



# やってみよう！ 遺伝子実験

PCR 法を用いる実験の解説書

～PCR 法を用いたイネの品種判別を題材として～



©いらすとや

# 目 次

## 実験実施の前に

◇イネの品種判別実験とは	1
--------------	---

◇PCR 法を用いる実験に関して	2
------------------	---

◇実験の流れ	3
--------	---

## 知っておきたい実験器具 ※必要な部分だけお読みください

◇実験器具の滅菌	4
----------	---

- ①オートクレーブ
- ②その他の滅菌方法（圧力鍋を使った実験器具の滅菌）

◇マイクロピペット	7
-----------	---

◇サーマルサイクラー	8
------------	---

◇電気泳動装置	10
---------	----

◇遠心分離機	11
--------	----

◇PCR 反応に必要な試薬	12
---------------	----

- ①PCR 反応とは
- ②PCR 反応液について
- ③DNA を保護する緩衝液
  - ア 0.5M EDTA (pH8.0)
  - イ 1 M Tris-HCL(pH8.0)
  - ウ 50×TAE (Tris-acetate-EDTA)溶液
  - エ TE 溶液 (Tris-EDTA buffer)
- ④プライマーの調整
- ⑤ローディングバッファー
- ⑥DNA の染色試薬
  - ア 和光純薬製 SAFELook™プレグリーン(ポストグリーン, ロードグリーン)
  - イ 関東化学製核酸染色用試薬ビューアブルーステイン(ViewaBlue® Stain)
  - ウ エチジウムブロマイド溶液の調整(参考)
- ⑦DNA サイズマーカーの調整

## やってみよう！ 遺伝子実験（実験手順）

◇マイクロピペットの使い方	24
---------------	----

## (1) DNA 抽出 27

①DNA 抽出の準備	27
②DNA 抽出の流れ	29

## (2) PCR 31

①PCR の準備	31
②サーマルサイクラーでの実施	33
③人力サーマルサイクラーでの実施	34

## (3) 電気泳動 38

①ゲルの作製方法	38
②電気泳動について	39
③UV トランスイルミネーターの使い方	42

## 実験を授業に取り入れる（授業展開案）

①マイクロピペットの使い方と電気泳動による DNA の分離の原理を学ぶ	43
②人力サーマルサイクラーを用いた PCR	44
③岩手県産品種のイネを使った遺伝子判定実験	45

## 自作できる実験器具の作成

①電気泳動装置の作成と使い方	46
②人力遠心分離機の作り方	52
③PCR の原理を学べるペーパークラフト	55
④断熱紙コップを用いたチューブ・チップ立ての作成	57

## 試薬や器材の入手方法

①試薬・実験器材関連	59
②実験材料の入手について	60

## 困った時は？

◇実験器具の貸出しについて	61
---------------	----

◇廃棄物の処理について	63
-------------	----

①試薬の廃棄方法	63
②DNA を含む使い捨て実験器具の廃棄について	63

◇参考文献など	65
---------	----

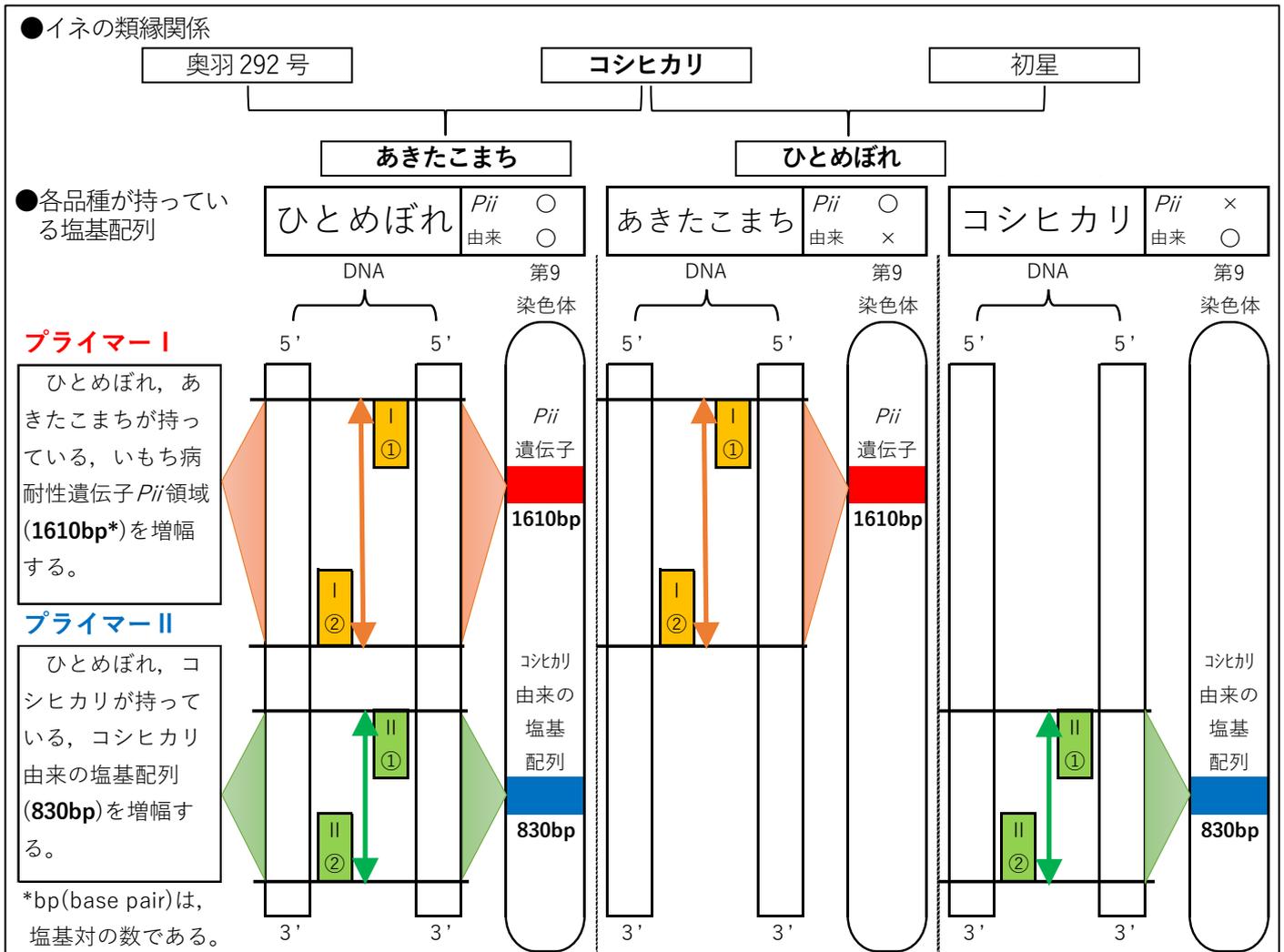
# 本 編

## 実験実施の前に

本書は、第一学習社「高校生物」に掲載されている「PCR法を用いたイネの品種判別実験」を題材として、知識や設備がなければ行えないとされていた遺伝子実験を、50分授業の中に取り入れるために開発した教材・教具をまとめたものです。

### ◇イネの品種判別実験とは

イネは日本人の主食として全国で栽培や品種改良が積極的に行われています。しかし、イネや米粒は外見で区別できないため、PCR法を用いた品種判別が行われています。第一学習社「高校生物」では、「コシヒカリ」、「あきたこまち」、「ひとめぼれ」について、いもち病耐性遺伝子 *Pii* とコシヒカリ由来の塩基配列の有無から品種判別を行う実験方法が紹介されています【図1】。この実験は、PCRや電気泳動が体験できるとともに親子鑑定や品種改良などの、遺伝子を扱う技術であるバイオテクノロジーについてより理解を深められる教材です。



【図1】教科書で紹介されているイネの類縁関係とプライマーが増幅する遺伝領域

本書では、この実験に県産食材を用いることで、生徒の興味・関心をさらに引き出したいと考え、県産品種のコメで

ある「金色の風」、「銀河のしずく」も実験で使用します。

# ◇PCR 法を用いる実験に関して



- 遺伝子組換え実験の実施には規定があります。  
しかし PCR 法の実施には特別な規定はありません【図 2】。

## 高等学校などで遺伝子組換え実験を行う皆様へ

文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室

高等学校などで遺伝子組換え実験を実施することは、組換えDNA技術が持つ有用性とその社会的な影響を学び、ライフサイエンス研究に対する正しい理解を促すために有意義な手段であると考えられます。しかしながら、その実施に当たっては、「**遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(いわゆるカルタヘナ法又は遺伝子組換え生物等規制法)**」で定めるルールをしっかりと守る必要があります！

～平成16年2月～

組換えDNA実験指針 → カルタヘナ法

「組換えDNA実験指針」では、教育を目的とした遺伝子組換え実験のためのルールが規定されていましたが、平成16年2月のカルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)の施行にもない、指針は廃止されました。これ以降、教育を目的とした遺伝子組換え実験は、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)で定めるルールにより実施することが必要となりました。

**遺伝子組換え実験を行う際に注意すべきルール**

教育目的で行われる遺伝子組換え実験は、通常、市販の実験キットなどを用いた簡単なものでしょう。このような実験の場合、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)に従って守らなければならないルールは非常にシンプルなものです。以下にこれらのルールを掲げますので、しっかりと守り、遺伝子組換え実験の安全の確保に努めて下さい。

- ① 遺伝子組換え実験中の拡散防止措置をしっかりととること！**  
遺伝子組換え実験を行う上で最も大事なことは、実験に用いる遺伝子組換え生物を実験室の外へ拡散させないことです。この拡散を防ぐため、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)では、実験の種類に応じた「**拡散防止措置**」をとるよう定めています。しかしながら、通常の教育目的の遺伝子組換え実験であれば、この拡散防止措置は「P1」と呼ばれるものとなります。次ページの「P1」チェックリストを参考に、遺伝子組換え実験を始める前に、これらの内容を全て満たすかどうかについてチェックしましょう。

拡散防止措置の内容		✓
①	実験室が、通常の生物の実験室としての構造及び設備を有すること。	
②	遺伝子組換え生物等を含む廃棄物(大腸菌などの菌液、廃液を含む。)については、廃棄の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。 (具体例:オートクレーブ処理を用いた滅菌、70%アルコールによる殺菌)	
③	遺伝子組換え生物等が付着した設備、機器及び器具については、廃棄又は再使用(あらかじめ洗浄を行う場合にあっては、当該洗浄。)の前に必ず同様に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。	
④	実験室については、実験を行った日における実験の終了後、及び遺伝子組換え生物等が付着したときは直ちに、遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。(具体例:70%アルコールによる拭拭)	
⑤	実験室の扉については閉じておくこと(実験室に入らなるときを除く。)	
⑥	実験室の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等の必要な措置を講ずること。	
⑦	すべての操作において、エアロゾルの発生を最小限にとどめること。 (具体例:在命互を備えた状態で操作しないこと(扉を前に70%アルコールに浸すことと良い。))	
⑧	実験室以外の場所では遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講じようとするときなど、実験の過程において遺伝子組換え生物等を実験室から持ち出すときは、遺伝子組換え生物等の漏出や、拡散が起こらない構造の容器に入れること。	
⑨	遺伝子組換え生物等が付着し、又は曝露することを防止するため、遺伝子組換え生物等の取扱い後における手洗い等必要な措置を講ずること。(具体例:実験の前後の手洗い、実験中に髪をさわらない)	
⑩	実験の内容を知らない者が、みだりに実験室に立ち入らないための措置を講ずること。 (具体例:「遺伝子組換え実験中につき関係者以外立ち入り禁止」などの表示)	

**② 保管中の拡散防止措置をしっかりととること！**  
数週間にわたって実験を行う場合、作成した遺伝子組換え生物を保管する必要がありますが、この場合には、① 遺伝子組換え生物が漏出しない容器に入れ、容器に遺伝子組換え生物である旨の表示をすること、② 冷蔵庫など決められた場所に保管し、見やすい箇所に遺伝子組換え生物である旨の表示をすること(つまり、①と②の2カ所の表示をしなければなりません)、を守る必要があります。

**③ 体制を整備すること！**  
カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)では、遺伝子組換え実験を行う際に、その安全な取扱いについて検討する委員会を設置し、検討を行うよう求めているところですが、通常の教育目的の実験であれば、安全管理が容易なことから、こうした委員会の設置は必須ではありません。しかしながら、遺伝子組換え実験の内容や安全管理の方法などを組織として十分に把握した上で、実験を行うことが必要であると考えられます。また、実験を指導する方々は、遺伝子組換え生物等の取扱いについて十分な経験を有していることが望まれます。

**○ その他**

上記のルールは、あくまでもカルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)が定めるルールの一例です。他にも遺伝子組換え生物を運搬する際のルール、送付する際のルール、事故が発生した際のルールなど様々なルールがありますので、十分注意する必要があります。  
文部科学省のHPでは、遺伝子組換え実験に関する情報が満載です。是非ご覧下さい。

