③の操作を行

うとき乳鉢が割れることがある)

- ②生重量約 2 g の植物体をハサミでぎざみ, 乳鉢に入れる。
- ③軍手を着用し, 乳鉢に液体窒素を 10ml 程度加えて植物体を凍結し, 植物体が (抹茶のような) 微粉末になるまで乳鉢と乳棒を用いてすりつぶす。
(この段階で, 植物細胞は破碎される)
- ④植物体の微粉末を, 50ml 容量の遠心管に入った 15ml の DNA 抽出液に懸濁する。
- ⑤振とうしながら, 60℃ で 1 時間温める。
(この段階で DNA が抽出液に溶けてくる)
- ⑥ 10ml のクロロフォルム試薬を遠心管の管壁づたいにゆっくりと加え, 水層とクロロフォルム層を遠心管を横にした状態でのシーソー運動により, 15 分間混ぜる。
(この操作は, 植物から出るポリフェノール等を除去するために行う。)
- ⑦ 3000 回転で 10 分間, 遠心分離する。
- ⑧遠心が終わった段階で, 遠心管の内容物は, 上から順に水層 (DNA を含む), 植物体の残骸, クロロフォルム層となる。水層を, 新しい 50ml 容量の遠心管に, 5 ml 駒込ピペットを用いて移す。
(その際, 植物体の残骸やクロロフォルムを吸い取らない。またクロロフォルムは, 有機廃液として処理しなければならないので, 流し等に捨ててはいけない)
- ⑨ 7 ml の -20℃ に冷却したイソプロパノールを, 遠心管の壁づたいに加え, 遠心管を優しくシーソー運動させて溶液をよく混ぜる。
- ⑩ガラスロッド (第 1 図) で核酸 (核 DNA + ミトコンドリア DNA + 葉緑体 DNA + RNA) を巻き取り, ピペットスタンドの上に置き, 水気がなくなるくらいまで (5 分間位) 風乾する。
ガラスロッドは, 9 インチのパスツールピペットの先端をガスバーナーであぶり, ふさいだ後, 先端から約 1 cm の位置をあぶり, 先端をフック状に曲げて作る。
- ⑪ 15ml 容量の遠心管に入った 2 ml の RNA 分解酵素入りの TE 緩衝液に, 核酸の付いたガラスロッドを 5 分間浸す。
- ⑫ガラスロッドから核酸を優しく振ってはらずし, ガラスロッドを遠心管から取り出す。
- ⑬遠心管を 60℃ の恒温槽で加温しながら, 優しく

混ぜて核酸を溶かす。

- ⑭遠心管を 37℃ の恒温槽で 10 分間温める。
(RNA 分解酵素により, 抽出された核酸のうち RNA のみを分解する)
- ⑮ 2 ml のフェノール/クロロフォルム液を管壁づたいにゆっくりと加え, 遠心管のふたをしっかりと閉め, 水層とフェノール/クロロフォルム液を, 遠心管を横にした状態でのシーソー運動により 15 分間混ぜる。
(この操作により, 溶液に溶けているタンパク質を変性させる。フェノール/クロロフォルム液は皮膚を侵すので, 皮膚や衣服に付けないように注意する→使い捨ての手袋を用いてもよい)
- ⑯ 3000 回転で 10 分間, 遠心する。
- ⑰水層 (上層) を, 新しい 15ml 容量の遠心管にパスツールピペットを用いて移す。
- ⑱ 200 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムを加え, 次に 5 ml の冷却したエタノールを遠心管の管壁づたいに加え, 遠心管をやさしくシーソー運動させて溶液をよく混ぜた後, 氷上に 5 分間置く。
- ⑲ガラスロッドで水層 (下層) とエタノール層 (上層) の境目あたりを静かにかき混ぜると (卵の白身のような) 透明で粘性のある total DNA (核 DNA + ミトコンドリア DNA + 葉緑体 DNA) がガラスロッドの先端に巻きついて来る (第 2 図)。管壁で十分に水分を切り, アルコールの臭いが抜けるまで 10 分間風乾する。



第 1 図 ガラスロッド 第 2 図 抽出された DNA

- ②0 200 μ l の滅菌水が入った 1.5 ml 容量の遠心管に、DNA のついたガラスロッドを 10 分間浸す。
- ②1 グラスロッドから、DNA をやさしく振ってはずし、ガラスロッドを遠心管から取り出す。
- ②2 遠心管を 60℃ の恒温槽で加熱しながら、やさしく混ぜて DNA を溶かす。
- ②3 DNA 溶液を氷上に保存する。
- ②4 フェノールおよびクロロホルムの廃液を有機溶媒の廃液入れに回収する。

