

「ハイブリ先生®」実習報告～専門学校編～

東京テクニカルカレッジ バイオテクノロジー科

大藤 道衛先生

「ハイブリ先生®」を用いた PCR-DNA チップ解析を、実習科目「PCR 実習」に組み込み実施した。当該実習科目は、プライマーデザインの定石、PCR の非特異的増幅の排除方法（アニーリング温度の検討等）、PCR 産物解析での電気泳動（アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE））の分離能や検出感度（EtBr 染色、銀染色）を比較するとともに、PCR 法を用いた変異・多型スクリーニングなど PCR に関する基本的な技術を学ぶ科目である。本実習の履修学生は、基礎的な遺伝子組換え技術などを通じマイクロアッセイ、サザン・ハイブリダイゼーション、核酸およびタンパク質の電気泳動などを終了してから受講している。また、材料となるゲノム DNA は、学生自身の細胞から採取して用いることから、本実習は 20 歳以上の学生を対象とした選択科目である。本年の受講者は 9 名。

実験系は、培養がん細胞を用いた c-H-ras 遺伝子の変異検出（PCR-RFLP）、学生自身のゲノム DNA を用いた繰り返し配列（D1S80）ならびに SNP（ALDH2 遺伝子コドン 487）解析（PCR-RFLP）を用いた。

ゲノム DNA 抽出に先立ち、文部科学省、厚生労働省、経済産業省が合同で定めた倫理指針「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（三省指針）を解説、自らのゲノム DNA に含まれる個人遺伝情報を実験に用いるための同意書（図 1）を学生自身が記載することで、同指針の理解を確認したのち実験に入った。「ハイブリ先生®」の実験は、PCR-RFLP 解析による ALDH2 の SNP タイピングを予め行った後、2 日間アッセイを用いて実施した（図 2）。

【PCR実習ゲノム実験実施同意書】

私は、自分のゲノムDNAを用いた解析実験を行います。
講義により実験に関連した下記事項を理解いたしましたので記載いたします。

ヒトゲノムに個人遺伝情報が存在する理由：

1. D1S80配列, ALDH2 SNPについての説明:
D1S80配列:
2. ALDH2 codon 487 SNP:
3. PCR実験終了後、ゲノムDNA上にある個人情報の保護方法:

上記1～3を踏まえて、今後の「PCR実習」内容に関し、
 自分のゲノムDNAからD1S80, ALDH2 SNPを調べることに同意します。
 実験参加者に私のD1S80, ALDH2 SNPを知られることに同意します。
 自ら技能を学ぶ実験であり、結果の信頼性を問わないことに同意します。

日付:
署名:

図1 実験同意書

【事前講義・実験内容】

- 三省指針講義・実験同意書作製・PCR・ALDH2とSNP講義（180分）
- ゲノムDNA抽出（毛髪・口腔粘膜）（180分 含：実験原理講義）
- PCR-RFLPによるALDH2 codon 487 SNPタイピング（360分 含：PCR増幅・制限酵素処理・PAGE・実験原理講義）

【「ハイブリ先生®」実施スケジュール】

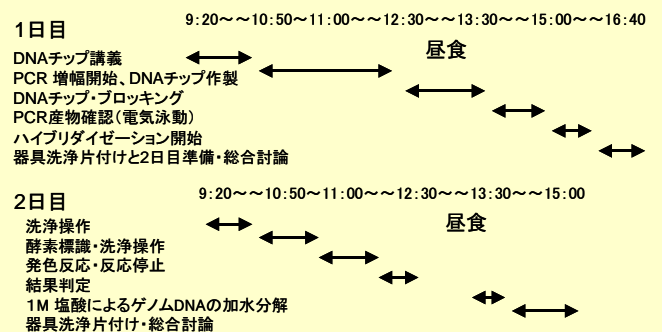


図2 DNA チップ実習実施スケジュール

【PCR 増幅の問題点】

「ハイブリ先生®」を用いた PCR 増幅では、毛髪より抽出したゲノム DNA を鋳型とした場合、PCR 増幅しない検体がいくつか見出された。これは、PCR 反応液に占める検体の容量が、RFLP 実験では 4%であるが、「ハイブリ先生®」では、約 30%に及ぶため不純物(特にメラニン色素)の影響が大きかったためと推定された(図 3)。増幅しなかった学生は、口腔内粘膜より抽出したゲノム DNA を用いて再実験を行った。