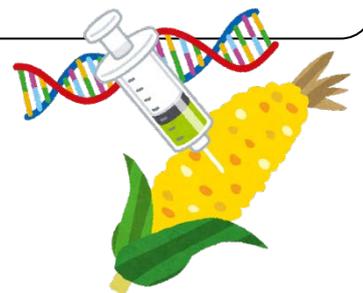
**●お問い合わせ先●**  
文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室  
http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html#kumikae  
E-mail: kumikae@mext.go.jp  
TEL: 03-6734-4108 FAX: 03-6734-4114

Ver. 2.1

【図 2】 文部科学省が定めた遺伝子組換え実験を行う際のガイドライン

## ポイント!

この規定は、カルタヘナ法に基づいた**遺伝子組換え実験を行う際に適用されるルール**です。本書で扱っている PCR 法を用いた遺伝子実験は、DNA を抽出しますが、**他の生物に組換える操作は行いません**。また、ヒトの遺伝子など個人情報にあたる実験材料も使用しませんので、**実験実施の報告や事前の保護者承諾なども必要ありません**。試薬の廃棄についてもほとんど気にする必要はありません。



## ◇実験の流れ

●この実験は、次の3つのステップで構成されています【図3】。



【図3】PCR を用いる遺伝子実験の流れ

### ポイント!

本書では、PCR を用いる遺伝子実験を(1)，(2)，(3)の段階に分けて授業に導入できるようにしています。**実験の一部，もしくは全てを体験させることで，生徒の興味・関心を高める**ことを目的としています。また，実験に使用する高額な器材に関しては，**実験器材の原理に着目し，費用を抑えて再現**しています。さらに，PCR や電気泳動装置の原理を再現しているため，**原理自体を学べる教材**となっています。



◇実験器具の滅菌

①オートクレーブ

オートクレーブ(高圧蒸気滅菌)【図4】は、高温と圧力をかけた飽和水蒸気中で微生物や酵素などを滅菌もしくは失活させる方法です。遺伝子実験では、他の遺伝子の混入を防ぐためや、DNA分解酵素を失活するために使用します。気体、ゴム製、紙や繊維製の物品、水、培地、試薬・試液または液状の医薬品等にも行うことができますが、器具ごとに適切な条件がありますので特にプラスチック等を滅菌する際は、必ず条件を確認してください。

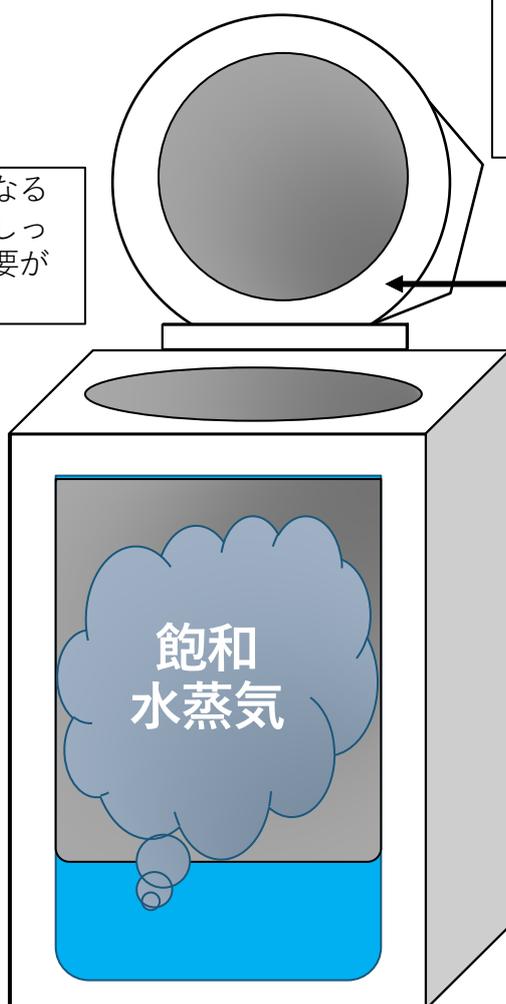


- オートクレーブの一般的な設定
  - ・115℃ 30分間
  - ・121℃ 20分間※基本的な設定
  - ・126℃ 15分間
  - ・134℃ 10分間

- 本書遺伝子実験において滅菌が必要と思われる器具
  - ・マイクロチューブ(滅菌済みで販売されているものもある)
  - ・ピペットチップ(少なくとも教員試薬調整するものには行う)
  - ・緩衝液など長期保存する試薬・保存瓶に行う

③ふたは高圧になるため固定具でしっかり止める必要がある。

②耐圧容器のふたを開けてステンレスかごに入れた実験器具を水が浸された容器内に設置する。



①実験器具はフラスコなどに入れ、アルミホイルでおおってからかごに入れる。

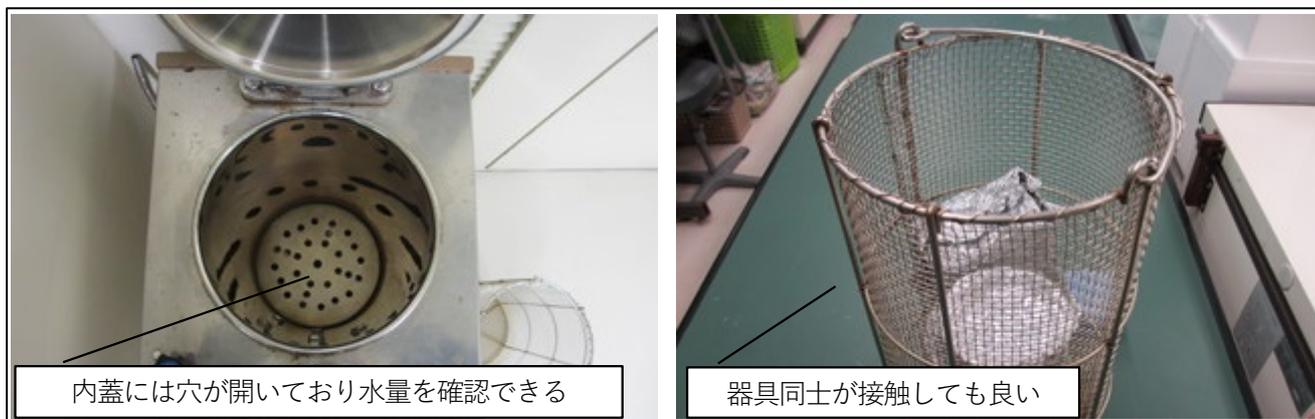
【図4】オートクレーブの設定や使用方法について

[操作] (一般的な方法です。詳しくはそれぞれの実験機材に付属する説明書をご覧ください。)

(1)オートクレーブ内には、内蓋が入っており、この内蓋が浸るくらいまで水を入れる【図5】。

(2)アルミホイルで滅菌する器具のフタや表面を覆う。

※特にプラスチック器具は滅菌可能か確認すること。

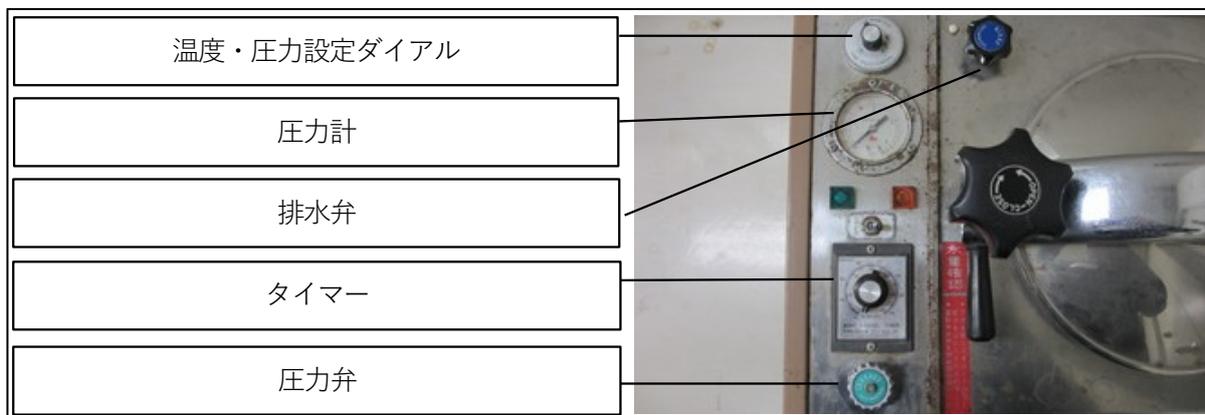


【図5】 オートクレーブの準備

(3)蓋を閉じる際は、蓋のパッキンの状態を確認し、設定圧力や温度を確認してからスタートする。

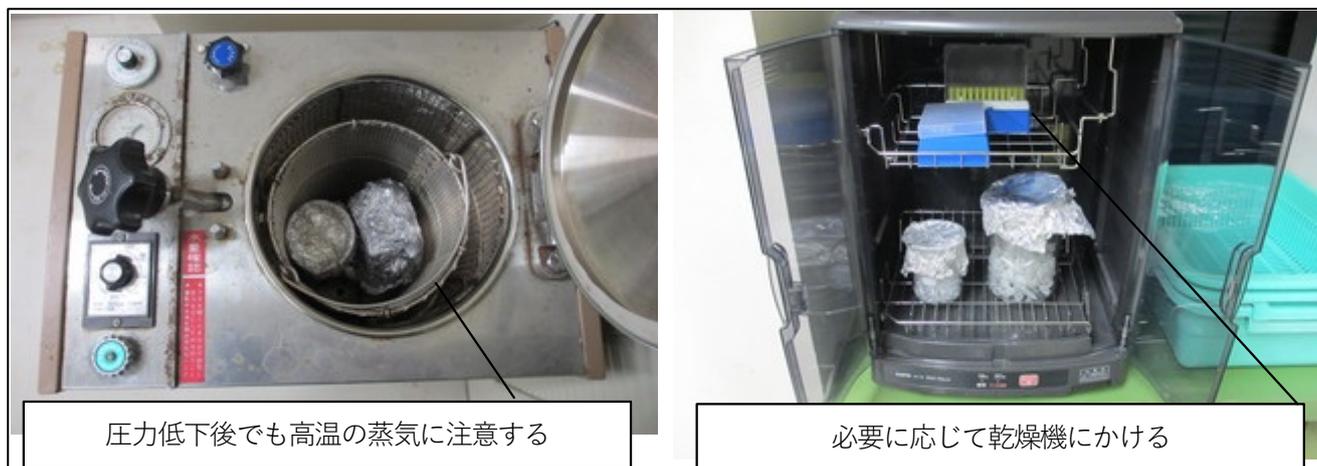
(4)完了後、圧力計を見ながら温度や圧力がしっかりと下がるのを待つ。

※滅菌後すぐに開ける方法を示しているものもあるが、120℃前後の蒸気が出るので火傷に注意すること。



【図6】 オートクレーブの各部の名称

(5)軍手やミトンを用いて、火傷に注意しながら取り出す【図7】。(必要に応じて乾燥機にかける)



【図7】 オートクレーブ後の処理

## ②その他の滅菌方法(圧力鍋を使った実験器具の滅菌)

オートクレーブは高額な実験機材のため、持っていない学校も多いと思われます。そこで、調理用の圧力鍋(121°C,

2気圧対応)を用いて滅菌する方法を紹介します。

[操作] (一般的な方法です。詳しくは機器に付属する説明書をご覧ください。)

- (1)内蓋が浸るくらいまで水を入れ、アルミホイル表面を覆った実験器具を置く。
  - (2)蓋を閉じる際は、弁や錘が取り付けられているか、パッキングが正常に装着されているか確認する。
  - (3)鍋を火にかけて、しばらくすると <sup>おもり</sup>錘 や表示窓が浮き上がり、調整弁から湯気が出はじめるので、そこから 20 分間弱火で加熱を続ける。(121°C, 2 気圧, 20 分が基本となる滅菌条件)
  - (4)20 分したら加熱を終了し、調整弁を見ながら圧力がしっかりと下がるのを待つ。
- ※滅菌後すぐに鍋を開けられるものもあるが、120°C前後の蒸気が出るので火傷に注意すること。
- (5)軍手やミトンを用いて、火傷に注意しながら取り出す。