結果

この方法によりシンビジウム（ラン科）の若い葉から抽出した DNA の紫外外部吸収スペクトルを測定した結果、265nm に吸収の単一ピークがあり、ほぼ純化されているものと思われた。また、生重量 1 g のシンビジウム葉から、約 100 μ g の total DNA が抽出された。

2. 制限酵素処理

参加者各人が、それぞれ持参した材料から抽出した DNA を TthHB8I (TaqI) という制限酵素で幾つかの断片に切断した（第 3 図-②）。

TthHB8I は、DNA の TCGA (AGCT) という塩基配列の所を認識して切断する、耐熱菌由来の酵素である。

切断される塩基配列が DNA のどこにあるかは、種により固有なので、制限酵素処理により生じる断片の長さや数は種によってちがってくる。

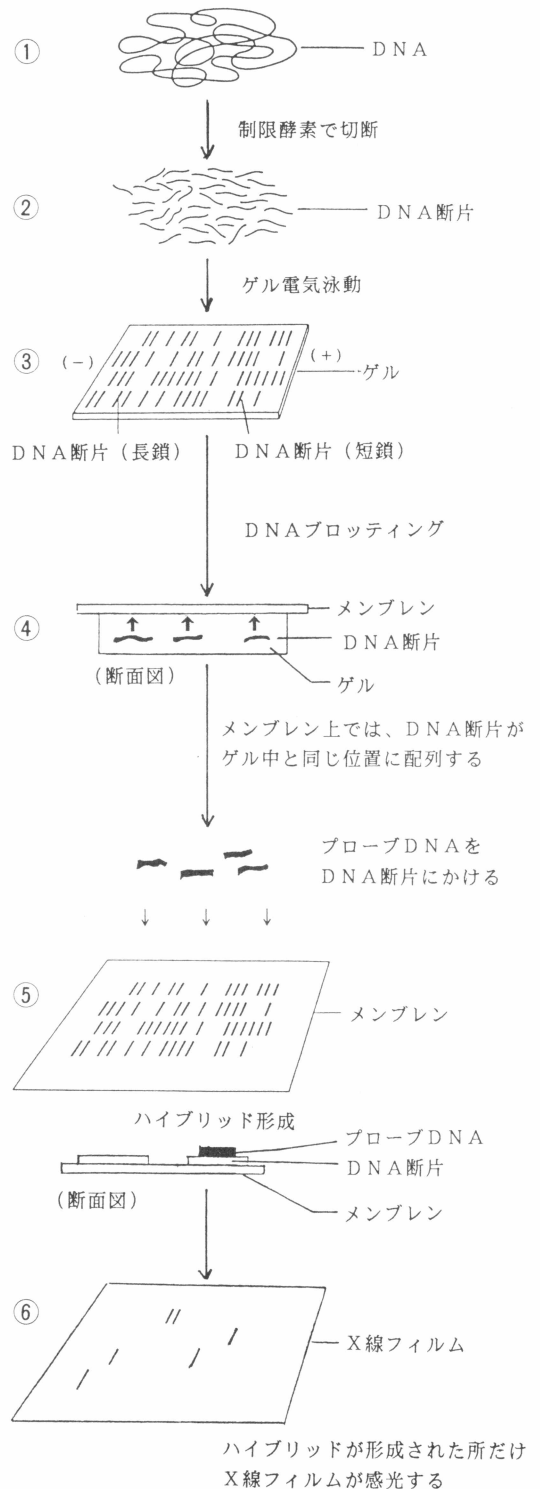
3. 電気泳動

制限酵素で切断した DNA 断片を、アガロースゲル電気泳動により、その長さのちがいによって分離した。

DNA は、陰性 (-) に帯電しているため、直流電流を流すと、陽極 (+) 側に移動する。また DNA の断片が短いほどゲル中を移動しやすいため、移動距離は大きくなる。20V で 15 時間泳動した後、UV ランプにより確認したところ、断片の長さの違いにより十数本のバンドに分かれた（第 3 図-③）。

