

メダカの DNA 分析実験キット

母親はどっち？

生物教育研究所 研究員 西郷 孝
 (名城大学農学部生物資源学科 非常勤講師
 愛知淑徳大学健康医療科学部 非常勤講師)

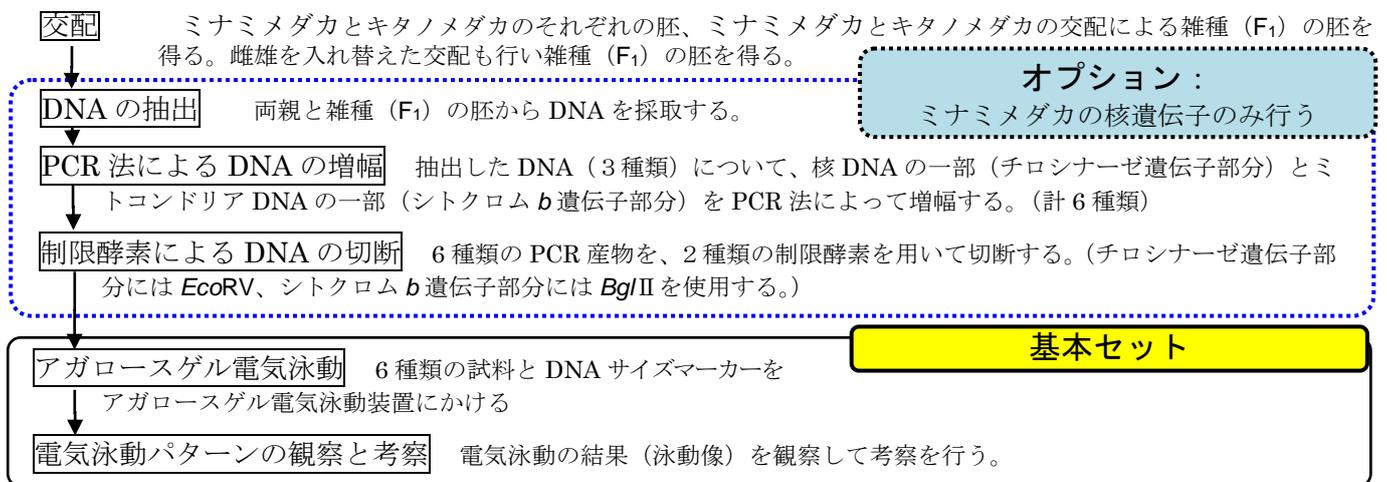
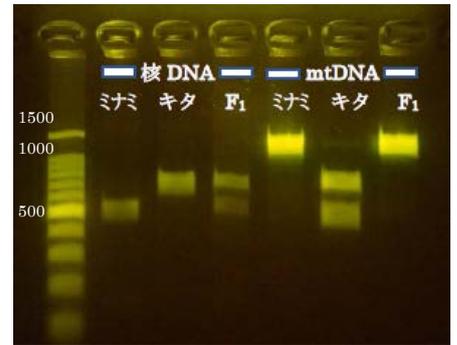
はじめに

PCR、制限酵素処理、アガロースゲル電気泳動は、DNA を取り扱う基本的な実験操作である。マイクロピペットや電気泳動装置などの機器を保有している学校も増えてきたが、十分に活用されていないことも多い。「メダカの DNA 分析実験キット」は、ミナミメダカとキタノメダカ、および両者の雑種の胚を材料にして、DNA を取り扱う基本的な実験操作を体験するものである。

「電気泳動のみ実施したい」という希望が多いので、これを「基本セット」とし、DNA の抽出、PCR、制限酵素処理は「オプション」として、実施校のリクエストに応じてアレンジして試料等を提供している。