※圧力鍋の中には、121°C, 2 気圧まで加圧できないものもあるので購入時に注意して下さい。

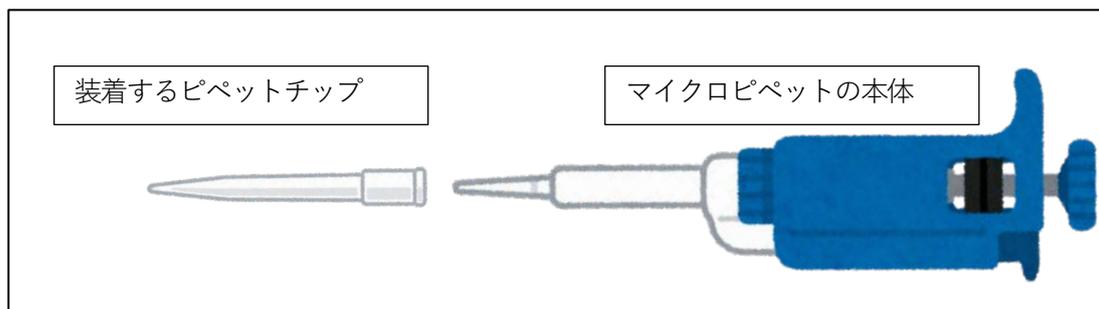


【図8】 圧力鍋をオートクレーブとして用いる際の注意事項

## ◇マイクロピペット

マイクロピペットは、1.0mL(=1000 $\mu$ L)以下の液体を測りとる実験器具であり、使用する際には使い捨てのピペットチップを装着します【図9】。遺伝子実験では頻繁に利用されますが、高等学校の実験ではなかなか使われません。

そのため、生徒に実験操作をさせる場合は、使い方を指導する必要がありますがあります。



【図9】マイクロピペットに装着するピペットチップ

本書では、P1000(200~1000 $\mu$ L)、P200(20~200 $\mu$ L)、P20(2~20 $\mu$ L)、P2(0.1~2 $\mu$ L)の容量のピペットを使用しています。使用方法については、p.24 に示しました。

**容量変更可能型**

**容量固定型**

名称	容量( $\mu$ L)	チップの色
P2	0.1 ~ 2	白色
P10	2 ~ 10	白色
P20	2 ~ 20	黄色
P200	20 ~ 200	黄色
P1000	200 ~ 1000	青色

ピペットチップラック

※業者によっては色が異なる場合がある

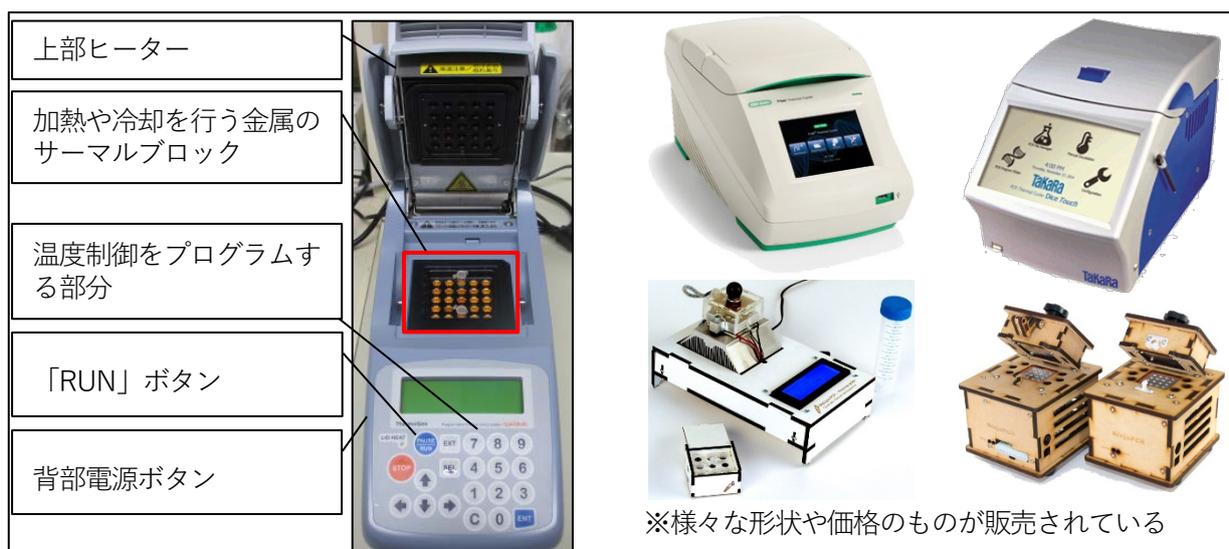
【図10】マイクロピペットの各部の名称やピペットチップの容量

## ◇サーマルサイクラー

サーマルサイクラーは、プログラムされた温度変化を自動的に制御して PCR に必要な条件を作り、DNA を増幅するための機械です。

この機械には、「サーマルブロック」と呼ばれる PCR 反応液の入ったマイクロチューブをセットする金属ブロックがあります。この金属ブロックにはヒーターがついており、あらかじめ設定したプログラムの通りに反応液の温度を上下させることができます。

サーマルサイクラーは、現在様々な形状や価格のものが販売されており、年々その価格も下がってきています。しかし、自分で装置を組み立てるキットであっても 10 万円前後なので、この実験のためだけに装置を購入することは難しいと思います。そこで本書では、サーマルサイクラーの原点である、恒温槽を使って温度制御を人力で行う「人力サーマルサイクラー」の実験方法を紹介しています。詳細については p.34 に示しました。



【図 11】サーマルサイクラーの各部の名称や設定温度について

### [アニーリングについて]

アニーリングとは、DNA 伸長の足場となるプライマーだけを DNA に結合させることです(p.12)。このときの設定温度をアニーリング温度といい、一般的には 55~65°C に設定します(プライマーによって設定が変わります)。この温度を正確に設定するために、各プライマーの T<sub>m</sub> 値(melting temperature・融解温度)を計算する必要があります。

## [Tm 値(融解温度)とは]

Tm 値とは、プライマーが50%の割合で相補的な DNA と結合する温度のことです。Tm 値の計算には様々な方法がありますが、『最近接塩基対法』、『GC%法』、『Wallace 法』が主に使われています【表1】。『最近接塩基対法』が最も正確にアニーリング温度を求められると言われてはいますが、計算が複雑なため計算用ソフトの使用をおすすめします。また、プライマーを販売している会社のインターネットサイトでは、計算用ソフトが無償で公開されています。自分で計算する場合は、以下に示した『GC%法』、『Wallace 法』で計算してください。(①が、最も高い精度で Tm 値を求められると言われています。)

【表1】 Tm 値を求める計算方法

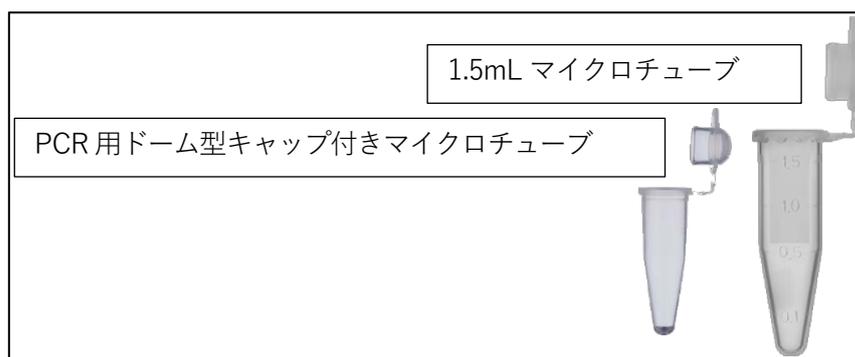
① GC%法	$(Tm \text{ 値}) = 60.8 + 0.41 \times (\text{G,C の割合}(\%)) - (500 / \text{総塩基数})$
② GC%法(近似計算)	$(Tm \text{ 値}) = 4 \times (\text{G,C の数}) + 2 \times (\text{A,T の数}) + 35 - 2 \times (\text{総塩基数})$
③ Wallace法	$(Tm \text{ 値}) = 4 \times (\text{G,C の数}) + 2 \times (\text{A,T の数})$

## [アニーリング温度について]

アニーリング温度とは、PCR におけるアニーリング(p.12)の際の設定温度で、Tm 値を基にして設定します。1つの塩基配列を PCR で増幅するためには2種類のプライマーが必要となるため、その中間の温度を基準として、一般的にその2~3℃低い温度にアニーリング温度を設定します。プライマーが目標の領域以外の塩基配列と結合し、目的以外の(非特異的な)DNA が増幅される場合は、設定温度を上げます。(本書では、確定した実験条件を記載しますので、その通りに行ってください。)

## [マイクロチューブについて]

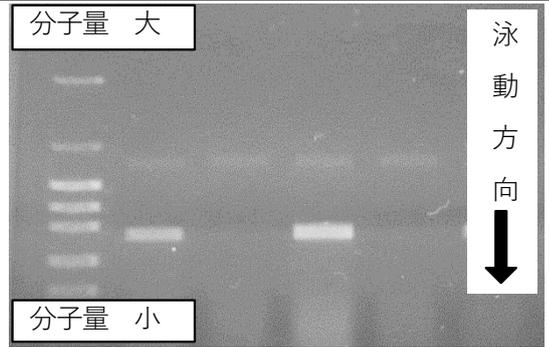
PCR には、様々な種類のマイクロチューブ(微量遠心管)が使われています。容量には 2ml, 1.5ml, 0.2ml (PCR 用) などがあり、ロック式のふたが本体につながっている構造になっています。ドーム型キャップのものは、サーマルサイ클ラーの熱を迅速に伝える構造で、PCR に一般的に用いられています。エッペンドルフ (Eppendorf) 社の製品が代表的なため、マイクロチューブ全般の通称としてエッペンドルフチューブということもありますが、その他にも多数の実験機器メーカーでほぼ同規格の製品を出しています。本書では【図12】に示したマイクロチューブを使用しました。



【図12】 本書で用いたマイクロチューブ

## ◇電気泳動装置

電気泳動とは、水溶液中で+又は-の荷電を持つペプチド、タンパク質、核酸などの物質が、電流を流すことで移動する現象です。アガロースゲルを用いる電気泳動では、アガロース分子の網目状の立体構造が「ふるい」の役割を行い、小さな核酸分子は速く、大きな核酸分子は遅く移動します。

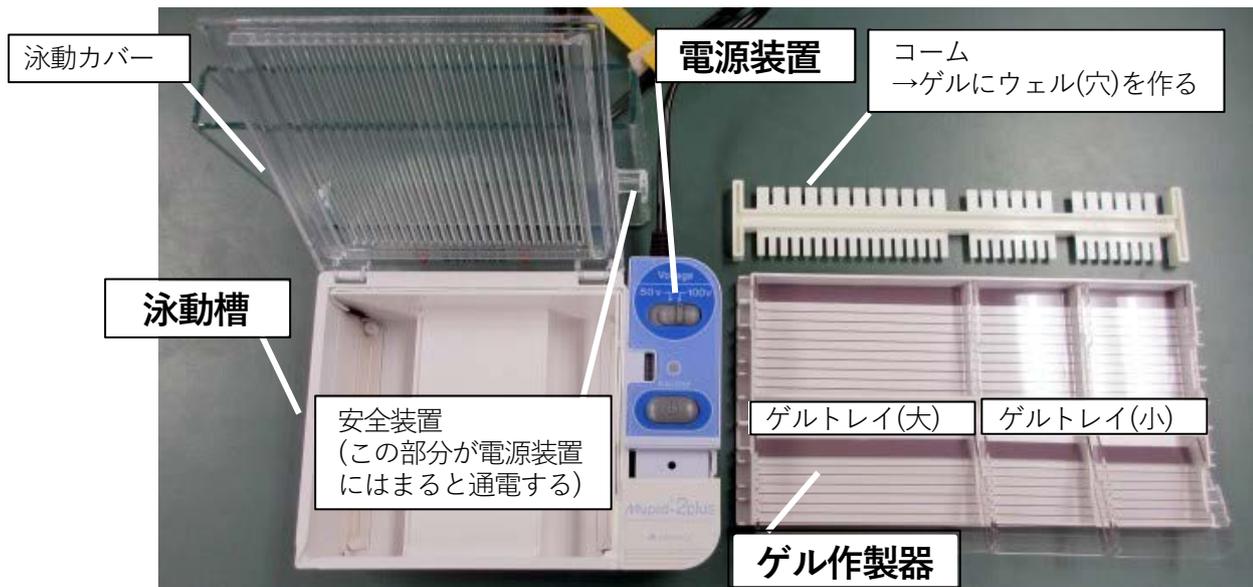


【図13】バンドパターンの例

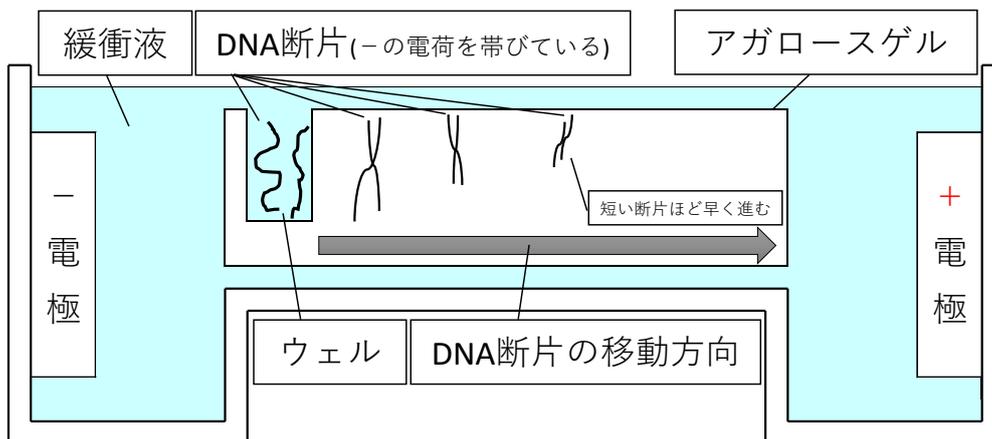
これによって、PCRで増幅されたDNAを長さに応じて分離させることができます。このようにして大きさ順に分離したDNAは縞模様となって現れます。これをバンドパターン【図13】と言います。