4. DNA プロットティング

アガロースゲル中にバンド状に分離している DNA 断片を、アルカリ処理により一本鎖にした後、サザンプロットティング法でメンブレン（ナイロンでできた薄膜）上に移して固定した（第 3 図-④）。



第 3 図 サザン・プロットティング法

メンブレンは陽性 (+) の電荷をもっており、DNAが陰性 (-) の電荷をもってることと毛管現象とから、一本鎖DNAはアガロールゲル中からメンブレン上に移動する。(これには一晩を要した)。

5. DNA断片の検出:

サザン・ハイブリダイゼーション(ECL法)

パンコムギ由来のrDNA(リボソームRNAの遺伝子)をプローブDNAとし、メンブレン上に固定した一本鎖DNAの相補的な部分とハイブリッド形成させ、ECL法により、その位置を検出する。

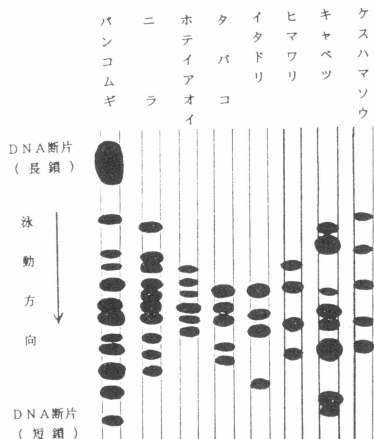
ECL法(Enhanced Chemical Luminescence)は、放射能を用いず、プローブDNAにラベルした物質の化学変化によって生じた蛍光でX線フィルムを感光させるといって新しく開発された方法である。

なお2~5で紹介した方法は、E.M.Southernによって開発されたので、サザン・プロット法と呼ばれている。

6. DNA診断・解析(RFLP法)

RFLP法とは、Restriction Fragment Length Polymorphismの略で、制限酵素で切ったDNAフラグメントの長さは種によって異なるので、サザン・プロット法などで得られるバンドのパターンも種によって少しずつ違い、そのパターンを比較することで類縁、系統を解析する方法である。

今回の実習では、標準のDNAとしてコムギを用い、そのrDNAをプローブとしたので、材料の植物のバンドのパターンとコムギのパターンを比較し、どの程度一致するかでコムギとの類縁を推定した。第4図に、今回の実習で得られたパターンの一部を



第4図 コムギプローブDNAとハイブリッドを形成したDNA断片

示すが、実習時間の関係で十分に解析できなかった。会員諸氏なりの解釈をお願いしたい。

II. 動物細胞の培養

(目的) 細胞培養法は、いろいろな生命現象を研究したり、有用物質を生産したりする上で、大変有効な手法である。ここでは、細胞培養法の基本的な操作法を習得し、細胞増殖に影響を与える各種物質の効果や、正常細胞と癌細胞の形態的特徴を調べる。

(使用細胞)

- ①正常ラット肝臓由来の上皮性細胞(BRL)
- ②BRLを発癌ウイルスの一種であるラウス肉腫ウイルスで癌化させた細胞(RSV)
- ③ヒト胎児肺由来の正常線維芽細胞(WI-38)
- ④ヒト・スキルス型悪性胃癌細胞(STKM-1)

1. 細胞の形態観察

上記4種類の細胞の形態を顕微鏡で調べた。

2. 細胞培養実習

上記①・②の細胞の増殖に対し、次の物質の影響を調べた。

- *牛胎児血清: 種々の増殖因子や細胞接着因子が含まれており、細胞の増殖を促進する。合成基礎培地に、通常10%添加する。
- *コルセミド: チュープリンの重合を阻害する。そのため紡錘糸が形成されなくなり、細胞分裂が阻害される。
- *TGF-β: 動物細胞の増殖阻害因子。分子量25000のタンパク質。

3. 細胞培養実習の結果

細胞の増殖に対する牛胎児血清の影響は明らかであった。また、2日程度の培養ではTGF-βの増殖抑制効果はみられなかった(第1表)。

第1表 細胞培養実習の結果

	牛胎児血清 無添加	牛胎児血清添加		
		—	+コルセミド	+TGF-β
肝臓上皮細胞(BRL)	-	++	-	(+)
ガン化した上皮細胞(RSV)	+	++	-	(+)

+: 増殖した -: 増殖しなかった

以上の報告の中には、部活動や授業に導入できそうなものもあるので、今後検討を重ねていきたい。