

## 簡便な植物の遺伝子多型解析実験の検討

佐々木陽平,\* 南雲清二

## A Study of Plant DNA Polymorphism Experiments for Students

Yohei SASAKI\* and Seiji NAGUMO

Laboratory of Medicinal Plant Science, Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

(Received September 21, 2004; Accepted November 1, 2004)

Advances in molecular biology are being made in the fields of science, medicine, and pharmacy. The majority of students graduating from pharmaceutical university departments will be required to have knowledge of molecular biology techniques. Although it is not difficult to perform DNA experiments in a laboratory, they involve a series of operations. Therefore it is difficult to include such experiments in the curriculum for students at our university because of safety concerns and the experimental equipment and time required. This paper introduces a convenient experiment on plant DNA polymorphism using a polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism (PCR-RFLP) method that we developed. This experiment enables each student to handle DNA safely. Total DNA is extracted from a piece of leaf derived from *Aconitum carmichaeli* or *Aquilegia flabellate*, the nuclear 5.8S rRNA region is amplified by PCR, and the PCR product is digested by restriction enzymes. Different polymorphisms in the plants can be visualized on electrophoregrams. The total time required for the experiments is 2 days (about 4 h per day). In the field of pharmacognosy, authentication of herbal medicine using genetic analysis is increasingly important. Plant DNA polymorphisms required the same knowledge and techniques as genetic analysis and are part of the course content in medicinal plant science. The PCR-RFLP experiment proposed here is a suitable method to acquire molecular biological knowledge and techniques.

**Key words**—plant DNA polymorphism; convenient experiment; 5.8S rRNA gene; polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphisms; *Aconitum carmichaeli*; *Aquilegia flabellate*

## 緒 言

近年、分子生物学が急速に発展し、ヒトゲノムのような大量の塩基配列の解析や遺伝子操作技術による様々な遺伝子組み換え植物の作製が可能となった。さらに遺伝子増幅装置(サーマルサイクラー)、塩基配列解析装置(DNAシーケンサー)や関連試薬等の汎用化、低価格化により一般の研究室でも比較的簡単に遺伝子に関連した研究を行うことが可能になった。遺伝子は生物に共通した遺伝情報であるためその研究分野は幅広く、特定遺伝子配列による系統解析といった生物学的研究、遺伝子操作による優良農産物の開発といった農学的研究、遺伝子が関係した病気の診断や治療といった医学的研究等々がある。

生薬学、薬用植物学の分野でもこれら分子生物学

的手法を応用して、今日では生薬の基原同定に遺伝子解析が適用されるようになってきた。<sup>1-4)</sup>この同定法では、生薬中のDNAが加熱処理などで断片化している場合、DNAの抽出法、遺伝子領域の選択や遺伝子増幅反応条件等に工夫が要求されるという面もある。しかし同定に必要な植物材料のサンプル量が50—100 mgと少量での解析が可能であること、植物の生育段階及び生育環境による影響を受けないなどの利点も多く有している。いくつかの生薬では遺伝子解析による同定法が欠かせない方法として確立している。<sup>1-4)</sup>

以上のように、遺伝子解析による生薬の基原同定法は研究面や実用面で広く応用されてきたことから、これを大学の学部学生の実習に採用し、DNAを扱う基本技術として習得することは本法の生物学的応用の広さからも意義深いものと考えられる。多人数からなる薬学部の学生実習に本法を採用する場合、主として次の点が障害になる。まず生薬から

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を適用ができるほどの純度で DNA を抽出することに困難が伴う点である。現状では生葉から全 DNA を抽出するために CTAB 溶解法<sup>5)</sup>や塩析法,<sup>6)</sup> 市販のキットなどを採用している。しかしこれらの方法ではいずれも一連の操作に数日、一般的なキットでも通常数時間を要し、抽出した全 DNA の精製も必要になる。また液体窒素や高速回転能力を有する遠心分離器などが必要となり、学生実習における安全面や設備面、及び時間的制約の中での実施は困難が予想される。

本研究ではこれらの問題点を踏まえ、学生実習に採用できる生葉及び植物の遺伝子多型解析実験及び実施に伴う諸条件を検討した。検討するに当たり留意した点は次の通りである。

