

高等学校における分子生物学実験の教材開発 － PCR 法を用いた汎用性 DNA サイズマーカーの作製－

Development of Teaching Materials for Molecular Biology Experiments in High School : Preparation of Versatile DNA Size Markers by PCR Method

笠原 恵* 向陽 康人**
KASAHARA Megumi HINATA Yasuhito

高等学校での分子生物学実験の普及のためには、できるだけコストがかからないような実験系の開発が必要である。高等学校「生物」のバイオテクノロジーの単元において、ほとんどの教科書に DNA の電気泳動実験が掲載されている。DNA 電気泳動法は分子生物学実験としては基本的なもので PCR 後にも実施される実験であり、必ず DNA サイズマーカーが必要となる。DNA サイズマーカーには、多くの種類があり販売されているが安価なものではない。そこで本研究では、汎用性プラスミドを用いて、できるだけ安価に目的の長さの DNA サイズマーカーを作製する方法を開発した。作製した DNA サイズマーカーは市販品と同等の性能を有し、必要なサイズの DNA 断片のみの増幅も可能なため、目的にあった独自の DNA サイズマーカーを作製できる点で有用である。

キーワード：分子生物学実験，教材開発，PCR，DNA サイズマーカー，汎用性プラスミド

Key word : molecular biology experiments, teaching materials, PCR, DNA size marker, versatile plasmid

I はじめに

バイオテクノロジーの発展に伴い、その知識や手法は実社会においても重要なものとなってきた。近年のコロナ禍において原理は知らなくても PCR という言葉だけは誰もが知るところとなっている。しかし、これらの内容は目に見えない現象を扱っているため、高等学校で扱う場合は、講義中心の授業だけでは深い理解が得られにくい可能性があり、講義に加えて実験の実施が必要となると考えられる。

高等学校学習指導要領（平成 30 年告示）解説理科編理数編（文部科学省 2019）では、遺伝情報の発現と発生の単元において、「遺伝情報の発現と発生について、観察、実験などを通して探究し、遺伝子発現の調節の特徴を見いだして表現すること」、「遺伝子を扱う技術については、制限酵素、ベクター及び遺伝子の増幅技術に触れること。それらが実際にどのように用いられているかについても触れること」とされており、これらの実験を行うことが推奨されている。各出版社より出されている「生物」の教科書には PCR 法、制限酵素による DNA の切断実験、DNA 電気泳動法などの実験が掲載されて

いる（表 1）。また、高等学校での実践を考えて様々な教材開発が報告されている（濱田ら 2017, 大井ら 2019, 園山 2020）。しかし、兵庫県内の教育現場（SSH 校を除く）においては、準備の煩雑さや試薬や機器の価格の高さがネックとなり、これらの実験があまり行われていないのが現状である（向陽ら 2020）。

そこで、本研究では高等学校でのバイオテクノロジー分野や分子生物学実験で行われる DNA 電気泳動法に着目し、その実験で使用される DNA サイズマーカーを購入するのではなく、目的にあった長さのものを汎用性の高いプラスミド DNA を鋳型として作製する方法の開発を試みた。

II 材料と方法

A 材料

本研究で使用したプラスミドは、汎用性プラスミドである pUC19（タカラバイオ）、pBR322（タカラバイオ）と本研究室で作製した pGFP-*phoN*（笠原 2020）である。また、それらのプラスミドに対するプライマー 12 種類（表 2）をマクロジェン・ジャパン（東京）に外注し作製した。

表 1 各教科書で使用されている DNA サイズマーカーについて

教科書	第一学習社 (吉里ら 2018)	数研出版 (嶋田ら 2018)	啓林館 (本川ら 2018)	東京書籍 (浅島ら 2018)	実教出版 (庄野ら 2018)
内容	実験	探究活動	観察 & 実験	実験	実験
テーマ	ADNA の制限酵素による切断と電気泳動	PCR法を用いたイネの品種判別	DNAを増やそう	DNAの切断と電気泳動	電気泳動の目的としくみ
DNA サイズマーカーの表記と種類	DNA マーカー 0.25 kbp - 10 kbp	DNA マーカー 0.25 kbp - 10 kbp	DNA 分子量マーカー 200 bp - 1000 bp	マーカー φX174 HaeIII で切断したもの 118 bp - 1353 bp	マーカー-DNA サイズ不明