概要

日本には、キタノメダカ *Oryzias sakaizumii* とミナミメダカ *Oryzias latipes* の2種のメダカが生息している (キタノメダカの記載は 2011 年)。この2種は交配可能であり雑種もできるが、雑種には♀ミナミメダカ×♂キタノメダカの場合と、♀キタノメダカ×♂ミナミメダカの場合がある。ミナミメダカとキタノメダカでは、核とミトコンドリアで DNA の塩基配列が異なっている部分があるので、DNA を抽出して、核とミトコンドリアの DNA の一部を PCR 法で増幅させて制限酵素処理を行うと異なるサイズの DNA 断片が得られる。これらの DNA 断片をアガロースゲル電気泳動して得られるバンドの比較から、DNA を採取した「雑種メダカ」の母親が、ミナミメダカなのかキタノメダカなのか(「母親はどっち?」)を判定することができる。



キットを使った生徒の感想の例

- ・問題集や授業でならったことが、実験をやってみてより分かるようになった。
- ・教科書でみて、実際に実験をやってみることで、電気泳動のイメージがしやすくなった。
- ・高価な器具を慎重に扱うことの大事さ、少し失敗するだけきちんとした結果がでないことがよくわかった。
- ・実際に DNA を目に見える形で見たのははじめてなので、興味深かった。
- ・この実験を通して、「DNA=複雑で難しい」から「意外と身近なもの」と思えるようになった。
- ・核にある DNA とミトコンドリアにある DNA の遺伝様式が違うことが、自分で見比べて確認することができた。

キットを使った教員の感想の例

- ・それぞれの生徒が、普通の高校ではできないことをやったという満足感にあふれていました。
- ・電気泳動を実際に見ることでよく分かったという感想ばかりでした。
- ・貴重な体験を生徒にさせることができましたこと、心から感謝致します。
- ・実験はまずまずうまくいきました。メダカについて、実験操作についての説明を行い、実際の実験操作、電気泳動をセットしてから待っている間に、制限酵素で切ることができる断片と塩基対の数をカウントしているうちに、ちょうど電気泳動が終わり、結果をトランスイルミネーターで見るという流れでちょうど 65 分が過ぎました。(基本セット)

学校で準備するものと提供するもの

基本セット 生徒用実験マニュアル付き

◎学校で準備するもの (場合によっては貸し出しや提供できるものもあります。要相談)

[全体] 小型遠心機 (スピンドウン用)、ボルテックスミキサー、電気泳動装置、ゲルメーカー、電子レンジ、青色 LED トランスイルミネーター (自作も可能)

試薬等: アガロース (0.3g×班)、TAE バッファー (ゲル作成用、泳動槽 300mL)、パラフィルム
[各班] 20μL マイクロピペット、ピペットチップ (チップケース入り)、50mL ビーカー、ペトリ皿

◎キットとして提供するもの

[各班] すべて 0.2mL チューブに入れて班ごとに袋に入れて分けてあります。

DNA 断片 6 種 メダカ胚から抽出した DNA を PCR で増殖し、制限酵素処理したもの
ミナミメダカ

(H_T: プライマー TyrF/R / EcoRV 処理)

(H_c: プライマー CytbF/R / BglII 処理)

キタノメダカ

(K_T: プライマー TyrF/R / EcoRV 処理)

(K_c: プライマー CytbF/R / BglII 処理)

雑種メダカ

(X_T: プライマー TyrF/R / EcoRV 処理)

(X_c: プライマー CytbF/R / BglII 処理)

DNA サイズマーカー (DNA ladder)、

DNA 染色液 (UltraPower DNA SafeDye 希釈液 オレンジ色) ローディング・ダイ (緑色)、

オプション (基本セットに加えて必要なもの)

生徒用実験マニュアルも提供いたします。

◎学校で準備するもの (場合によっては貸し出しや提供できるものもあります。要相談)

[全体] 小型遠心機 (高速のものが望ましい)、98℃ ブロックヒーター、サーマルサイクラー、65℃・37℃ 恒温槽、ベッスル、フロート、クラッシュアイス (氷上のアルミブロックでも良い)