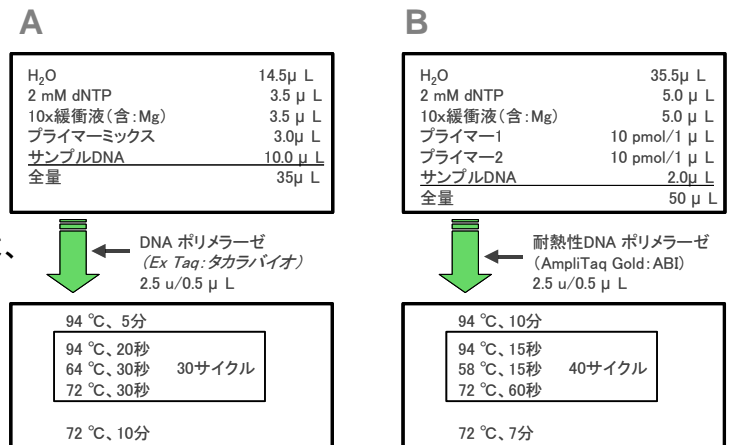


図 3 PCR 仕込みと反応条件

A: DNA チップ(「ハイブリ先生®」)用、B: RFLP 用

【「ハイブリ先生®」実験と考察】

アガロースゲル電気泳動にて PCR 増幅を確認できた検体を用いて、DNA チップ解析を行った。SNP タイプについて RFLP の結果と比較したところ、概して一致した結果が得られた(図 4)。しかし、一部に乖離した結果が得られたが、実施した学生自身の考察から RFLP もしくはチップ洗浄操作でのテクニカルな問題があることが考えられた。実験終了後、使用したゲノム DNA は、1M HCl にて加水分解することで個人遺伝情報を保護した上で、処分した。

本実習に「ハイブリ先生®」を加えることにより、今や遺伝子解析の基本技術となっている DNA チップを学べるとともに、ALDH2 の SNP タイピングを「制限酵素の特異性」ならびに「塩基配列の相補性」で解析することから、原理の異なる方法を用いて分析する「実験の定石」を学ぶことができる。

「ハイブリ先生®」は、チップ作りから解析までが手作業で実施できるため、専門学校での実験技術を学ぶ教育に充分活用できると考えられた(図 5)。

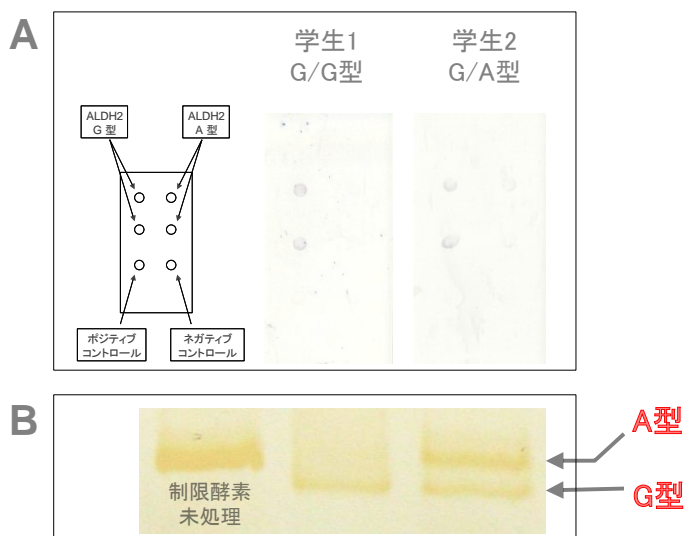


図 4 実施結果事例

A: DNA チップ(「ハイブリ先生®」)の結果

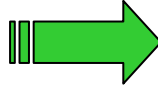
B: RFLP の結果

* 今回の実験では、DNA チップ、RFLP ともに A/A 型の事例は見られなかった。

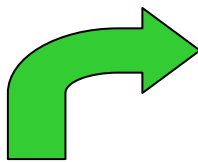
試薬調製



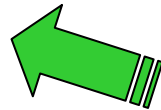
チップ作製



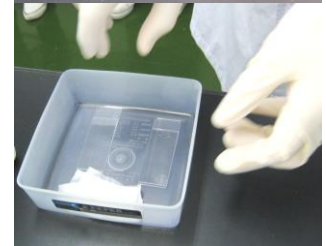
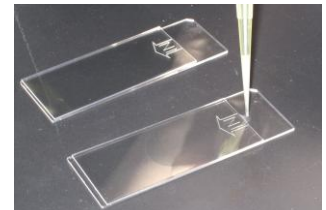
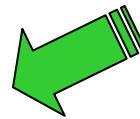
集合写真



発色と結果判定



洗浄操作



ハイブリダイゼーション
開始

図5 実験中のスナップショット

【本実験受講学生感想の一部】

- 自作のハイブリダイゼーション実験*に比べ、試薬の調製が簡単で容易に結果が得られた。(Aさん)・・・*当該学生は、通常のサザン・ハイブリダイゼーションを行っている。
- 研究現場で用いているDNAチップ実験がどのようなものであるか理解・体験できて非常に有意義だった。(Bさん)
- DNAチップで貴重な体験ができた。DNA解析の新たな切り口と思い、自分もこの分野に貢献したいと思った。(Cさん)
- 「ハイブリ先生®」は、簡単な実験でSNP判定がとても早く出せるので驚きました。(Dさん)
- 本格的なキットを使った実験は初めてでしたが、実験全体がとても手軽にできました。よく簡易化されていて感心しました。(Eさん)
- 「ハイブリ先生®」は簡単な操作で解析ができ、操作もわかりやすかったので、DNAチップやハイブリダイゼーションの仕組みが良くわかりました。(Fさん)

株式会社DNAチップ研究所
 〒105-0022
 東京都港区海岸1-15-1 スズエベイディアム5階
 TEL: 03-5777-1688 (技術サポートセンター)
 E-mail: dnachip-support@dna-chip.co.jp