電気泳動装置は、交流の家庭用電源(100V)を直流に変えて通電を行っています。安全装置はついていますが、高い電圧がかかっている旨を生徒に説明してください。本書では、この電気泳動装置を安価に作成する方法を p.46 に掲載しています。

### ●電気泳動装置とゲル作製器の各部の名称



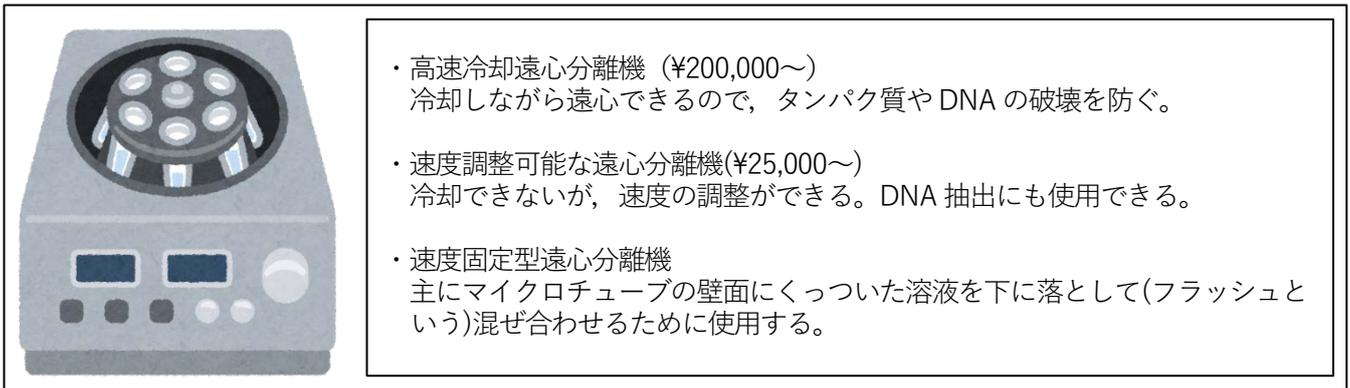
### ●電気泳動装置の断面図



【図14】電気泳動装置の各部の名称と電気泳動装置の断面図

## ◇遠心分離機

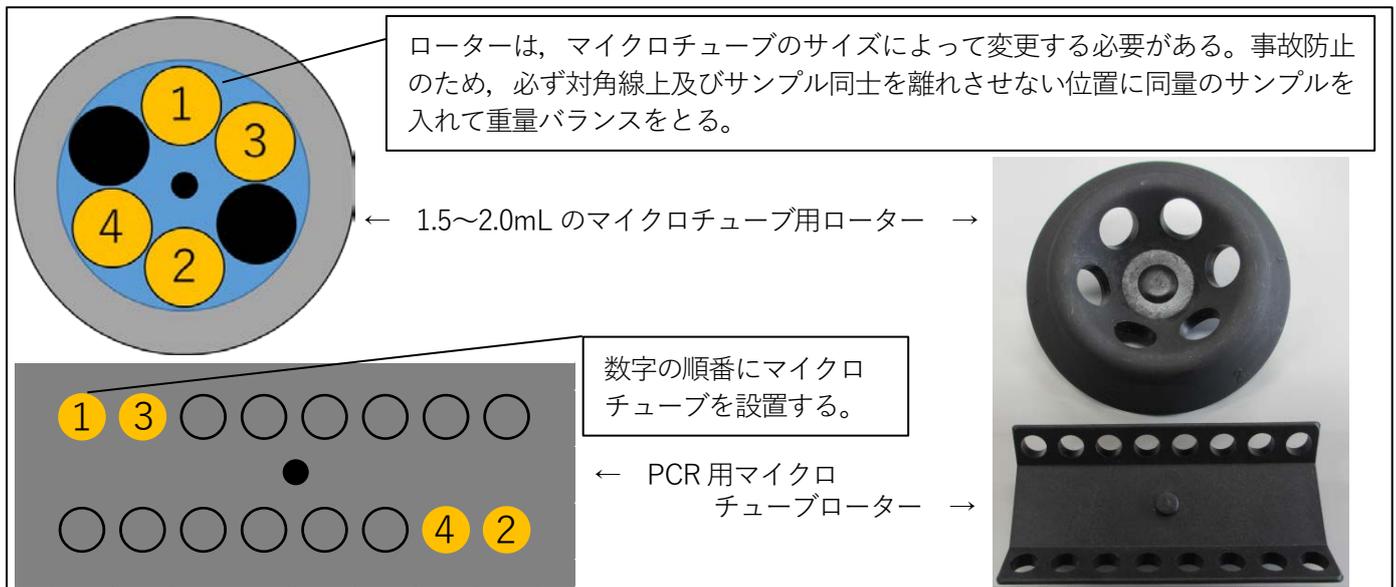
遠心分離機は、高速回転によって強力な遠心力を発生させることで、各成分を分離する装置です。微量な薬品を混ぜ合わせる際にも用いられています。その用途に応じて、冷却しながら遠心分離が可能なものや、一定の速度しか出せない安価な装置もあります。強力な遠心力が発生しますので、使用する際には、以下の注意事項を守って使用する必要があります。



【図15】遠心分離機の種類と価格・用途

### [注意事項]

- (1) 本体を安定した水平な場所に設置すること。
- (2) 使用時には、必ず対角の試料同士の重量バランスを合わせる。不釣り合いなバランスで使用するとローターが破損し、事故や怪我の原因となる。
- (3) ローターが回転している間は本体の蓋を開けないこと。また、回転中のローターには触れないこと。
- (4) ローターに傷や腐食、変形などがある場合は直ちに使用を中止すること。



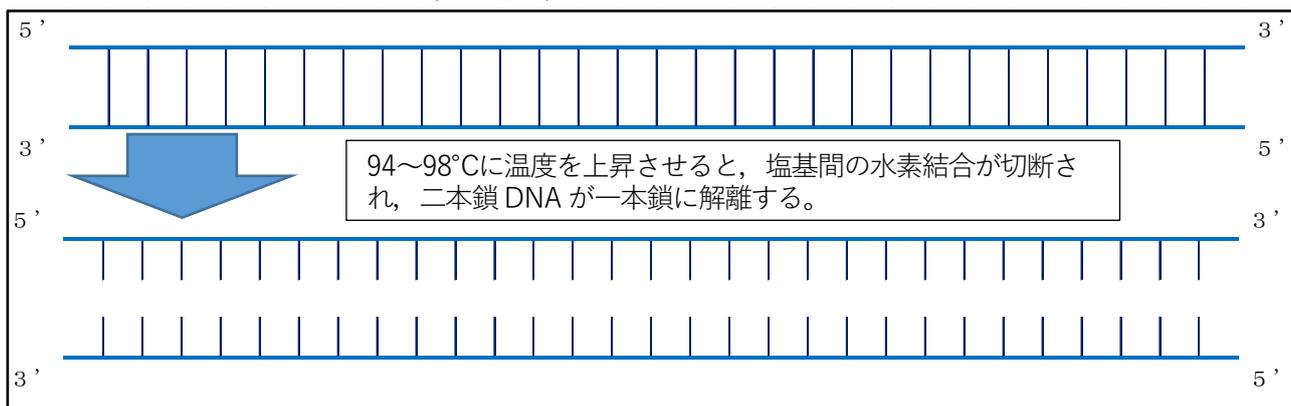
【図16】遠心分離機のローターを使用する際の注意事項

## ◇PCR 反応に必要な試薬

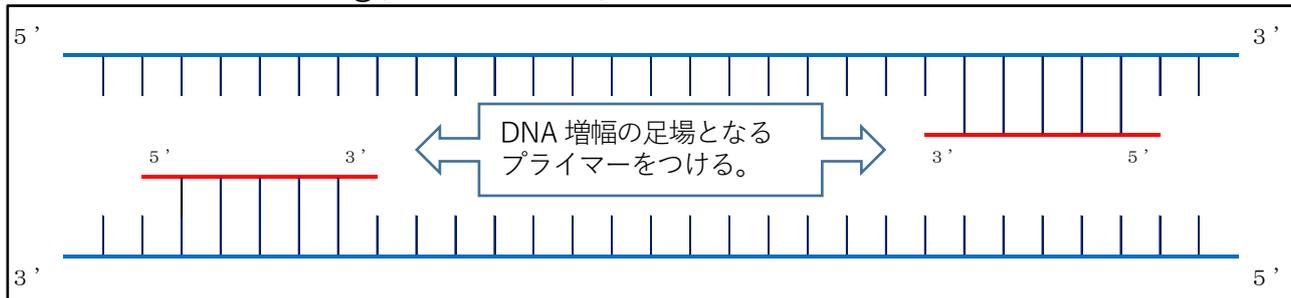
### ①PCR 反応とは

PCR は、Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応) のことで、微量の DNA を鋳型として、DNA の特定の領域を数時間で数百万倍に増幅する方法です。

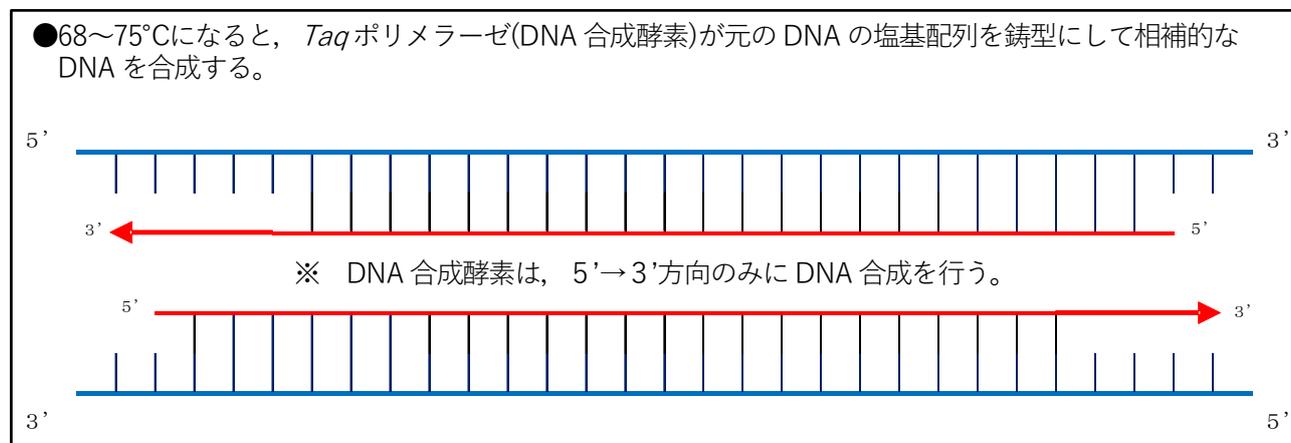
#### ステップ 1 : Denaturation(熱変性)



#### ステップ 2 : Annealing(アニーリング)



#### ステップ 3 : Extension reaction(伸長反応)



以上の3ステップを1サイクルとして、通常は35~40サイクル繰り返してDNA領域を増幅します。

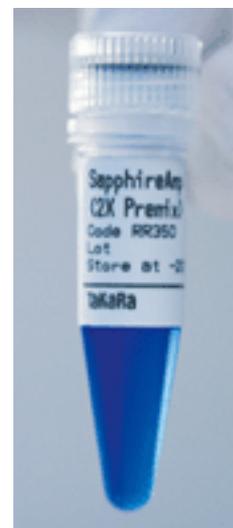
## ②PCR 反応液について

PCR 反応液は【表 2】で示した成分から構成されています。PCR は、通常の酵素では変性・失活してしまう 45°C以上の条件下で行われます。そこで、高温に耐えられる好熱菌一種である *Thermus aquaticus* 由来の DNA 合成酵素である *Taq* ポリメラーゼが使われています。