* 兵庫教育大学大学院教育実践高度化専攻理数系教科マネジメントコース 教授

令和 3 年 7 月 16 日受理

** 兵庫県立青雲高等学校

表2 本研究で使したプライマー一覧

プライマー名	配列 (5'→3')	塩基数(mer)	Tm値
Amp-Fw	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGT	23	57.5
Amp-100Rv	CATCTTTTACTTTTACCAGCGT	22	58.4
Amp-200Rv	ATCATTGGAACGTTCTTCGG	22	58.4
Amp-300Rv	CAAGTCATTCTGAGAATAGTGTA	23	57.5
Amp-400Rv	TGGCCGACGTGTTACTACT	19	57.3
Amp-500Rv	AGCTCCGGTCCCAACGA	18	58.4
Amp-600Rv	AGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC	21	59.4
Amp-700Rv	CAGATTTATCAGCAATAAACAG	23	57.5
Amp-800Rv	GTTGCCTGACTCCCGCT	17	57.2
Amp-900Rv	ATCAATCTAAAGTATATAGAGTAAAC	27	57.7
Amp-1000Rv	ACGCTCAGTGAACGAAAC	20	58.4
Amp-1500Rv	CTCTCCTGTTCCGACCT	18	58.4

B 方法

pUC19 のアンピシリン耐性遺伝子 (β -ラクタマーゼ遺伝子) の 5' 端に対応するフォワード (Fw) プライマーを設計した。そこから 100 bp おきに 1000 bp までと 1500 bp に対応する 11 種類のリバース (Rv) プライマーを設計した。これらのプライマーの Tm 値 (Melting Temperature) が約 57°C から約 59°C になるようにプライマーの長さを調整した。作製したプライマーの位置を図 1 に示す。

作製したプライマーが機能するかどうか PCR により確認した。PCR には 2 種類の酵素を使用した。一つは高等学校での利用を考慮に入れ価格が安い Taq Premix (バイオアカデミア) を、もう一つは、高等学校での

手動 PCR を視野に入れて増幅時間が速い SapphireAmp Fast PCR Master Mix (タカラバイオ) を使用した。PCR の反応液量は 50 μ L, 反応組成は酵素説明書に記載のとおりとした。PCR の反応条件については図 2 に示す。また, PCR 装置は Program Temp Control System PC-818 (ASTEC) と TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ) の 2 台を使用した。

PCR 産物の確認は, 2% アガロースゲル電気泳動法で行った。ゲルの作製には, アガロース ME (中電気浸透) (ナカライテスク) を使用し, 泳動バッファーは x 50 TAE (ニッポンジーン) を 100 倍希釈して使用した。PCR 産物 5 μ L にミドリグリーンダイレクト (日本ジェネティクス) を 2 μ L 加え電気泳動に供した。その際, DNA サイズマーカーとして, 100 bp DNA Ladder (バイオアカデミア) を使用し比較を行った。

また, PCR 後の増幅した DNA の精製は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) を用いて行っ