① DNA 抽出から遺伝子多型解析による原料同定まで、一連の実験ができること。

② 学生実習であることから確実な結果が得られるよう、DNA 抽出材料は生葉でなく植物とする。これは生葉中の DNA は断片化している場合があり、確実に DNA が抽出できるとは限らないためである。

③ 星薬科大学での学生数は 1 学年約 300 名であり、実習ではこれを 2 分割して 150 名で行う。150 名を 75 名ずつ 2 グループの実習とし、時間的制約から 2 日間 (1 日約 4 時間) で完了できる内容であること。

④ できるだけ大型、特殊な機器を使用しない。

⑤ DNA 抽出には市販の DNA 抽出キットを使用し、短時間でできる条件を検討する。

このような点を踏まえ、実習に適した植物の選定、増幅領域及び増幅条件の検討及び遺伝子多型解析法を検討した。

## 方 法

1. 実験材料 星薬科大学薬用植物園に栽培される *Aconitum carmichaeli* Debeaux (ハナトリカブ

ト) 及び *Aquilegia flabellata* Sieb. et Zucc. (オダマキ) を実験に用いた。

2. 機器及び試薬 一連の実験に使用した器具及び機器：マイクロピペッター (Nichipet EX NPX-1000, NPX-200, NPX-20, NPX-2)、遠心器 (パリソナマイクロ遠心器 MD-16N, MILLIPORE チビタン)、マイクロチューブ (1.5 ml BIO-BIK, 0.2 ml Thermo-Tube ABgene)。

3. 植物から全 DNA の抽出, PCR 法による核 5.8S rRNA 遺伝子領域の増幅及び電気泳動法による増幅産物の確認 ペーパーパンチで打ち抜いた植物の新鮮な葉、冷凍保存 (-20°C) した葉及びシリカゲルで乾燥した葉にキット (REDEExtract-N-Amp Plant, SIGMA) に添付されている Extraction Solution を加え沸騰水中 10 分加熱し、Dilution Solution を加えた。ついで、キットに添付されている REDEExtract-N-Amp PCR ReadyMix, 全 DNA 抽出液, 5.8S-5F (0.25 μM), 5.8S-5R (0.25 μM) 及び滅菌水を加え (全量 20.0 μl), 遺伝子増幅装置 (TaKaRa Dice) により増幅反応を行った。プライマー 5.8S-5F 及び 5.8S-5R は *Aconitum* 属植物の 5.8S rRNA 遺伝子領域の配列<sup>7)</sup>を基に設計した。プライマー (北海道システムサイエンス) の配列は Table 1 に、PCR の条件は Table 2 に示した。4% アガロースゲル (Agarose S, 和光) に PCR 後の反応液を直接入れ、サブマリン型電気泳動装置 (NIHON EIDO NC-1010, ISEP-1010) で泳動を行った (150 V, 10 min)。アガロースゲルにはあらかじめ Ethidium Bromide (和光, 生化学用) を加えておいた。泳動バッファーは 0.5% TAE バッファーを使用した。試薬は 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (和光, 生化学用), 酢酸 (和光, 特級), EDTA-2Na (DOJINDO) を使用し、分子量マーカー (AmpliSize Molecular Ruler 50—2000 bp Ladder, BIO-RAD) を同時に泳動した。泳動後、アガロースゲルをラップに包み、トランスイルミ

Table 1. Primers Used in This Study

Name	Sequence (5'→3')	Length (bp)	Tm <sup>a)</sup>	Tm <sup>b)</sup>
5.8S-5F	AAC GAC TCT CGG CAA CGG	18	69.1	58
5.8S-3R	GCG TGA CGC CCA GGC AGA	18	73.6	62

a) Melting temperature (Tm) calculated by GC content method. b) Tm calculated with the formula:  $2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$ .