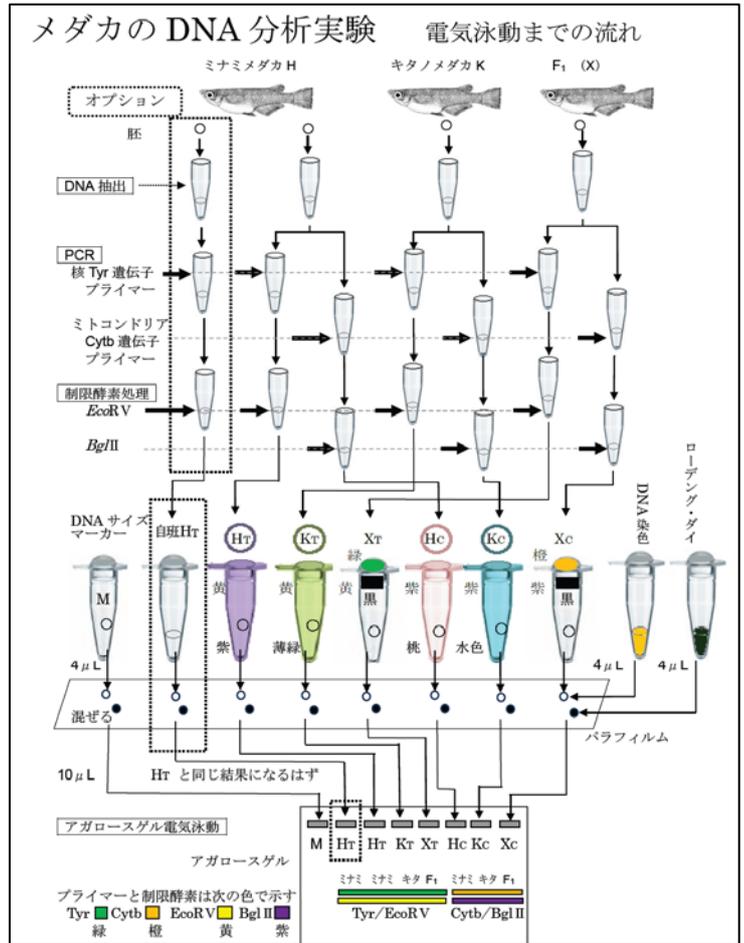
◎キットとして提供するもの

[各班] 胚は 1.5mL チューブ、試薬はすべて 0.2mL チューブに入れて班ごとに袋に入れてあります。

DNA の抽出 DNA 抽出液: QuickExtract ミナミメダカの胚 (アルコールで固定済み)

PCR PCR ミックス: KOD FX Neo (ポリメラーゼとヌクレオチド) プライマー: TyrF/R

制限酵素処理 EcoRV (黄色チューブ)



実験手順

オプション I 胚からの DNA の抽出

- ① メダカの固定済みの胚が 1 個ずつ入った 1.5mL マイクロチューブに班番号を書く。
- ② QuickExtract DNA Extraction Solution を 50μL 加え、ベッスルで胚を十分につぶす。
- ③ 蓋をしてボルテックスミキサーで 15 秒間内容物を十分攪拌する。
- ④ 小型遠心機にかけて、内容物をチューブの下部に集める。
- ⑤ チューブをフローターにさして 65℃ のウォーターバスに浮かべ、10 分間保温する。
- ⑥ ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌して内容物をよく混ぜる。攪拌後はスピンドウンする。
- ⑦ チューブをブロックヒーターのアルミブロックに入れ、98℃ で 2 分間保温する。
- ⑧ ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌して内容物をよく混ぜる。攪拌後はスピンドウンする。
- ⑨ 98℃ のブロックヒーターでさらに 2 分間保温したのち、氷上で温度を下げる。
- ⑩ 15,000 回転で 2 分間遠心する。
- ⑪ 上清 (DNA が溶けている部分) をマイクロピペット (10 μL にセット) で 10 μL 量り取り、0.2mL チューブ (蓋が赤色の印) に入れる。

オプション II PCR 法による DNA の増幅 (手動 PCR で行うことも可能)

- ① 蓋が緑色の PCR チューブ (プライマーが 2 μL 入っている) の記入スペースに班番号をマーカーで記入し、スピンドウンする。(以降の操作はすべて氷冷下で行うのが望ましい)