【表 2】PCR 反応液の成分

試薬もしくは溶液	用途
DNA抽出液	増幅されるDNA
PCR用バッファー	DNAを保護する緩衝液
プライマー	DNA合成の足場となるプライマー
dNTP	DNAの部品となるA,T,G,Cそれぞれのデオキシリボヌクレオチド三リン酸
<i>Taq</i> ポリメラーゼ	DNA合成酵素

本書では、タカラバイオ株式会社の Sapphire Amp® Fast PCR Master Mix(以降 Sapphire Amp Taq)を使用して実験を行っています。この製品は、反応時間が通常の *Taq* ポリメラーゼよりも短くて済み、バッファー、DNA 合成酵素、dNTP が予め混合されているため、プライマーと DNA 抽出液を加えるだけで簡単に PCR を行うことができます。また電気泳動の際に必要なローディングバッファー(p.19)も添加済みのため、PCR 産物を直接電気泳動槽に注入でき、実験時間を大幅に短縮できます。本書ではこの試薬を用いて、110 分かかっていた実験を、約 30 分で行う方法について紹介しています(p.34)。



また、コストや試薬の管理を考えた場合にも下表のような優れた点があります。実験可能回数は少なくなりますが、価格が安価で、1本あたり約80回分(10班分)ごとの個別包装になっています。また、解凍後は冷蔵庫(4°C)で3ヶ月保存可能なため、事前に PCR 反応液を生徒用のチューブに分注し、準備しておくことができます。

【表 3】*Taq*ポリメラーゼの比較

コスト	価格	実験可能回数	管理	他に必要な試薬
同社の <i>Taq</i> ポリメラーゼ	¥27,500	400回	-20°C	<i>Taq</i> ポリメラーゼ用緩衝液
				dNTP Mixture
				Loading Buffer
Sapphire Amp Taq	¥17,000	320回 約80回分×4本	-20°C 解凍後は、4°Cで 3ヶ月使用可能	全て添加済み

### ③DNA を保護する緩衝液

緩衝液(Buffer)とは、少量の酸や塩基を加えても、希釈して濃度を変えても、その影響を緩和して pH (水素イオン指数) をほぼ一定に保つ働き (緩衝作用) をもつ水溶液のことです。遺伝子実験では、電気泳動や冷却による水溶液の変化から DNA を保護する目的で使用されます。

#### ア 0.5M EDTA (pH8.0)

EDTA(エチレンジアミン四酢酸)は、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等を除去するキレート剤で、金属イオン要求性の DNA 分解酵素を不活性化し、DNA の分解を抑制します。

【表 4】 0.5M EDTA (pH8.0) の調整に必要な試薬

試薬もしくは溶液	1 L	500mL	200mL	最終濃度
EDTA (EDTA 2Na 2H <sub>2</sub> O)	186.1 g	93.1 g	37.2 g	0.5 M
固形化NaOH (pH調整用)	± 20 g	± 10 g	± 4 g	
5N NaOH (pH調整用)	適量	適量	適量	5M
蒸留水	適量	適量	適量	



[調整方法](1 L 作成時)

- (1)800 mL の蒸留水に EDTA の粉末をゆっくり加えマグネチックスターラーで攪拌する。
- (2)固形化 NaOH を少しずつ加え、EDTA を溶かす(pH の上昇に伴って溶ける)。
- (3)EDTA が溶けたら、水酸化ナトリウム溶液で pH を 8.0 にし、1 L までメスアップする。
- (4)オートクレーブして常温保存する。(121°C, 20 分)

#### イ 1 M Tris-HCL (pH8.0)

Tris(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)は、安価で pH の適応範囲が 7~9 程度と生命科学系の実験に適しているため頻繁に使われる緩衝液の成分です。

【表 5】 1M Tris-HCL (pH8.0) の調整に必要な試薬

試薬もしくは溶液	1 L	500mL	200mL	最終濃度
Tris aminomethane (分子量121.2)	121.1 g	60.6g	24.2 g	1 M
6N HCl溶液(塩酸)	約100 mL	約50mL	約20 mL	
1N HCl溶液(塩酸)	適量	適量	適量	
蒸留水	適量	適量	適量	

### [調整方法](1 L 作成時)

- (1) Tris の粉末を蒸留水 800mL に溶かす。
- (2) 塩酸を加えて pH が 8.0 になるように調整する。
- (3) pH が 8.0 になった後、溶液が冷めるのを待つ。  
(Tris の pH は温度依存的に変化するため)
- (4) 塩酸を加えて pH が 8.0 になるよう最終調整を行う。
- (5) 液量が 1 L になるまでメスアップする。
- (6) オートクレーブ後、常温で保存する。

※実験系によっては他の pH でも作製する場合がある。

※塩酸を加えると発熱するが、上記の濃度では問題ない。



## ウ 50×TAE(Tris-acetate-EDTA)溶液

Tris, 酢酸, EDTA を含む緩衝液であり、電気泳動の際に DNA を保護する目的で使用されます。PCR における実験操作の様々な場面で使用するため、通常 50 倍濃度に調整したものを作っておき、希釈して使用します。

**【表 6】50×TAE (50 倍 TAE) 溶液の調整に必要な試薬**

試薬もしくは溶液	1 L	500mL	200mL	最終濃度
Tris	242 g	121 g	48.4 g	2 M
0.5 M EDTA(pH=8.0)	100 mL	50mL	20mL	50 mM
氷酢酸	57.1 mL	28.6 mL	11.4mL	1 M
蒸留水	適量	適量	適量	

### [調整方法](50 倍 TAE 溶液を 1 L 作成する場合)

- (1) 試薬を 500 mL ほどの蒸留水に溶かす。(結構溶けにくい)
- (2) 1 L になるように蒸留水でメスアップする。
- (3) 常温で保存する。

## エ TE 溶液 (Tris-EDTA buffer)

TE 溶液は、Tris と EDTA を含み、基本的にプライマーの調整や DNA の保存の際に使用される緩衝液で、pH はおよそ 7.2~8.0 になるように調整します。

【表 7】 TE 溶液の調整に必要な試薬

試薬もしくは溶液	500mL	250mL	100mL	最終濃度
1.0 M Tris-HCL	5 mL	2.5 mL	1 mL	10 mM
0.5 M EDTA(pH8.0)	1 mL	0.5 mL	0.2 mL	1 mM
蒸留水	適量	適量	適量	

[調整方法](500mL 作成時)

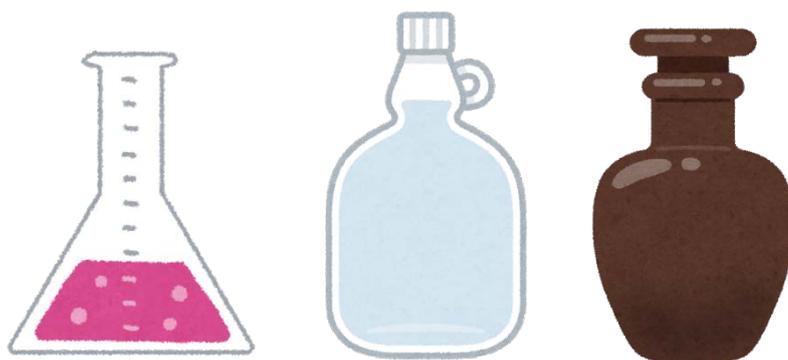
- (1) 試薬を蒸留水に溶かし、500 mL までメスアップする。
- (2) オートクレーブをする。
- (3) 常温で保存する。

## ポイント!

いくつもの試薬を自分で調整するのは大変です。そこで、全て調整済みのものが販売されています。状況に応じて使用してください。

【表 8】 調整済み緩衝液について

試薬名	役割	容量	価格	取扱業者	備考
50 × TAE	DNA保護	500mL	¥9,000	ニッポン・ジーン	25L分(10班分で 2 L程度使用する)
1 × TE	DNA保護	100mL	¥8,000	ニッポン・ジーン	DNA抽出サンプル 1 本につき 50μL使用



## ④プライマーの調整

プライマーは PCR において、DNA の伸長反応を行う際の足場となる 20~30 塩基の DNA 断片です(p.12)。通常プライマーは、最終濃度が 0.2~0.5 $\mu$ M(0.5pmol/ $\mu$ L)に調整する必要があります。以下、粉末のプライマーを購入した場合の調整方法についてまとめました【図 17】。

### [粉末で購入した場合の調整方法]

#### ポイント!

プライマーは、それぞれ塩基配列が異なるため分子量が異なります。そのため、粉末で購入した場合は、プライマーごとに異なる量の TE 溶液か蒸留水で溶解する必要があります。購入したプライマーに付属する分析書を基にして、調整してください。以下の調整方法は、プライマーの物質量 (nmoles) が **10.9** の場合を例にして説明しています。

○プライマーを注文した時に届く分析書の例		
Custom Primers		Order Number: *****A
Certificate of Analysis (分析書)		Order Date: 2018/**/**
(項目名)	(項目の説明)	(備考)
Primer name:	プライマーの名前	自分で名前を付けられる
Primer Number:	メーカーでつける番号	
Primer Length:	塩基数	
Researcher:	研究者名	
Sequence(5' to 3'):	配列	20~30塩基が多い
Molecular Weight $\mu$ g/ $\mu$ mole	分子量	塩基配列によって異なる
Millimolar Extinction Coefficient:	吸光度	DNAの純度を示す
Purity:	精製度	不良のプライマーが入っていないか
Tm(1M Na <sup>+</sup> ):	Tm値	アニーリング生成用温度
Tm(50mM Na <sup>+</sup> ):	Tm値	通常のPCR用温度
%GC	GC含有量	60%を越えようとまくPCR反応が進まない
$\mu$ g per OD	質量当たりの吸光度	純度の高さを示す
nmoles per OD	溶液中の吸光度	
<b>nmoles</b>	<b>10.9</b>	<b>プライマーの物質量(溶解する量の目安となる)</b>
Notes :		

【図 17】 プライマー分析書の見方の例

プライマーは何度も凍結・融解を繰り返すと品質が劣化する可能性があります。そこで、保存用として高濃度(100 $\mu$ M)に調整したプライマーを複数のマイクロチューブに分注して保管してください。

(a) 100 $\mu$ M に調整(プライマーが到着した際に氷冷しながら行う操作)

- (1) 109 $\mu$ L の TE 溶液に溶解する (濃度が 100 $\mu$ M になる)。
  - (2) (1) で作成したプライマーを 10 $\mu$ L ずつ 1.5mL マイクロチューブに分注し、全て -20 $^{\circ}$ C で保管する。
- ※プライマーが残った場合は、別のチューブに入れておおよその液量を記入し、-20 $^{\circ}$ C で保存する。
- ※分注したプライマーをセットにして袋に入れておくと使いやすい【図 18】。

(b) 10 $\mu$ M に調整(実験前に 10 班分を用意する場合)

- (1) (a) で分注したプライマー(10 $\mu$ L)を 1 セット取り出し、それぞれ蒸留水を 90 $\mu$ L 加えて、10 倍に希釈する(濃度は 10 $\mu$ M になる)。
  - (2) 10 $\mu$ L ずつ分注し、-4 $^{\circ}$ C 以下で保管する。(長期保存する場合は -20 $^{\circ}$ C)
  - (3) 実験の際に、(2) で分注したプライマー溶液を生徒に配布して、プライマーの最終濃度である 0.2 $\mu$ M になるように、PCR 反応液に加えさせる。
- ※PCR 反応液の合計が 100 $\mu$ L の場合は 2.0 $\mu$ L、50 $\mu$ L の場合は 1.0 $\mu$ L、25 $\mu$ L の場合は 0.5 $\mu$ L のように、50 倍希釈するように(2)のプライマー溶液を PCR 反応液に加える。

## ポイント!

本書の実験では、2つの DNA の領域について調べるため、**4 種類のプライマーを使用しています【図 19】**。微量なプライマーをそれぞれ生徒に加えさせるのは大変です。あらかじめ実験で使用する分のプライマーを教員が混ぜておくと効率的です。



【図 18】本研究で作成したプライマーセット

126	5199	-	001	18.07.04	126	5199	-	002	18.07.04
Pii1a(いもち病耐性遺伝子Pii用)					Pii1b(いもち病耐性遺伝子Pii用)				
5'-CCGCAGTTAGATGCACCATTAGAA TTGCTTCATTGCCTGTGGA-3'					5'-CCGCAGTTAGATCAAGTGGCAAGG TTCCATGTTTGGACTCAA-3'				
4.50D		<b>Tm=67.3</b>			4.60D		<b>Tm=67.5</b>		
144.0 $\mu$ g		32.4 $\mu$ g/OD			147.1 $\mu$ g		31.7 $\mu$ g/OD		
<b>10.9nmol</b>		MW=13208.7			<b>11.4nmol</b>		MW=12953.5		
126	5199	-	001	18.07.04	126	5199	-	002	18.07.04
RC1a(コシヒカリ系統共通塩基配列)					RC1b(コシヒカリ系統共通塩基配列)				
5'-TGGCCGGCATGACTCAC-3'					5'-ACTGGCCGGCATCAAGAC-3'				
8.40D		<b>Tm=63.0</b>			8.60D		<b>Tm=62.3</b>		
279.4 $\mu$ g		33.3 $\mu$ g/OD			272.0 $\mu$ g		31.7 $\mu$ g/OD		
<b>54.0nmol</b>		MW=5171.4			<b>49.5nmol</b>		MW=5493.6		