A Taq Premix

94 °C 1 min.
98 °C 10 sec.
55 °C 30 sec.
72 °C 1 min. } 30 cycles

B SapphireAmp

94 °C 1 min.
98 °C 5 sec.
55 °C 5 sec.
72 °C 10 sec. } 30 cycles

図2 PCR の反応条件

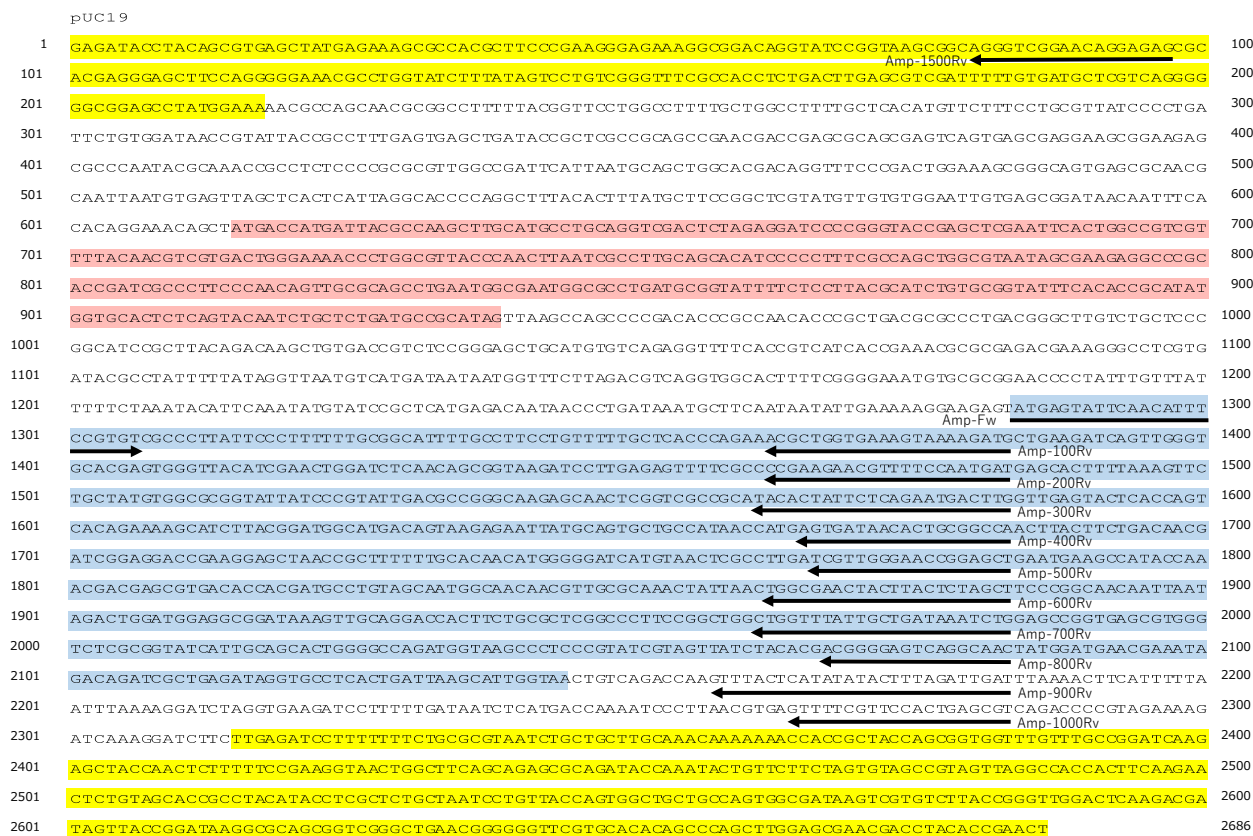


図1 プラスミド pUC19 の塩基配列と設計したプライマー領域

黄色の領域は複製起点 (ori), 桃色の領域は *lacZ- α* , 水色の領域はアンピシリン耐性遺伝子 (β -ラクタマーゼ遺伝子) を示す。矢印は各プライマーを示す。

た。精製した DNA の濃度は、分光光度計 ND-1000 (NanoDrop) で OD_{260} を測定し、その値から計算 ($OD_{260} 1 = 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$) により算出した。

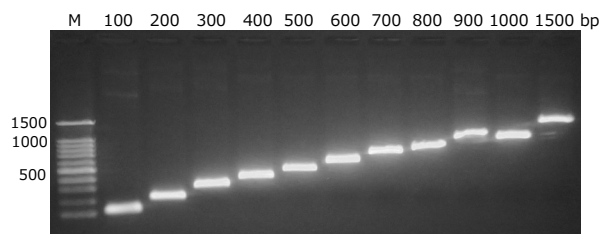
作製した DNA サイズマーカーは、500 bp のみ 100 ng とし、残りの 10 種類 (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1500 bp) を各 50 ng とするよう混合した。

III 結果

(1) PCR 法による 100 bp ごとの DNA 断片の増幅について

pUC19 のアンピシリン耐性遺伝子 (β -ラクタマーゼ遺伝子) の領域および複製起点の領域にわたってプライマーを設計した (図 1)。これらのプライマーが機能するかどうかを 2 種類の PCR 酵素を使って確かめた。2 種類の酵素ともに、目的の長さの DNA 断片が増幅された (図 3)。ただし、SapphireAmp の方には少し長い断片が見られた。