Table 2. PCR Conditions to Search Optimal Amplification

	Hot start (94°C)	Denature (94°C)	Annealing (62°C)	Extention (72°C)	Number of cycles	Final extention (72°C)	Time required
Condition 1	2 min	30 sec	30 sec	30 sec	30	2 min	94 min
Condition 2	2 min	30 sec	30 sec	30 sec	25	2 min	79 min
Condition 3	2 min	10 sec	10 sec	10 sec	30	2 min	64 min
Condition 4	2 min	10 sec	10 sec	10 sec	25	2 min	54 min
Condition 5	2 min	5 sec	5 sec	5 sec	30	2 min	57 min
Condition 6	2 min	5 sec	5 sec	5 sec	25	2 min	48 min
Condition 7	2 min	3 sec	3 sec	3 sec	25	2 min	46 min

ネーター (ECX-15.C) で観察し、デジタルカメラ (COOLPIX5000) で記録した (このときアガロースゲル、泳動槽内の TAE バッファーには Ethidium Bromide が加えられているため絶対に素手で触れないようにする)。

#### 4. 核 5.8S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析

PCR 産物を精製キット (QIAquick PCR Purification Kit) で精製したのち、サイクルシーケンス用試薬 (ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit) 及びプライマー (5.8S-5F 又は 5.8S-3R) 使用してサイクルシーケンスを行ったのち、ABI PRISM 377 DNA Sequencing System により塩基配列を解析した。

**5. 制限酵素反応と電気泳動法による消化産物の確認** PCR 産物 5.0  $\mu$ l について 2 種類の制限酵素反応を行った。ここに *Eco* 130I (*Sty* I) (Fermentas) 0.5  $\mu$ l, 添付されている 10 $\times$ Buffer O<sup>+</sup> 1.5  $\mu$ l 及び滅菌水 8.0  $\mu$ l (全量 15.0  $\mu$ l) を加えて反応を行った。同様に *Mly* I (NEW ENGLAND BioLabs) 0.5  $\mu$ l, 添付されている 10 $\times$ NEBuffer 4 1.5  $\mu$ l, 100 $\times$ BSA 0.15  $\mu$ l 及び滅菌水 7.85  $\mu$ l (全量 15.0  $\mu$ l) を加えて反応を行った。反応は TaKaRa Dice を使用し、37°C, 5 時間 (*Eco* 130I) 又は 2 時間 (*Mly* I) で行った。反応後は PCR 後と同様に 4% アガロースゲル電気泳動を行い、トランスイルミネーターで観察した。

## 結 果

**1. 葉から全 DNA の抽出** 植物の状態として、採集した直後の葉をパンチで打ち抜いたもの、パンチで打ち抜いたものを冷凍庫 (-20°C) で保存しておいたもの、パンチで打ち抜いたものを乾燥用

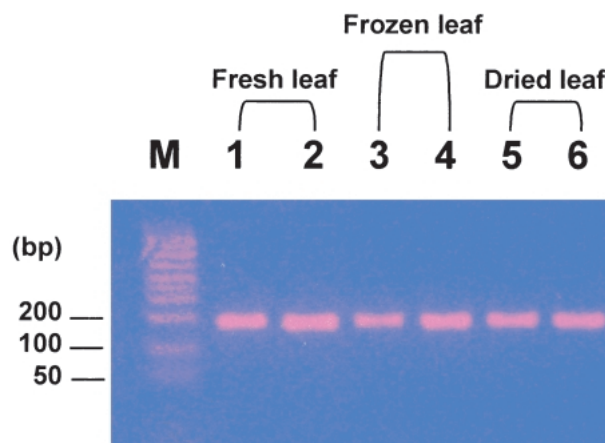


Fig. 1. Agarose Gel Electrophoresis of PCR Products in 5.8S rRNA Gene Regions Using the Leaves in Three Conditions Lane M: 50–2000 bp ladder (BIO RAD), lanes 1, 3, and 5: *Aconitum carmichaeli*, lanes 2, 4, and 6: *Aquilegia flabellata*.