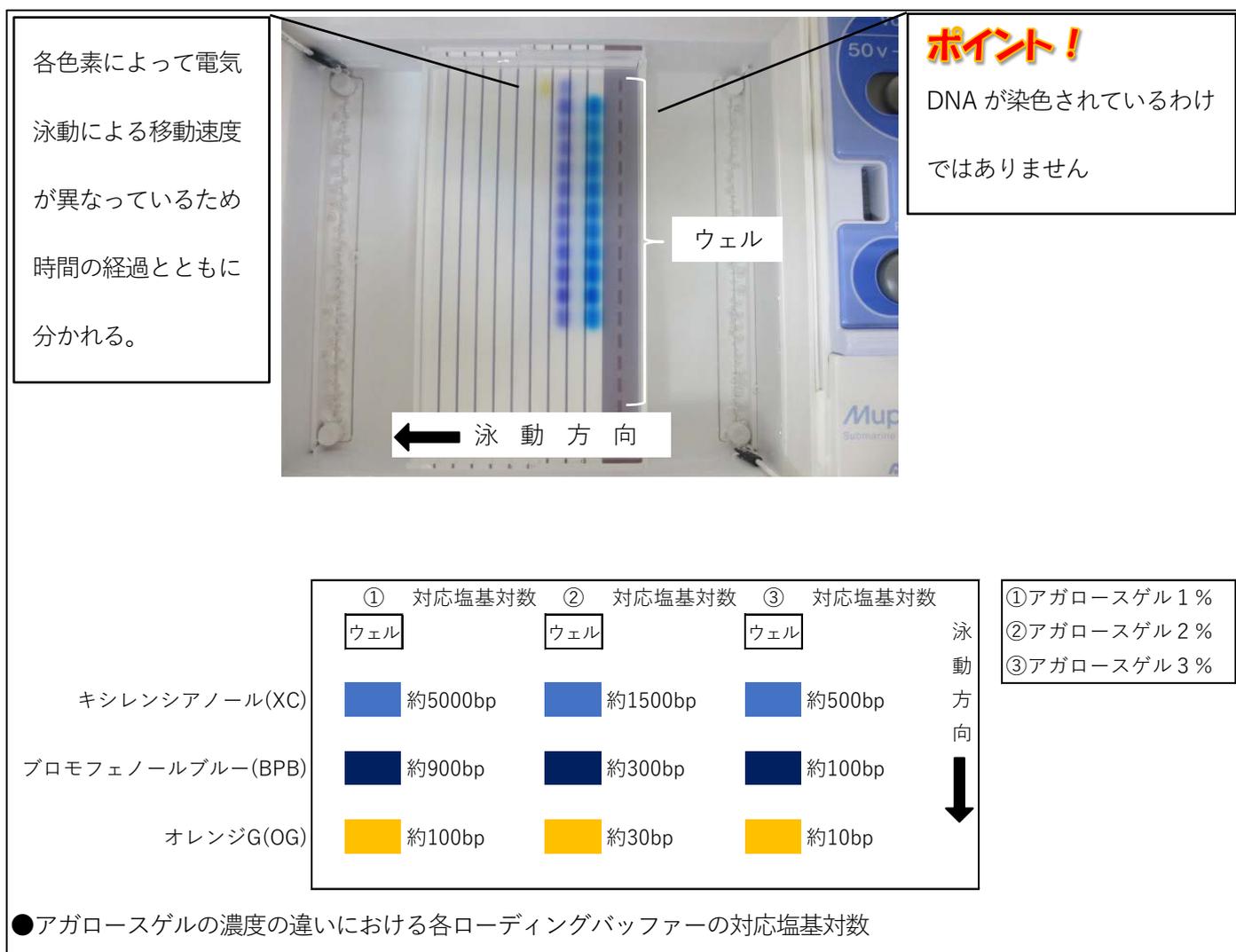
【図 19】本研究で使用したプライマー

## ⑤ ローディングバッファー

ローディングバッファー※は、無色透明の DNA が、電気泳動中にどこまで泳動されたかを確認するための色素です。DNA がゲルに入り込む前に浮いてしまうのを防ぐため、ショ糖(もしくはグリセロール)が入っています。

よく使われる色素はオレンジ G(OG)とプロモフェノールブルー(BPB), キシレンシアノール(XC)で、どんな長さ(bp:塩基対)の DNA 断片を電気泳動するかで使用する色素を変えたり、混合したりします。本書では最も一般的な調整方法を紹介しましたが、DNA サイズマーカー(p.23)等を購入すれば、ローディングバッファーは付属しています。また、最初から添加してある試薬もありますので、そちらの使用をお勧めします。

※ゲルローディングバッファー、ブルージュース、ローディングダイ、Dye などとも呼ばれる。



【図 20】ゲルに注入されたローディングバッファーと一般的なローディングバッファーの構成

【表9】10×ローディングバッファー調整に必要な試薬

試薬もしくは溶液	10mL*	最終濃度
オレンジG(OG)	25mg	0.25 % (w/v)
ブロモフェノールブルー (BPB)	25mg	0.25 % (w/v)
キシレンシアノール (XC)	25mg	0.25 % (w/v)
0.5M EDTA	0.1mL	5 mM
ショ糖 (もしくはグリセロール)**	3mL (4g)	30 % (w/v) (40 % (w/v))
蒸留水	適量	

\* 6倍に調整する場合は、16.7mLにメスアップする。

\*\*フィコールを加える場合もある。

[調整方法](10×ローディングバッファーを10mL作成する場合)

- (1)色素及びEDTAをよく混合する。
- (2)(1)が溶けきった後でショ糖もしくはグリセロールを混合する。
- (3)10 mL になるよう蒸留水でメスアップする(6倍濃度を作成する場合は16.7mLにメスアップ)。

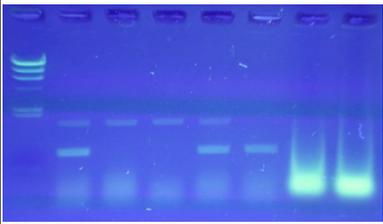
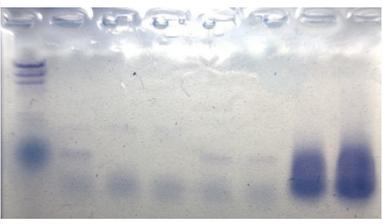
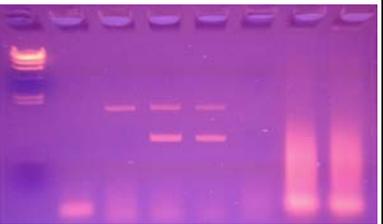
※保存にあたっては基本的に常温で問題ないが、使用頻度が少ない場合は4°Cにて保存する(長期保存になる場合は-20°Cで保存する)。

※調整においては、手が染色されないようにゴム手袋等を着用し、実験器具が染色されないように、直接コニカルチューブ等に入れて作成する。



## ⑥DNA の染色試薬

DNA の染色試薬は、PCR 産物の電気泳動後にバンドパターンを観察するために用いられます。染色試薬には、特定の波長の光で発光させる蛍光色素と、可視光下で観察が可能なものがあります。ゲルにあらかじめ染色試薬を入れておく「先染め」と電気泳動後にゲルを染色試薬に浸す「後染め」があります。一般的に使用されているエチジウムブロマイド(EtBr)は、発がん性があるとされており高等学校で扱う薬品としては使用・廃棄に安全対策や配慮が必要となりますので、本書では他の試薬をお勧めしています。

	SAFELOOK™プレグリーン	ViewaBlue® Stain	エチジウムブロマイド(参考)
染色像			
価格	高額	安価	安価
発がん性	無	無	有
結果確認	強力なUVライトか 490nmLED	可視光(特別な装置不要)	強力なUVライト必要
観察	泳動後すぐ観察可能	染色・脱色が必要	泳動後すぐ観察可能
扱い易さ	生徒が扱える	後日でも観察可能	使用には配慮が必要

※背景色の違いは、染色液及び光源の違いによる影響

【図 21】各 DNA 染色液の特徴

### ア 和光純薬製 SAFELOOK™プレグリーン(ポストグリーン, ロードグリーン)

SAFELOOK™シリーズ【表 10】は、発がん性が低い核酸染色試薬で、エチジウムブロマイドの代わりとして開発されました。本書では、先染め用のプレグリーンを使用しています。

【使用方法】

【表 10】各 SAFELOOK™シリーズの特徴と使用方法

種類	励起波長	蛍光波長	光源	検出感度	使用方法
プレグリーン	490nm	520nm (DNA)	LED かUV	0.1~ 0.4ng	先染め用で、ゲル100mLにつき5μL添加する。また、泳動バッファーにも200mLあたり5~10μL添加する。
ポストグリーン	490nm	525nm	LED かUV	0.05~ 0.2ng	後染め用で、泳動バッファー100mLにつき、10~20μL(1:5000~1:10000)添加する。
ロードグリーン	490nm	525nm	LED かUV	0.2~ 0.7ng	ローディングバッファーが添加済みである。本試薬とPCR産物やDNAマーカが1対5の比率になるように添加する。



## イ 関東化学製核酸染色用試薬ビューアブルーステイン(ViewaBlue® Stain)

ビューアブルーステインは、核酸を青色に染色し可視光下で観察でき、エチジウムブロマイドのような発がん性がないため取扱いが容易な試薬です。後染めの方が DNA の検出感度が高く、泳動後に染色・脱色を行い、翌日バンドパターンを確認するのに適しています。

### [使用方法]

#### ●先染め

- (1) 試薬を 100 倍希釈になるようにアガロースゲルを作成する際に加える。
  - (2) 可視光下で観察する。状況によって蒸留水中で脱色する。
- ※ DNA の検出感度はおよそ 20 ng までである。

#### ●後染め

- (1) 原液を別容器に分注しておく。
  - (2) 電気泳動後のゲルを原液に完全に浸し、室温で 5 分間静置する。
  - (3) ゲルを蒸留水に移し、5 分間<sup>しんとう</sup>振盪する。
  - (4) 新しい蒸留水に移し、更に 5 分間<sup>しんとう</sup>振盪する。(10 分間原液に浸し、一晚脱色してもよい)
  - (5) DNA が青く呈色しているか可視光下で観察する。
- ※ DNA の検出感度は 5 ng までである。

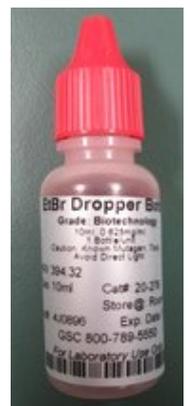


## ウ エチジウムブロマイド溶液の調整(参考)

エチジウムブロマイドは、最も一般的に PCR 産物の蛍光染色に使用されている試薬です。しかし、発がん性があるため使用には直接手で触れないなど注意が必要となります。高等学校で使用する場合のガイドラインなどは特に定められていませんが、本書では使用しないことをお勧めします。

【表 11】 エチジウムブロマイドを調整するための試薬

試薬もしくは溶液	10 mL	200 mL	最終濃度
エチジウムブロマイド	100 mg	2 g	10 mg/mL
蒸留水	10 mL	200 mL	



## [調整方法](200 mL 作製の場合)

- (1) 直接触れないように遮光可能な容器にエチジウムブロマイドを2g入れ、蒸留水を200 mL入れる。
- (2) エチジウムブロマイドは溶けにくいので、スターラーバー\*を入れて1時間から一晩溶かす。
- (3) 遮光した上で常温もしくは冷蔵庫で保存。
- (4) アガロースゲルに直接溶かして使用する場合は、ゲルトレイ(大)1つ分の容量である30mLあたり、上記の調整を行ったエチジウムブロマイドを1.5 $\mu$ L加える。

※強い発がん性、有害性があるため、使用後はエチジウムブロマイド調整専用にする方が良い。

※GENESEESCIENTIFIC社の製品には、小分けにされた袋ごと溶かして調整が可能なものや、50mLのアガロースゲルに1滴添加するだけで10mg/mLになる製品が発売されており、体への付着や吸引を極力防ぐことができます。