- ② PCR ミックスの入っているチューブ（無印のもの）とミナミメダカ DNA（鋳型）の入ったチューブをそれぞれスピンドウンする。
- ③ PCR ミックスの入っているチューブ（無印のもの）の内容物をピペットで全量（16 μ L）取って、ミナミメダカ DNA の入った赤色印チューブに入れてスピンドウンする。
- ④ ピペットのメモリを 18 μ L にセットし、PCR ミックスとミナミメダカ DNA の入ったチューブ（赤色印）の内容物を全量（18 μ L）プライマーの入ったチューブ（緑印）に入れる。
- ⑤ チューブの蓋を閉めスピンドウンし、ボルテックスミキサーで攪拌した後、再びスピンドウンする。
- ⑥ 蓋がしっかりと閉まっていることを確認し、軽くボルテックスミキサーで混ぜ、軽く遠心（スピンドウン）する。（小型遠心機が 1.5ml マイクロチューブ用の場合、PCR チューブを遠心する時にはアダプターを装着して遠心する。アダプターは 1.5ml マイクロチューブの蓋を切り取ったもので代用できる。）
- ⑦ サーマルサイクラーにセットする。（サンプルブロックに順番にしっかりと押し込んで入れる。）
- ⑧ サーマルサイクラーに、次のプログラムをセットし、スタートさせる。終了するのに 75 分ほどかかる。途中で、サーマルサイクラーのディスプレイの部分を見ると、現在どの段階であるかが分かる。
94°C 2分 → (98°C 10秒, 64°C 30秒, 68°C 30秒) 25回 → 68°C 3分 → 4°C ∞

オプション III 制限酵素による DNA の切断

- ① 制限酵素（EcoRV）の入ったチューブ（黄色印）に、PCR 産物を 4 μ L 入れる。微量なのでチップの先をチューブの内壁面につけて出して、PCR 産物が確実にチューブに入ったことを確認するとよい。（水玉ができる）。
- ② チューブの蓋を閉め、スピンドウンする。
- ③ 蓋をしてボルテックスミキサーで攪拌し、小型遠心機でスピンドウンする。
- ④ フロートにさして、37°C の恒温槽に浮かべ、1 時間反応させる。
ここまでの処理で得た試料 H_T を、他の試料に加えてアガロースゲル電気泳動で用いる。

基本セット・オプション IV アガロースゲル電気泳動

- まず、各チューブをスピンドウンしてチューブラックに順番に並べる。
- ① 2cm 程度の幅に切ったパラフィルム上にマイクロピペットで DNA 染色液を 4 μ L 取り 8 つの液玉を作る。それぞれの液玉の近くにローディング・ダイを 4 μ L 取り液玉を作る。
- ② サイズマーカー、DNA サンプル（H_T、K_T、X_T、H_c、K_c、X_c の順）を 4 μ L ずつ量り取り、DNA 染色液とローディング・ダイの液玉を混ぜる（ピペッティング）。（ピペットの先をパラフィルムに強く押しつけると穴が開いてしまうので注意する） **オプション** 自班で処理した H_T をサイズマーカーと H_T の間に挿入する。
- ③ 作成したアガロースゲルをトレイごとプラスチック製のペトリ皿に取り出し、TAE バッファーをウェル（くぼみ）が液に浸かるまで入れる。
- ④ ゲルのウェル（くぼみ）のある方を上にして、ウェルの左から順に、サイズマーカー、サンプルを 10 μ L ずつ入れる。このとき、マイクロピペットを片手で取り扱うのではなく、チップの上のピペットの部分に他方の手の指を添えて、チップの先がしっかりとウェルの中に入るようにする。チップの先端が確実にウェルに入っていることを確認してから内容物を出すこと。また、チップを奥まで入れすぎてゲルを突き抜けることがないように注意する。このとき、2ndSTOP まで押し込まなくてもよい。
- ⑤ 電気泳動装置にアガロースゲルをトレイごとセットする。アガロースゲルのウェルが電源ユニット側にあることを確認する。（小型のゲルの場合、同時に 2 枚セットできる。）
- ⑥ 電気泳動槽にゲルが十分に浸かるように TAE バッファーを入れる。
- ⑦ 電源ユニットを取り付け、泳動槽にフタをする。
- ⑧ 泳動方向を確認し（DNA は + 極に向かって移動する）、電圧を 100V にセットしスイッチを入れる。
- ⑨ 20 分経過したら電気泳動装置のスイッチを切り、コンセントを抜く。