シリカゲルで乾燥したものを使用してそれぞれ全 DNA の抽出を行った。その結果を Fig. 1 に示す。すべてにおいて約 160 bp 付近に良好な増幅が確認できた。このことから薬用植物園に植物がない季節の場合はあらかじめ冷凍か乾燥しておくことにより材料の保存が可能であることが明らかとなった。

**2. 核 5.8S rRNA 領域の PCR 法による増幅反応** Table 1 に示した Melting Temperature ( $T_m$ ) を参考にし、最適アニーリング温度を検討した。その結果 (Fig. 2), 検討した温度ではほとんど差が見られずすべての温度で増幅産物が確認できた。そこであまり低温でない 62°C をアニーリング温度として設定した。次に、反応条件を Table 2 のように 7 種類設定し増幅の差を比べてみた。その結果 Fig. 3 に示すように濃い DNA 増幅断片が確認できた Condition 5 を最適条件とした。

**3. 核 5.8S rRNA 領域の塩基配列の解析** DNA シーケンサーで塩基配列を解析した結果 (Fig. 4), *Aconitum carmichaeli* 及び *Aquilegia flabellata* ともに両プライマーを含め全長 162 bp であり, 5.8S-5F の 5'末端を 1 番目としたとき, *Ac. carmichaeli* は 122 番目が G, 128 番目から 131 番目が ATTA であるのに対し *Aq. flabellata* では 122 番目が T, 128 番目から 131 番目が TTCT であった. その他の配列についてはすべて相同であった. すなわち両者には合計 4 ヶ所の塩基置換が観察された. なお, ここで解析した両種の 5.8S rRNA 遺伝子領域の塩基配列

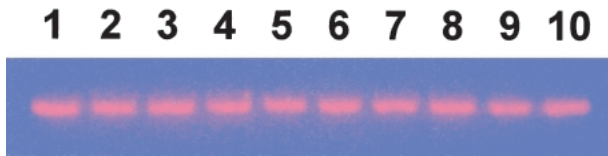


Fig. 2. Agarose Gel Electrophoresis of PCR Products in 5.8S rRNA Gene Regions Amplified at Various Annealing Temperatures

Total DNA extracted from *Aconitum carmichaeli* was used in PCR. The reaction condition were: hot start at 94°C for 2 min, followed by 30 cycles at 94°C for 30 s, 54.5–64.4°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and final extension at 72°C for 2 min. Annealing temperatures (°C): lane 1: 54.4, 2: 55.1, 3: 56.2, 4: 57.5, 5: 58.8, 6: 60.1, 7: 61.4, 8: 62.8, 9: 63.9, and 10: 64.4.

は DDBJ に登録し, 登録番号はそれぞれ *Aconitum carmichaeli*; AB188501, *Aquilegia flabellata*; AB188502 である.

**4. 制限酵素反応** Figure 4 の配列に基づき 2 種の制限酵素を選択した. 両配列を切断する酵素 *Mly* I と *Aq. flabellata* の配列のみを切断する *Eco* 130I (*Sty* I) である. 両酵素の認識配列と切断箇所は Fig. 5 の通りである. 酵素反応を行った結果 (Fig. 6), *Mly* I では両増幅断片が切断され, *Eco* 130I では *Aq. flabellata* の増幅断片のみが切断された. この結果から, 始めに使用したサンプルがいずれの葉か同定できることが示された.

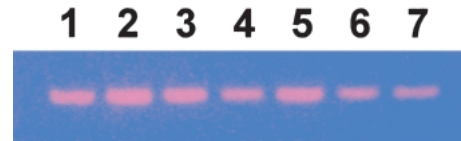


Fig. 3. Agarose Gel Electrophoresis of PCR Products on 5.8S rRNA Gene Regions Amplified under Various Reaction Conditions

Total DNA extracted from *Aconitum carmichaeli* was used in PCR. Reaction conditions were as listed in Table 2. Lanes 1–7 correspond to conditions 1–7, respectively.