## ⑦DNA サイズマーカーの調整

DNA サイズマーカー\*は、DNAの長さ(塩基対数)を推定する「ものさし」となる試薬です。中には様々な長さのDNA断片が混ぜられており、PCR産物のバンドパターンと比較して塩基対数を推定することができます。

※DNA分子量マーカーやラダーマーカーなどとも呼ばれる。

### [調整方法]

※DNA サイズマーカーは、【表12】に示したように、購入時のロットによって初期濃度が異なるため、最終濃度が200~800ng/ $\mu$ Lになるようにそれぞれを調整する必要がある。また、何度も凍結・解凍を繰り返すと品質が劣化する可能性があるため、いくつかに分注しておく。

- (1) 注文したマーカーが届いたら初期濃度と容量(主に20 $\cdot$ 100 $\mu$ L)を確認し、分注するマイクロチューブを準備する。
- (2) 【表12】のように、DNA サイズマーカー、蒸留水、6 $\times$ ローディングバッファーをよく混ぜ合わせて分注する。

【表12】 DNA サイズマーカーの調整方法(最終濃度200ng/ $\mu$ Lに調整する場合)

名称	原液の濃度	12 $\mu$ L作成			備考
		原液	蒸留水	6 $\times$ LB*	
$\lambda$ -Hind III	0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	2 $\mu$ L	1ウェルに6~12 $\mu$ Lを注入し、残りは-20 $^{\circ}$ Cで保管
pHY Marker	0.8 $\mu$ g/ $\mu$ Lの場合 ※製品ごとに濃度が異なる	2.3 $\mu$ L	7.7 $\mu$ L	2 $\mu$ L	

\*6 $\times$ LB...Loading Buffer(ローディングバッファー)



# やってみよう！遺伝子実験（実験手順）

## ◇マイクロピペットの使い方

試薬の調整や PCR などの遺伝子実験にマイクロピペットは必ず必要になります。自分で試薬調整を行うだけでなく、生徒に行わせる実験もありますので、使い方を覚えておくことをお勧めします。

### [操作]

(1)目盛り調節ダイヤルを回してセットする【図 22】。



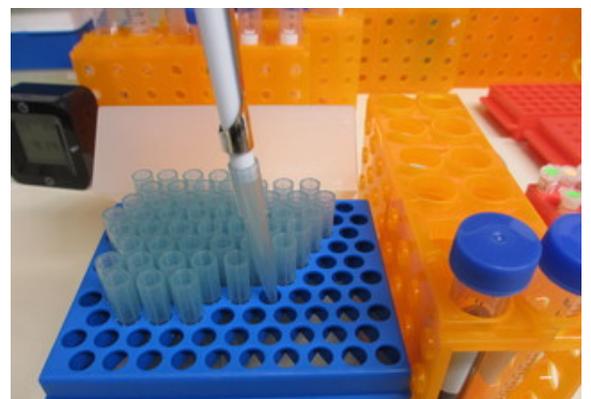
【図 22】マイクロピペットの目盛りの読み方

(2)親指でプッシュボタンとチップイジェクターボタン(p. 7, 【図 10】参照)を押せるように、片手でハンドグリップを握る【図 23】。



【図 23】マイクロピペットの握り方

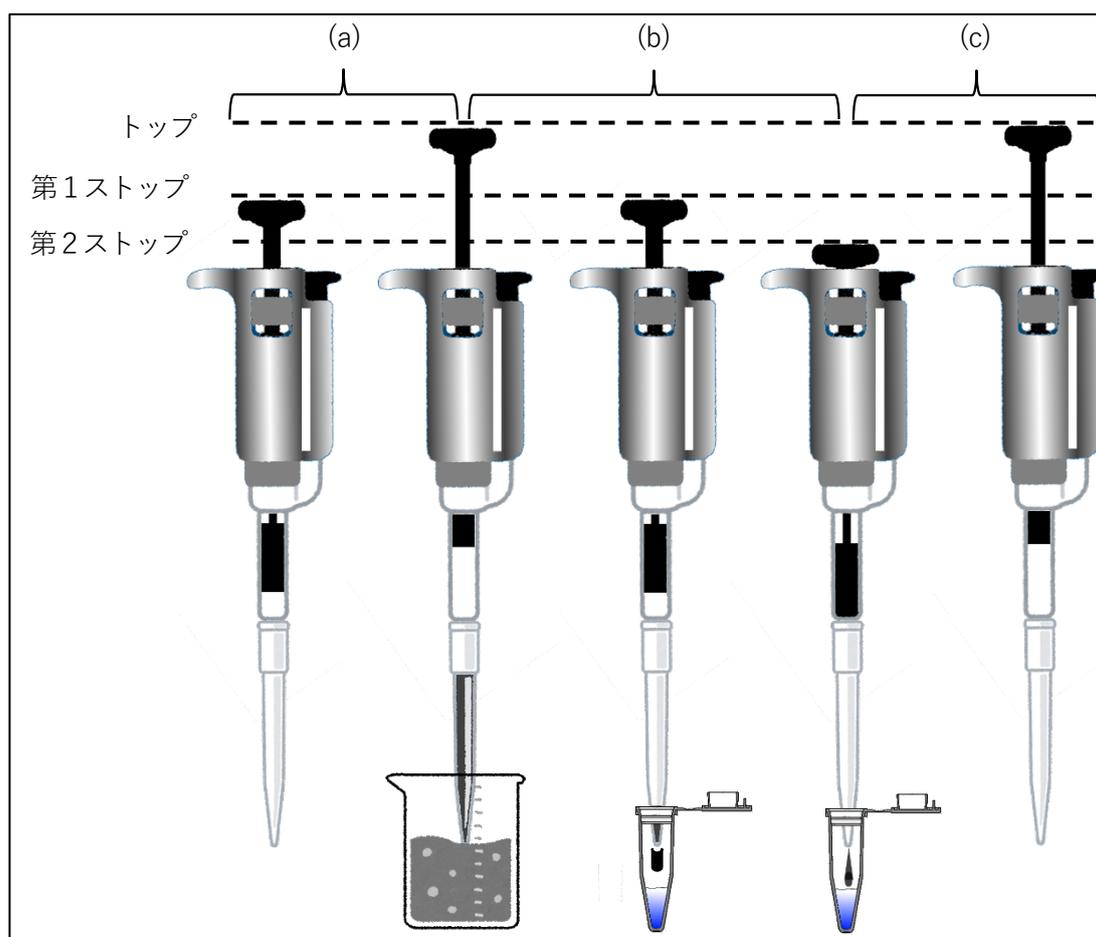
(3)ピペットチップラック【図 24】は、あらかじめ滅菌したものを用意する。そのふたを開け、ピペットチップにチップホルダーの先端を差し込んで装着する。P1000 は青色、P200 と P20 は黄色、P2 は白色のピペットチップを使用する。ピペットチップとチップホルダーの間から空気が漏れないように、装着したピペットチップでチップラックを軽くトントンと叩くように押し込んで装着する。装着後チップラックのふたを閉める。



ピペットチップラックに直接ピペット本体を差し込んでチップをしっかりと固定する。

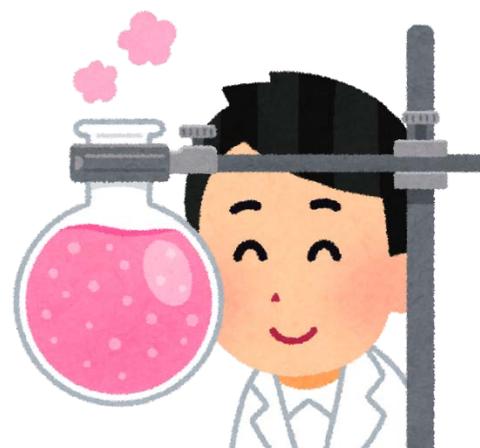
【図 24】ピペットチップの取り出し方

- (4) プッシュボタンをトップから第1ストップまで押し込み、その状態のままピペットチップの先端を液につけ、ゆっくりかつ滑らかにプッシュボタンをトップまで戻して液を吸い上げる【図25(a)】。
- (5) ピペットチップの先端を容器内に入れ、プッシュボタンをゆっくりと第1ストップまで押し下げて液を排出する。第1ストップで一度止めたプッシュボタンを続けて第2ストップまで強く押し下げ、ピペットチップ内に残った液を完全に排出する【図25(b)】。
- (6) プッシュボタンをトップまでゆっくりと戻す【図25(c)】。



【図25】 マイクロピペットのプッシュボタンの使い方

- (7) イジェクターボタンを親指で押してピペットチップを取り外す。ピペットチップは測りとする液体が変わるたびに交換する。

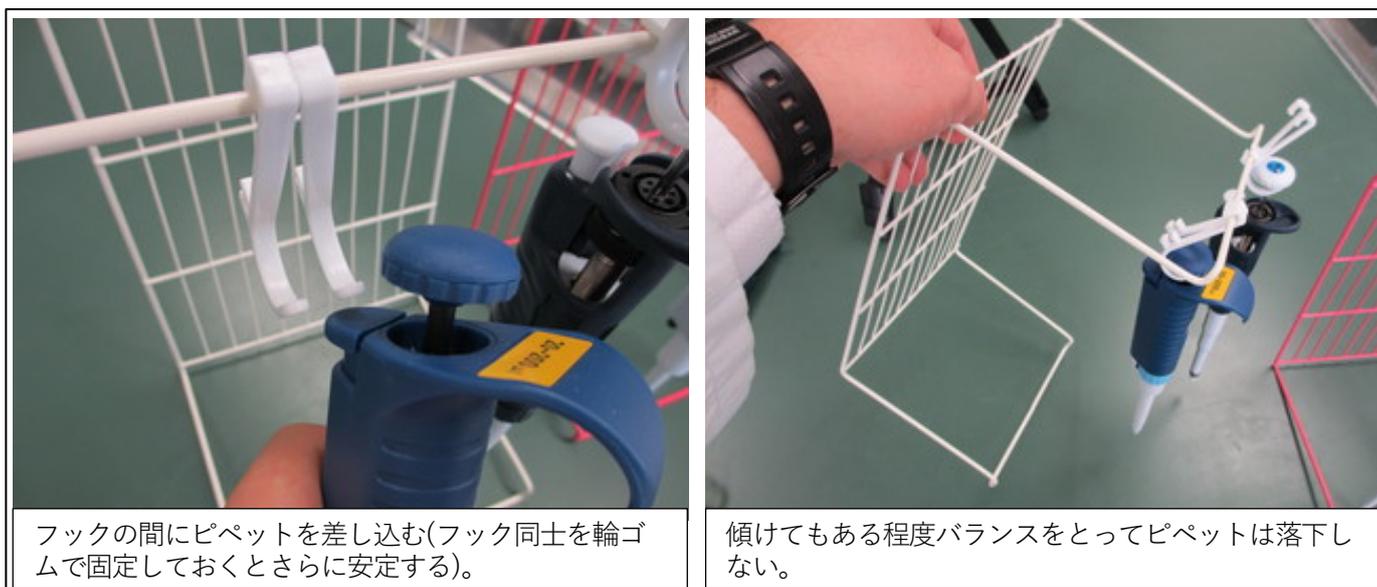


## [注意点]

- ・必ずピペットチップを装着して液を吸い上げること。
- ・液を吸い上げた状態でマイクロピペットを逆さまにしないこと。
- ・液を吸い上げる際に、マイクロピペット本体まで液を吸い込まないように注意してゆっくり操作すること。特に吸い上げ途中でプッシュボタンから指を離すことは絶対にしないこと。また、できるだけ滑らかに動かすよう注意する。吸い上げ開始から完了まで 1～2 秒かけるのが適正な速度である。また、マイクロピペット作業中に本体まで液を吸い込んでしまった場合は、速やかに分解し、洗浄や乾燥を行う必要がある。
- ・マイクロピペットの保管については、下に示した安価に製作できるピペット立てを使うと、生徒への配布や回収、管理などが簡単に行える。