基本セット・オプション V 電気泳動像を見る

- ① ゲルをトレイから離し、ディスプレイペトリ皿に移す。
- ② トランスイルミネーターの電源スイッチを ON にして、青色面にペトリ皿をのせ、オレンジ色のフィルターを通して電気泳動像（バンド）を観察する。（電気泳動像をデジタルカメラ等で撮影する）

考察

- ① **オプション** 電気泳動像から、自班が作成した試料が正しく作られていたか確認する。もし、うまくいかなかった場合には、原因としてどのようなことが考えられるか。
- ② H_T、K_T、X_T の電気泳動パターンを比較して、核遺伝子はどのように子に伝わると考えられるか。
- ③ H_c、K_c、X_c の電気泳動パターンを比較して、ミトコンドリア遺伝子はどのように子に伝わると考えられるか。
- ④ 実験に使った F₁ (X) は、♀キタノメダカ × ♂ミナミメダカによるものなのか、♀ミナミメダカ × ♂キタノメダカによるものか。そのように判断した根拠を示せ。

参考資料

関連部分の DNA 塩基配列データ

■ は制限酵素認識配列

PCR で増幅した核遺伝子(チロシナーゼ遺伝子)領域の塩基配列 (EcoRV で切断)

ミナミメダカ

```
TTTGTCTGCC GTTCTGCTGC AGTTCTTTGA GACTTGTGG AGCCAGTTTC CTCGCCCTG TGCCAATTCA GAGGGACTGC GAACCAAGGA GTGCTGTCCA GTGTGGAGTG GAGATGGCTC ACCCTGTGGG GCCCTGTCTG
TTCGCGGGTT CTGTGCAGAC GTCTCGGTTT GACAGCAGCC CAACGGGGCG CAGTACCCTC ACAGCGGGAT CGATGACAGG GAGCGCTGGC CTTTAGCTTT CTTCAACCGG ACGTGTCTGT GTGCAGGAAA CTATGGAGGG
TTAACTGTG GGGAAATGCAG ATTCGGTTAC TGGGGCTCCA ACTGTGCTGA GTACAGAGAG TCAGTGCAGG GGAACATCAT GAGCATGTCA ACTACTGAGC AGCAAAAGTT CATCTCTTAT CTAACACCTGG CCAAAAACAC
CATCAACCCA GACTACTGTA TCACCACAGG CACAAGAGCA GAGATGGGAG AGAACGGTGA GAGCCCCATG TTCTCTGACA TCAACACCTA CGACCTATTT GTCTGGATAC ACTACTACGT GTCCAGAGAC ACCTTCTTGG
GAGGGCCTGG GAATGTTGG AGA GATATC ATTTTGCCCA CGAGTCTGCT GCATTTCTCC CCTGGCACAG AGTCTACCTG CTTCACTGGG AGCAGGAGAT ACGCAAAATC GCAGGAGATT TTAACCTTAC CATCCCGTAC
TGGGACTGGA GGGATGCCA GTCCTGTGAA GTCTGCACTG ATAATCT GAT GGGTGGACGT AACGCC 766bp
```

キタノメダカ

```
TTTGTCTGCC GTTCTGCTGC AGTTCTTTGG GACTTGTGG AGCCAGTTTC CTCGCCCTG TGCCAATTCA GAGGGACTGC GAACCAAGGA ATGCTGTCCA GTGTGGAGTG GAGATGGCTC ACCCTGTGGG GCCCTGTCTG
TTCGCGGGTT CTGTGCAGAC GTCTCGGTTT GACAGCAGCC CAACGGGGCG CAGTACCCTC ACAGCGGGAT CGATGACAGG GAGCGCTGGC CTTTAGCTTT CTTCAACCGG ACGTGTCTGT GTGCAGGAAA CTACGGAGGG
TTAACTGTG GGGAAATGCAG ATTCGGTTAC TGGGGCTCCA ACTGTGCTGA GTACAGAGAG TCAGTGCAGG GGAACATCAT GAGCATGTCA ACTACTGAGC AGCAAAAGTT CATCTCTTAT CTAACACCTGG CCAAAAACAC
CATCAACCCA GACTACTGTA TCACCACAGG CACAAGAGCA GAGATGGGAG AGAACGGTGA GAGCCCCATG TTCTCTGACA TCAACACCTA CGACCTATTT GTCTGGATAC ACTACTACGT GTCCAGAGAC ACCTTCTTGG
GAGGGCCTGG GAATGTTGG AGAGATATTG ATTTTGCCCA CGAGTCTGCT GCATTTCTCC CCTGGCACAG AGTCTACCTG CTTCACTGGG AGCAGGAGAT ACGCAAAATC ACAGGAGATT TTAACCTTAC CATCCCGTAC
TGGGACTGGA GGGATGCCA GTCCTGTGAA GTCTGCACTG ATAATCT GAT GGGTGGACGT AACGCC 766bp
```