(A) Taq Premix



(B) SapphireAmp

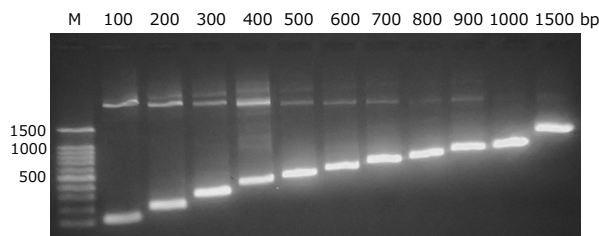


図 3 2%アガロースゲル電気泳動法による PCR 増幅産物の確認

(2) 汎用性プラスミドを用いた場合の DNA 断片の増幅について

今回使用した pUC19 は全長が約 2.6 kbp と短く大腸菌内でのコピー数が多くなるため、汎用性のプラスミドとしてよく使用されている。このプラスミドのアンピシリン耐性遺伝子 (β -ラクタマーゼ遺伝子) の領域および複製起点の領域は、pBR322 などの他のプラスミドにも存在している。そのため、この領域で設計したプライマーは、PCR の際に鋳型にできるプラスミドが多数存在する。どのような鋳型を使っても目的の断片が増幅するかどうか、全長の異なる pBR322 (約 4.3 kbp), pGFP-phoN (約 4.3 kbp) を使って確かめた。PCR は Taq Premix の酵素を使用し、200 bp, 500 bp, 1000 bp, 1500 bp の DNA 断片を増幅させた。その結果を図 4 に示す。ど

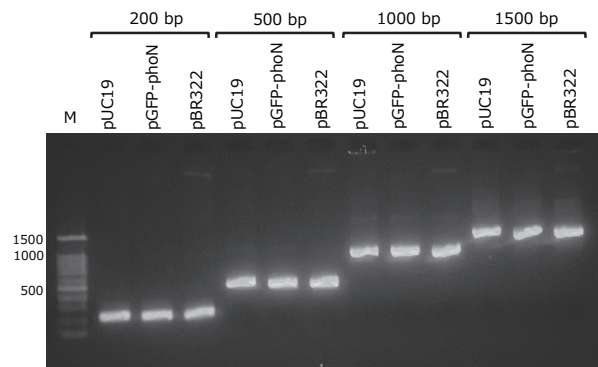


図 4 2%アガロースゲル電気泳動法による長さの異なるプラスミドを鋳型とした場合の PCR 増幅産物の確認

表 3 PCR での増幅後に精製した DNA の収量

サイズ	1回目(ng)	2回目(ng)	合計 (ng)	濃度(ng/ μL)
100 bp	782	1064	1846	31
200 bp	1183	1394	2577	43
300 bp	1248	2368	3616	60
400 bp	1419	2899	4318	72
500 bp	1773	3298	5071	85
600 bp	2502	3589	6091	102
700 bp	1805	3260	5065	84
800 bp	1320	2786	4106	68
900 bp	816	2226	3043	51
1000 bp	1526	3158	4685	78
1500 bp	1282	2331	3613	60

のプラスミド DNA を鋳型としても、目的の長さの断片が増幅できた。

(3) 作製した DNA サイズマーカーの性能について

pUC19 を鋳型として、酵素は Taq Premix を使用し、2 回の PCR を行った。DNA 断片の増幅後、精製した DNA の収量を測定した。その結果を表 3 に示す。1 回目と 2 回目では PCR 装置が異なる。100 bp の断片の収量が最も少なかった。そして、600 bp の収量が最も多かった。

測定した DNA 濃度を基に 500 bp のみ 100 ng とし、残りの 10 種類を各 50 ng とするよう混合し DNA サイズマーカーを作製した。作製した DNA サイズマーカーが市販の DNA サイズマーカーと比べて支障がないかどうか電気泳動で確認した。市販の DNA サイズマーカーと比べたところ、移動度もバンドの濃さについてほとんど変わらなかった。このことから、マーカーとして十分使用できることが確認できた (図 5)。