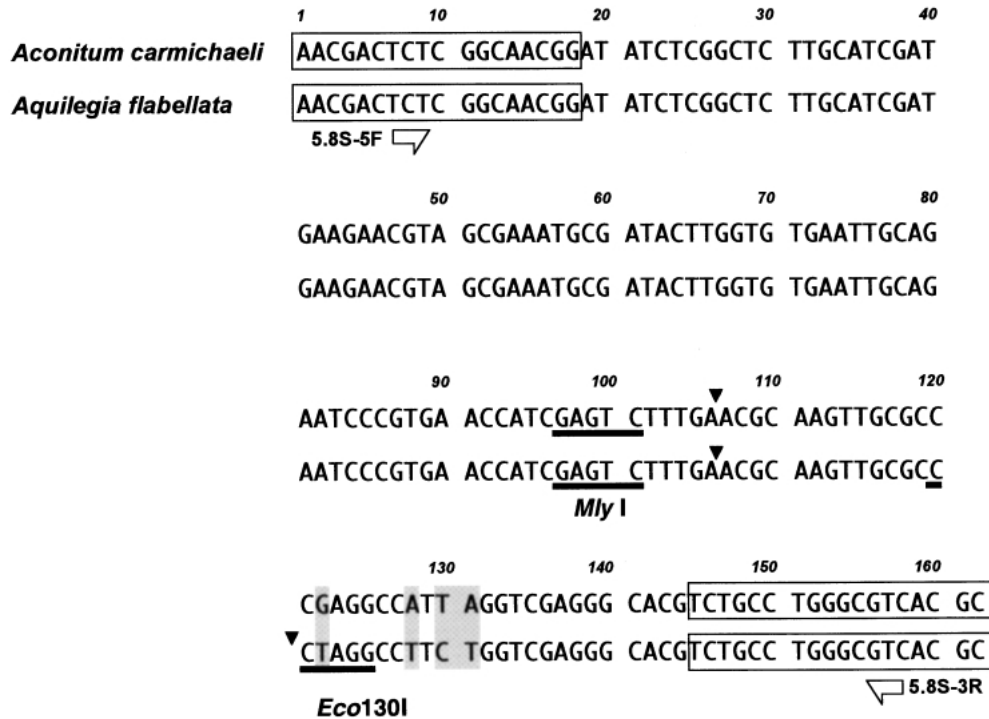


Fig. 4. Nucleotide Differences in 5.8S rRNA Gene Regions of *Aconitum carmichaeli* and *Aquilegia flabellata*

The numerals in italics on the sequences indicate the aligned nucleotide position from the 5' end of the forward primers, 5.8S-5F. The squares indicate the primer positions. Underlining indicates the recognition sites of the restricted enzymes. ▼: sites cut by the restriction enzymes.

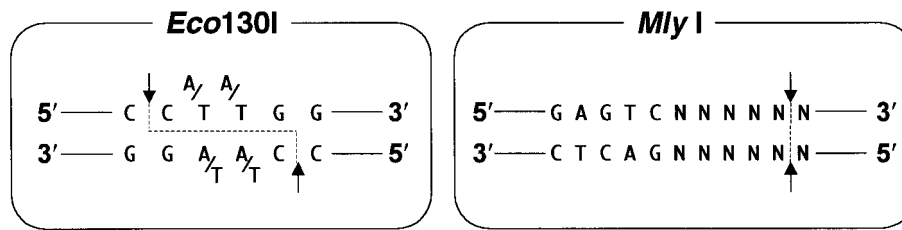


Fig. 5. Recognition Sites and Cut Sites of *Eco* 130I and *Mly* I  
N, A, C, G, or T.

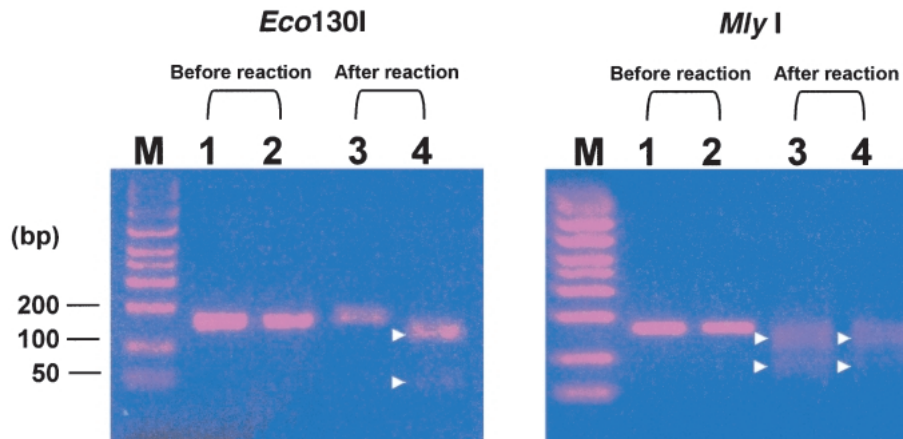


Fig. 6. Agarose Gel Electrophoresis of PCR Products before and after Reactions by *Eco* 130I and *Mly* I  
Lane M: 50–2000 bp ladder (BIO RAD), lanes 1 and 3: *Aconitum carmichaeli*, lanes 2 and 4: *Aquilegia flabellata*.