PCR で増幅したミトコンドリア遺伝子 (シトクロム b 遺伝子) 領域の塩基配列 (Bgl/II で切断)

ミナミメダカ

```
AGGACCTGTG GCTTGAAAA CCACTGTTGT ATTCAACTAC AAGAACTTAA TGGCAACCT TCGAAAAACC CACCCCTGT TAAAAATTGC AAACGATGCT CTAGTTGACC TTCCAGCCCC TTCGAACATT TCAGTTTGTAT
GAAACTTTGG TTCTCTTCTC GGACTTTGTT TAGCCGCCCA AATCATCAG GGCCTTTTTT TTGCCATACA TTATACATCC GACATCGCCA CAGCATTCTC ATCAGTTGCA CACATCTGCC GGGATGTTAA CTACGGCTGA
CTAATCCGGG ATATACATGC AAACGGCGCT TCTTTTTTCT TCATCTGCAT TTACCTTCAC ATTGGGGGAG GCTTGTACTA CGGATCTCAC TTATACAAGG AAACATGAAA TGTCTGGTGA ATCTCTTCTC TACTAGTAAT
AATAACGGCT TTCGTAGGTT AGTTTTTACC CTGAGGACAA ATATCATTCT GAGGAGCCAC TGTAATCACC AACCTCTGTG CTGCGCTCCC TTACGTTGGC AAGCCCTCG TCCAATGAAT TTGAGGAGGA TTTTCACTAG
ATAACGCCAC ACTTACCCGA TTCTTTGCCT TCATTTTCTC CTTCCCTTCT GTAATTGCGG CCGCAACAGT TGTTTCACTA ATTTTTTCTC ACGAAACAGG TTCAAAACAC CCAACCGGCC TCAATTCAGA CCCCAGACAA
GTCTCTTCCC ACCCTTACTT TTCTATAAAA GACCTTTTGT GGTTTGCTGC CTTGCTAGTA GCCTTAATTT CCCTGGGCTT TTTCTCCCC AACCTGCTTG GAGACCCAGA CAACCTTACC CCGTCCCAACC CGCTAGTTAC
TCCCTCTCAC ATCAAGCCTG AATGATACCT CCTATTTGCC TACGCCAATT TCGATCAAT TCCAAATAAA CTTGGAGGGG TCCTAGCCCT ATTAGCCTCT ATCTAGTAC TATTCCTGGT CCCTATCCTA CACACCTCTA
AACACGAAG CCTTACGTTT CGACCTTTCA CCAAATTCCT TTTCTGACTC CTAGTAGCAG ACGTGATGGT TTTAACTGTA ATTGGCGGAA TGCCCGTAGA ACACCCATT ATTATCATTG GTCAAAATCGC ATCTTTTCTT
TATTTTTCCC TCTTTCTTAT TATAGACCA GCGCGGGGAT GACTAGAAAA TAAAGTCTTA AAATGACAAT GCACGAGAA GCTCAATTGTA AGAGCAC CGG TCTTGTAAWY CGRRRTGCR A 1241bp
```