IV 考察

高等学校での分子生物学実験の普及のためには、できるだけコストがかからないような実験系の開発が必要である。高等学校「生物」のほとんどの教科書には DNA の電気泳動実験が掲載されている (表 1)。この実験は分子生物学の実験としては基本的なもので、PCR 後にも必ず行われる実験である。DNA の長さを DNA

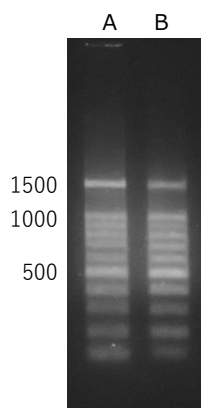


図5 市販の DNA サイズマーカーと作製した DNA サイズマーカーとの比較

A: 市販の DNA サイズマーカー, B: 本研究で作製した DNA サイズマーカー

サイズマーカーとの比較で推定するもので、この実験には必ず DNA サイズマーカーが必要となる。この DNA サイズマーカーには、多くの種類があり販売されているが安価なものではない。そこで本研究では、汎用性プラスミドを用いて簡単に目的の長さの DNA サイズマーカーを作製することを考案した。

高等学校での利用を考慮に入れ価格が安い PCR 酵素と、高等学校での手動 PCR を視野に入れて増幅時間が速い PCR 酵素を使用した。どちらも目的の DNA 断片の増幅は見られたことから、教育現場の実践目的に適した方を使うことが可能である。ただ、今回の実験では全て同じ条件で DNA を増幅させたため、増幅時間が速い PCR 酵素を使った場合、短い DNA 断片の増幅時に目的外の長い DNA 断片が少し見られた。これについては伸長時間を検討することで減らすことができると考えている。

また、鋳型 DNA として pUC19 と同じ複製起点を持ちアンピシリン耐性遺伝子 (β -ラクタマーゼ遺伝子) を持つプラスミドであれば、どの DNA を鋳型にしても増幅可能であることが確認できた (図4)。このことは、鋳型 DNA としてのプラスミドの選択の幅が広がり、教育現場で保持しているプラスミド DNA を使用できる可能性が高いと考えられる。

作製した DNA サイズマーカーは、市販のものと比べても支障はなく十分機能することが確認できた (図5)。この DNA サイズマーカーの利点は、電気泳動で確認したい DNA 断片の長さに合わせて、必要な長さのみの独自の DNA サイズマーカーを作製できる点である。

今後、この考案した DNA サイズマーカー作製法が高価な PCR 機器を使わず手動 PCR で可能になるように検討し、教育現場への普及を促進させたい。

V 引用文献

1. 浅島誠 他 27 名 (2018) 改訂生物. 東京書籍. 平成 29 年検定.
2. 濱田由鶴, 日詰雅博, 向平和, 中村依子 (2017) PCR 法による DNA マーカーを用いたファストプランツの遺伝実験. 生物教育. 59(1):26-29.
3. 向陽康人, 山本将也, 笠原恵 (2020) 兵庫県高等学校における分子生物学実験の実態に関する一考察: アンケート結果から見たこと. 兵庫教育大学学校教育学研究. 33: 121 -128.
4. 笠原恵 (2020) 高等学校生物における形質転換実験用プラスミドの開発. 兵庫教育大学研究紀要. 57: 157-162.
5. 文部科学省 (2019) 高等学校学習指導要領 (平成 30 年告示) 解説理科編理数編. 実教出版.
6. 本川達雄 他 17 名 (2018) 生物改訂版. 啓林館. 平成 29 年検定.
7. 大井真菜, 水口智人, 夏厩悠斗, 小川唯菜, 三宅崇 (2019) 高等学校生物における安価かつ簡易的な PCR 法の開発. 生物教育. 61(1):23-30.
8. 嶋田正和 他 22 名 (2018) 改訂版生物. 数研出版. 平成 29 年検定.
9. 園山博 (2020) 1 授業時間内でできる制限酵素の働きを理解するための実験教材の開発. 理科教育学研究. 61(1):167-173.
10. 庄野邦彦 他 19 名 (2018) 生物新訂版. 実教出版. 平成 29 年検定.
11. 吉里勝利 他 20 名 (2018) 高等学校改訂生物. 第一学習社. 平成 29 年検定.