## 実 習 の 部

1. 用意する植物材料 *Aconitum carmichaeli* (ハナトリカブト) 及び *Aquilegia flabellata* (オダマキ) の生の葉, 冷凍した葉又はシリカゲルで乾燥した葉.

2. 必要器具及び機器 マイクロピペッター (100  $\mu$ l が量れるものと 2  $\mu$ l—15  $\mu$ l が量れるもの), 蒸気滅菌済みのマイクロピペッター用チップ (イエローチップ) 及びチップラック, マイクロチューブ立て, 蒸気滅菌済みのマイクロチューブ (1.5 ml, 0.2 ml), マイクロチューブ (1.5 ml) 用キャップロック, マイクロチューブ (1.5 ml) 用フロート, ペーパーパンチ, 水浴 (又は 95°C に加温することができるもの), 遺伝子増幅装置 (0.2 ml マイクロチューブ用), 水平型アガロース電気泳動装置, 小型遠心器, ラップ, トランスイルミネーター (波長 254 nm, 又は紫外線ランプ), デジタルカメラ (電気泳動画像の記録が必要な場合).

3. 必要試薬 REDExtract-N-Amp Plant PCR

Kits (SIGMA, キットの中には Extraction Solution, Dilution Solution 及び REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix の 3 種の試薬が添付されている), 5.8S rRNA 領域用プライマーセット (5.8S-5F: 5'-AAC GAC TCT CGG CAA CGG-3' 及び 5.8S-3R: 5'-GCG TGA CGC CCA GGC AGA-3'), アガロース, Ethidium Bromide, DNA サイズマーカー, *Eco* 130I (又は *Sty* I), *Mly* I.

### 4. 事前準備

- (1) 蒸留水を蒸気滅菌し, 滅菌水を作成する.
- (2) 電気泳動用 0.5×TAE buffer を調製する.
- (3) Ethidium Bromide 水溶液 (1 mg/ml) を調製する (冷蔵保存).
- (4) プライマーを 1.25  $\mu$ M に調製する (冷凍保存).

### 5. 直前準備

- (1 日目の午前中)
- (1) 採集した植物の葉からペーパーパンチで必要枚数打ち抜き乾かないようにしておく (打ち抜いた葉を冷凍又は乾燥した場合も湿ったキムワイプ等で湿らせておく).

(2) *Eco* 130I 反応液：*Eco* 130I 0.5  $\mu$ l (5U), 10 $\times$ buffer 1.5  $\mu$ l, 滅菌水 8.0  $\mu$ l を反応サンプル数の分量だけ混合して水中保存しておく (10  $\mu$ l/1 人).

(3) *Mly* I 反応液：*Mly* I 0.5  $\mu$ l (5U), 10 $\times$ buffer 1.5  $\mu$ l, 100 $\times$ BSA 0.15  $\mu$ l, 滅菌水 7.85  $\mu$ l を反応サンプル数の分量だけ混合して水中保存しておく (10  $\mu$ l/1 人).

(4) プライマー溶液 (1.25  $\mu$ M) を溶解し水中保存しておく.

(5) 4%アガロースゲルを作成しておく. 例えばアガロース 2.0 g を 0.5 $\times$ TAE buffer 50 ml に加熱して溶解し, Ethidium Bromide 水溶液を 5.0  $\mu$ l 加える. 少し冷ましたのち, 型に流し込みコームを差す (PCR の間に作成してもよい).

(6) 水浴中の水を沸騰させておく.

(2 日目の午前中)

(7) 4%アガロースゲルを作成しておく.