キタノメダカ

```
AGGACCTGTG GCTTGAAAA CCACTGTTGT ATTCAACTAC AAGAACTTAA TGGCAACCT TCGAAAAACC CACCCCTAT TAAAAATTGC AAACGATGCT CTAGTTGACC TTCCAGCCCC TTCAACATC TCAGTTTGTAT
GAAACTTTGG TTCTCTTCTC GGGCTTTGTT TGGCGGCCA AATCGTACA GGCCTATTTC TTGCCATGCA CTATACATCT GATATTGCA CAGCATTCTC ATCAGTGCAC CACATCTGCC GGGACGTTAA CTACGGCTGA
CTAATCCGTA ATATGATGC AAACGGCGCT TCTTTTTTCT TCATCTGCAT CTATTGTCAC ATTGGTGCAG GCTTATACTA TGGTCTCTAC TTATACAAGG AAACATGAAA CGTTGGTGT ATTCTTCTC TGCTTGTAA
AATAACAGCT TTCGTAGGCT ATGCTCACC CTGAGGACAA ATATCATTCT GGGGGGCCAC TGTAATTACC AACCTGCTGT CTGCTGCTCC TTACATTGGC AAGCCCTCG TCCAATGAAT TTGGGGAGGG TTTTCACTAG
ATAATGCCAC ACTCACCCGA TTCTTTGCTC TCCACTTCTC CTTCCCTTCT GTAATTGCGG CCGCAACAA TGTCCACTTA ATCTTCTTCC ACGAAACGGG CTCAAAACAC CCAACCGGCC TCAATTCAGA CTTGACAAA
GTCTCTTCTC ACCCTTACTT CTCTTATAAA GATCT TTTAG GCTTTGCTGC CTTGCTAGTA GCCTTGATTT CTCTGCACT ATTCTCCCC AACCTGCTTG GAGACCCGA TAACTTACC CCGTCAACC CATTAGTAA
CCCTCTCAC ATTAACCCG AATGATATT CCTATTTGCT TACGCTATC TACGATCAAT TCCAAACAAA CTTGGAGGGG TCCTAGCCTT ATTAGCCTCT ATCTAGTTC TATTCCTAGT CCCCATCCTA CACACATCCA
AACACGAGG CTAACATTT CGACCTTTCA CCAATTCCT TTTCTGACTC CTAGTAGCAG ACGTAATGGT TTTAACTGTA ATTGGTGTGA TGCCGTGAGA ACATCCCTTT ATTATCATCG GTCAAAATCGC ATCTTTTCTT
TATTTCTTCC TCTTTCTTGT TATAGACCA GCGCGGGGAT GACTAGAAAA TAAAGTCTTA AAATGACAAT GCACGAGAA GCTCAATTGTT AGAGCAC CGG TCTTGTAAWY CGRRRTGCR A 1241bp
```

謝辞

「メダカの DNA 分析実験キット」は、自然科学研究機構・基礎生物学研究所（愛知県岡崎市）バイオリソース研究室の成瀬清特任教授および竹花佑介研究員の指導により、2012年8月の平成24年度 SPP（サイエンス・パートナーシップ・プロジェクト）事業「モデル動物メダカの実験・観察～生殖行動・発生から遺伝子分析まで～」（AG120337）、2014年8月の「モデル動物メダカの実験・観察Ⅱ～生殖行動・発生・遺伝子分析～」（AG140264）で行われた実験をベースに、高等学校の授業で実施できるようにアレンジしたものである。ご指導・ご支援いただいた、成瀬清先生、竹花佑介先生（現 長浜バイオ大学）はじめ基礎生物研究所バイオリソース研究室の方々に深く感謝いたします。また、試料の提供を受けて高校で生徒実験を実施し、キットについての報告や提案をしていただいた先生方にも感謝いたします。

メダカの DNA 分析実験キット HP : <https://saigot.sakura.ne.jp/medaka>

連絡先 : 西郷 孝 msg@saigot.sakura.ne.jp



生物教育メーリングリスト Volvox ML 現在の会員・全国 160 名
メダカの DNA 分析実験の情報や生物教育に関するいろいろな情報交換(研究会の案内・報告、
教材生物の配布情報など)をしています。是非、ご参加下さい。

管理者: 生物教育研究所 西郷 孝 msg@saigot.sakura.ne.jp

<http://www.i-mate.ne.jp/~volvox/index.html>