## 6. 実験操作

**6-1. 全 DNA の抽出 (1 日目の午後より)** 必要であれば抽出するサンプルがどちらの植物かわからないようにしておく.

(1) 1.5 ml 用マイクロチューブにペーパーパンチで打ち抜いた葉を 1 枚入れ, Extraction Solution を 100  $\mu$ l 加える (このとき葉がすべて溶液に浸かるようにする).

(2) マイクロチューブにキャップロック, フロートをつけて沸騰水中に 10 分間入れる.

(3) 冷後軽く遠心し, Dilution Solution を 100  $\mu$ l 加え攪拌する.

**6-2. PCR による核 5.8S rRNA 領域の増幅と電気泳動法による増幅産物の確認**

(4) 0.2 ml 用マイクロチューブに REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix を 10.0  $\mu$ l, 5.8S-5F (1.25  $\mu$ M) を 4.0  $\mu$ l, 5.8S-5R (1.25  $\mu$ M) を 4.0  $\mu$ l 及び抽出した全 DNA を 2.0  $\mu$ l 加える (全量 20.0  $\mu$ l).

(5) 攪拌して遠心したのち, 遺伝子増幅装置にセットする (約 1.0 時間). この際, ホットスタート法を行うためあらかじめ装置を 94 $^{\circ}$ C に加熱しておく.

(6) 反応終了後, 反応液の 5.0  $\mu$ l を 4%アガロースゲル電気泳動にかける (150 V, 10 分, DNA サイズマーカーも同時に泳動する).

(7) 泳動後アガロースゲルをラップで包み, トラ

ンスイルミネーター等で増幅産物を確認する (アガロースゲルには Ethidium Bromide が入っているのでかならず手袋等を使用する).

**6-3. 制限酵素反応と電気泳動法による反応産物の確認**

(制限酵素反応の準備まで 1 日目の午後に終わらせる. 酵素反応はスタッフが 2 日目までに行い, 2 日目は反応後のサンプルを渡す).

(8) 長さ約 160 bps の増幅が確認できたサンプルに対して制限酵素反応を行う. PCR の反応液 5.0  $\mu$ l を 0.2 ml 用マイクロチューブ 2 本にそれぞれ加える. さらに 1 本には *Eco* 130I 反応液 10.0  $\mu$ l, もう 1 本には *Mly* I 反応液 10.0  $\mu$ l 加え, 37 $^{\circ}$ C, 5 時間 (*Eco* 130I) 又は 2 時間 (*Mly* I) インキュベートする. (全量 15.0  $\mu$ l, インキュベートには遺伝子増幅装置等を使用する).

(9) 反応後, それぞれ反応液の全量 (15.0  $\mu$ l) について 4%アガロースゲル電気泳動を行う (150 V, 10 分, DNA サイズマーカーも同時に泳動する).

(10) 泳動後アガロースゲルをラップで包み, トランスイルミネーター等で反応産物を確認する.

(11) 必要に応じて自分のサンプルが *Aconitum carmichaeli* 又は *Aquilegia flabellata* のいずれか同定する.

(12) 考察, 後片付け等.

## 考 察

本研究では植物の遺伝子多型実験を学生実習に組み込むために短時間で操作を行えるよう努めた. 通常, 植物から全 DNA を抽出, 精製したのち, PCR を行っている. 市販のキットを使用して全 DNA を抽出した場合, 操作が短時間であるが純度を上げるために精製過程を必要とする. そこでキットを使用しても精製過程が省略できればかなりの時間短縮になると考え, 精製過程を省略できる植物を見い出すことにした. 植物材料として当初, 薬学的に重要でかつ形態が類似しているため誤用される *Aconitum carmichaeli* (ハナトリカブト) と *Geranium thunbergii* (ゲンノショウコ) を選択した. この 2 種で検討した結果, *Ac. carmichaeli* は精製過程を省略しても PCR が行える純度の全 DNA を抽出することができたが *G. thunbergii* では不可であった. そこで代替植物を検討した結果, *Ac. carmichaeli* と



同じキンポウゲ科の *Aquilegia flabellata* (オダマキ) でも PCR が行える純度の全 DNA を抽出できることが確認でき、*Ac. carmichaeli* と *Aq. flabellata* を採用した。この2種の植物は冷凍又は乾燥した状態の葉でも新鮮な葉と同様に実験が行えることが確認され、植物が手に入らない冬季にも実習可能である。

抽出キットには REDEExtract-N-Amp Plant PCR (SIGMA) を採用した。これは市販品の中で最も短時間で全 DNA を抽出できる利点を持つことによる。このキットを使用することで試料を液体窒素で処理する必要がなくなり、全 DNA の抽出及び PCR の反応液の準備に要する時間を大幅に短縮することができた。さらに本キットには PCR の反応液に電気泳動時の色素が加えられているため、反応液をそのままアガロースゲルに注入できる。

PCR 法では核遺伝子である ribosomal RNA (rRNA) 領域を選択した。rRNA 領域は生物種に共通した領域であり、塩基配列の相違により種の近縁関係を調べる際に利用される領域である。<sup>8,9)</sup> 本実験では rRNA 領域のなかでも短い遺伝子領域である核 5.8S rRNA 領域を増幅し、解析した。その結果、PCR の増幅反応時間を約 1 時間にまで、電気泳動の泳動時間を約 10 分にまで短縮することが可能となった。このことは電気泳動分析におけるアガロースゲルを 4% と固くする必要を生じたが、その結果はむしろ実験者が反応液をゲルに注入する際マイクロピペッターのチップ先端でゲルを突き破るのを防ぎ、さらに注入操作時間の短縮という利点にもつながった。

本研究では多型解析を PCR-restriction fragment-length polymorphisms (RFLP)<sup>10)</sup> 法で行った。PCR-RFLP 法はサンプル DNA の特定領域を PCR で増幅したのち、制限酵素で切断し電気泳動法で断片のサイズの違いを検出する再現性のよい方法である。PCR-RFLP 法を植物で行うために *Ac. carmichaeli* と *Aq. flabellata* について今回初めて核 5.8S rRNA 遺伝子領域の塩基配列を明らかにし、この2種の配列を区別する制限酵素 *Mly* I 及び *Eco* 130I を選択

した。実際に筆者が設計した通りの結果が得られ、制限酵素反応後の電気泳動パターンから *Ac. carmichaeli* と *Aq. flabellata* の2種が同定できた。ただし、Fig. 6 では酵素により切断された断片が明確ではないが、これは反応液の塩濃度が高いことによるものであると考えられる。

以上今回われわれが計画した植物の多型解析実験を学生実習に採用した場合、およその時間配分と操作手順は実習の部に記したようになる。この内容は2日間(1日約4時間)という制約の中で、学生1人1人が十分行うことができる実習内容である。ただ、実際にはマイクロピペッターなどを初めて使用する学生が対象であるため、器具の指導方法に工夫が必要であろう。今後、他の薬用植物についても検討し、実習内容の充実を図りたい。

## REFERENCES

- 1) Fushimi H., Komatsu K., Isobe M., Namba T., *Phytomedicine*, **3**(4), 387-389 (1997).
- 2) Mizukami H., Shimizu R., Kohjyouma M., Kohda H., Kawanishi F., Hiraoka N., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**(5), 474-478 (1998).
- 3) Kojoma M., Kurihara K., Yamada K., Sekita S., Satake M., Iida O., *Planta Medica*, **68**(1), 94-96 (2002).
- 4) Sasaki Y., Fushimi H., Cao H., Cai S. Q., Komatsu K., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**(12), 1593-1599 (2002).
- 5) Murray M. G., Thompson W. F., *Nucl. Acids Res.*, **8**(19), 4321-4325 (1980).
- 6) Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B., *Plant Mol. Biol. Rep.*, **1**(4), 19-21 (1983).
- 7) Kita Y., Ito M., *Plant Syst. Evol.*, **225**, 1-13 (2000).
- 8) Komarnitskii S. I., Komarnitskii I. K., Cox A., Parokonnyi A. S., *Genetika*, **34**, 883-889 (1998).
- 9) Cao H., Sasaki Y., Fushimi H., Komatsu K., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1389-1394 (2001).
- 10) Sorscher E. J., Huang Z., *Lancet*, **337**, 1115-1118 (1991).