【図26】安価で製作できるピペット立て



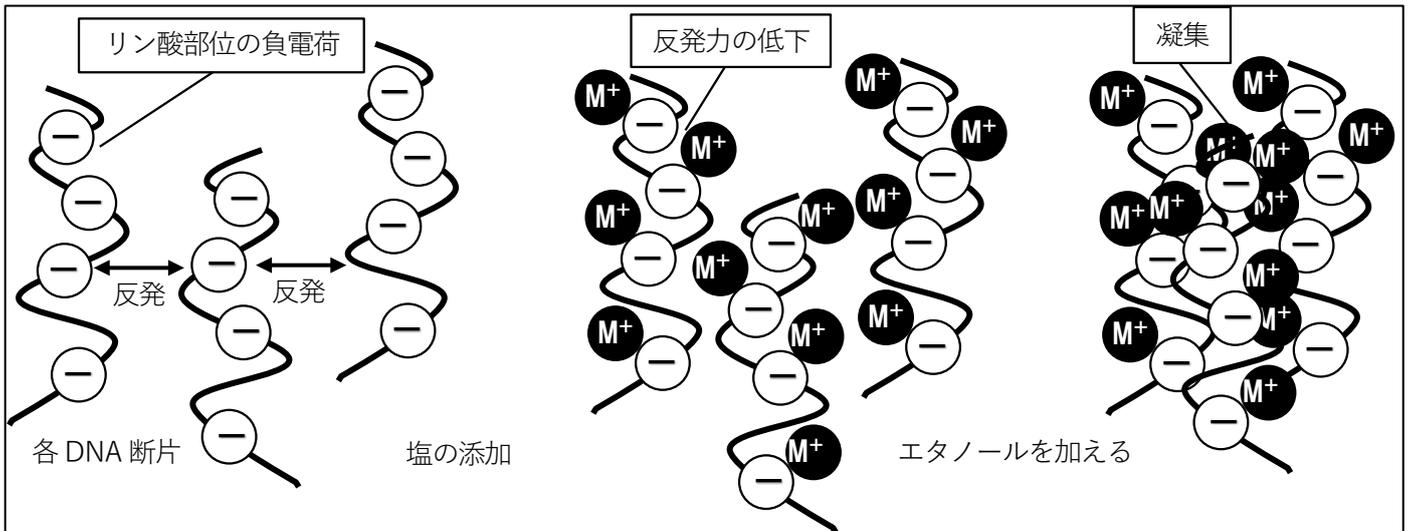
【図27】ピペット立ての使い方

# (1) DNA 抽出



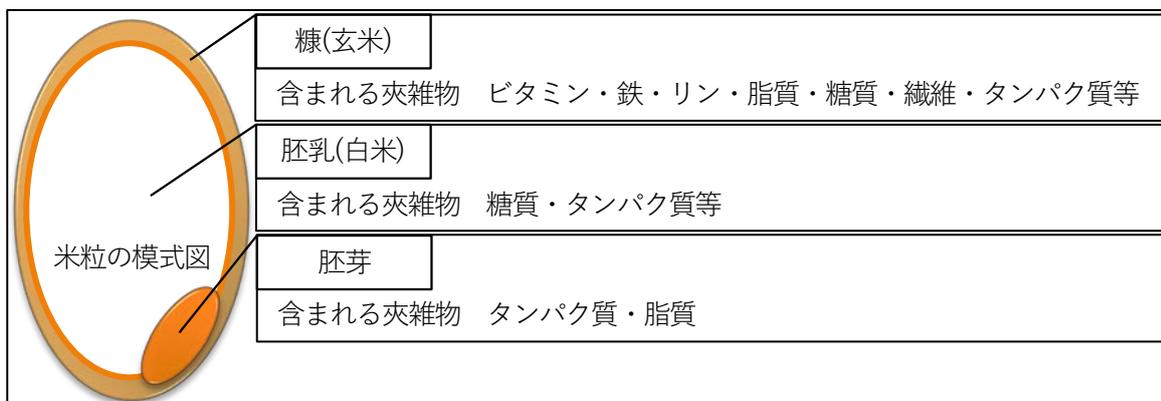
## ① DNA 抽出の準備

DNA 抽出に用いられるエタノール沈殿は、DNA を塩とアルコールを使って析出させる方法です。DNA を構成している核酸は、塩基とアルコールに溶けにくい糖・リン酸から成るヌクレオチドがつながったものです。DNA 中のリン酸基は負電荷を帯びているため、DNA 同士の静電的な反発が起きてしまい、そのままアルコールを加えても析出しません。そこで、核酸の水溶液に塩を加えることで発生する陽イオンによって反発を打ち消して析出しやすくするのがエタノール沈殿の原理【図 28】です。



【図 28】 エタノール沈殿の原理

また、粗抽出された DNA には、タンパク質や糖質などの夾雑物が多く含まれており【図 29】、通常はそのまま PCR に用いることはできません。そこで加熱や試薬を加えることでタンパク質や糖質を除去し、DNA の純度を高める必要があります。



【図 29】 米粒に含まれる DNA 以外の夾雑物

本書では兵庫県立農業研究センターの手法を参考に開発した抽出方法で DNA を抽出する方法を紹介しています。この方法では、夾雑物の除去に一般的に使われている劇物のフェノール・クロロホルム処理を行わず、加熱処理によって夾雑物を分離しやすくし、エタノール沈殿を 2 度行うことで DNA の純度を高めています。

## [実験に必要なもの]

### 実験器具

1.5mL マイクロチューブ(1種類のコメから抽出するために3本使用する), マイクロピペット, 乳鉢, ボルテックスミキサー※, 恒温槽などサンプルを加熱する器具, 遠心分離機, 真空エバポレーター(減圧乾燥機)※

※所持していなくても実験できます。

### 使用する材料・試薬

各品種のコメ 5粒(約0.1g) ※, DNA 抽出液, 99%エタノールもしくはイソプロピルアルコール(2-プロパノール), 70%エタノール, TE 溶液, 蒸留水

※教科書ではひとめぼれ・あきたこまち・コシヒカリを用いて実験を行っていますが, 本書では同様の結果が得られ, なおかつ教科書に結果が掲載されていない金色の風・銀河のしずく・コシヒカリを用います。

## [DNA 抽出液の調整]

DNA 抽出液は, DNA を保護する Tris - HCL 緩衝液と EDTA, 塩によって DNA の凝集を助けるための NaCl と細胞膜等を破壊して DNA を取り出しやすくする界面活性剤である SDS で構成されています【表 13】。

【表 13】 DNA 抽出液の調整に必要な試薬

試薬もしくは溶液	10mL	50mL	100mL	最終濃度
1M Tris-HCL	2mL	10mL	20mL	200mM
5M NaCl	0.5mL	2.5mL	5mL	250mM
0.5 M EDTA(pH8.0)	0.5mL	2.5mL	5mL	25mM
10%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)	0.5mL	2.5mL	5mL	0.5%
蒸留水	適量	適量	適量	

### ●100mL 作成する場合

- (1)50mL の蒸留水に各試薬を入れ, よく混ぜ合わせる。
- (2)100mL になるように蒸留水でメスアップする。
- (3)実験の状況に応じてコニカルチューブ等に分注する。
- (4)常温保存する。(SDS が含まれているのでオートクレーブは行わないこと)

※SDS は細かい粒子のため, 扱う際には手袋やマスクを装着する。

## ②DNA 抽出の流れ

(1) 米粒を 5 粒(約0.1g)に1000 $\mu$ LのDNA抽出液を添加する

↓

(2) 米粒に抽出液が浸透するとつぶしにくくなるため速やかに砕く

※乳液状になるまですりつぶす

↓

※他品種の米粒と混じらないように注意する

(3) 1.5mL マイクロチューブに採取してボルテックスミキサーで攪拌する

※ミキサーがない場合、マイクロピペットで抽出液を

↓

何度か吸い上げ・放出を繰り返し(ピペッティング)懸濁する

(4) 65°Cで10分間保温(インキュベート)する

↓

※ヒーターや恒温槽を使用する

(5)  $\times 12,000$ rpmで10分間遠心分離する

↓

(6) 400 $\mu$ Lの上清を採取し、別の1.5mL マイクロチューブに入れる

↓

※沈殿物の混入を防ぐため、少なく採取してもよい

(7) 99%エタノール800 $\mu$ Lをよく混合して10分間室温に静置する

↓

※上清の2倍量のエタノールを入れる

### [抽出作業のポイント]

- ・米粒が多いほど抽出量は多くなりますが、夾雑物も増えるため 1.5mL マイクロチューブを使用する場合は、5粒で行ってください。
- ・99%エタノールを混合後は、24時間程度であれば実験を中断することができます。冷蔵庫等で保管してください。

(8)  $\times 12,000$ rpmで10分間遠心分離する

↓

(9) 上清を捨て、キッチンペーパー上で逆さまにして10分間乾燥する

↓

※ドライヤーで乾燥してもよい

(10) 200 $\mu$ LのTE溶液を加えピペットで懸濁し、

$\times 12,000$ rpmで5分間遠心分離する

↓

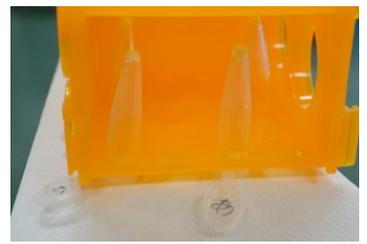
・すりつぶしが足りないと分離するので注意する。



・タイマー付きのドライヒーターなどで加熱する。



・マイクロチューブを逆さまにして乾燥する際はチューブバックで固定すると転倒しにくい。



(11) 170 $\mu$ Lの上清を採取して、別のマイクロチューブに入れ、

5 MのNaClを10 $\mu$ Lと99%エタノール350 $\mu$ Lを加え攪拌する

※沈殿物を採取しないように注意する

↓

※エタノールを除きNaClが0.25mMになるように加える

[エタノール沈殿のポイント]

・NaClは、0.25mM以上の濃度になっていれば多少濃くても問題ありません。

(12)  $\times$  12,000rpmで2分間遠心分離する

↓

(13) 上清を捨て、70%エタノールを1 mL加える

↓

※抽出中に加えられた塩などの試薬を除去する

(14)  $\times$  12,000rpmで1分間遠心分離する

↓

(15) 上清を捨て、真空エバポレーターで10分間乾燥する

※真空エバポレーターは、真空ポンプによって減圧された状態で遠心することで減圧乾燥させる装置です。総合教育センターにあるものを利用することができます。(p.61)

↓

※キッチンペーパー上で逆さまにして乾燥してもよい

※ドライヤーで乾燥してもよい

(16) 50 $\mu$ LのTE溶液に溶解し、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で保管する

※本書ではDNA抽出液の冷凍保存にTE溶液を用いています。が、TE溶液がPCRを阻害するとの理由から、蒸留水での保管を紹介しているものもあります

↓

(17) PCRに使用する場合は、0.5~1 $\mu$ Lを用いる

[人力遠心分離機を使ったDNA抽出に関して]

p.52に示した人力遠心分離機を用いてDNA抽出を行う場合は、(6)で採取する上清を400 $\mu$ Lから200 $\mu$ Lに減らして沈殿物ができるだけ入らないように注意してください。ただし、この操作によって全体的なDNA抽出液の濃度が薄くなってしまいますので、PCRに用いる際にはDNA抽出液を倍量にして使用してください。



・真空ポンプと真空エバポレーターによる乾燥

## (2) PCR

### ①PCR の準備

コメから抽出した DNA を用いて、いもち病耐性遺伝子 *Pii* とコシヒカリ由来の塩基配列を PCR で増幅します。

[実験に必要なもの]

#### 実験器具

##### ①サーマルサイクラーで行う場合(p.33)

PCR用マイクロチューブ（1品種につき1本），マイクロピペット，遠心分離機<sup>\*</sup>，サーマルサイクラー

##### ②人カサーマルサイクラーで行う場合(p.34)

PCR用マイクロチューブ（1品種につき1本），マイクロピペット，遠心分離機<sup>\*</sup>，恒温槽3台(もしくは

p.31 に示した代替する器材)，マイクロチューブの固定具(p.35)

※所持していなくても実験できます。

#### 使用する材料・試薬

各品種の DNA 抽出液，4種類のプライマー(Piia, Piib, Rca, Rcb)，Taq ポリメラーゼ(Sapphire Amp

Taq)，蒸留水

[PCR 反応液の調整]

PCR 反応液は，DNA 合成酵素(Taq ポリメラーゼ)，dNTP，緩衝液，プライマー【表 14】，DNA 抽出液，蒸留水で構成されています【表 15】。ここでは，dNTP と緩衝液が添加済みの Sapphire Amp Taq を用いて効率的に準備ができるようにしています。また，PCR 反応液は，事前に用意できるものを教員が準備しておくことで，実験時間を短縮できます。

【表 14】各プライマーの役割

名称	塩基配列	役割	
Piia	5'-CCGCAGTTAGATGCACCATTAGAATTGCTTCATTGCCTGTGGA-3'	フォワード	いもち病耐性遺伝子 <i>Pii</i> の遺伝領域を増幅する
Piib	5'-CCGCAGTTAGATCAAGTGGCAAGGTTCCATGTTTGGACTCAA-3'	リバース	
Rca	5'-TGGCCGGCATGACTCAC-3'	フォワード	コシヒカリ由来の塩基配列を増幅する
RCb	5'-ACTGGCCGGCATCAAGAC-3'	リバース	

※教科書に示されているプライマーの塩基配列を掲載した。

※プライマーの名称については，本研究で独自に設定したものである。

【表 15】 PCR 反応液の調整

試薬もしくは溶液	チューブ 1本あたり (1品種)	1班分 (3品種)	最終濃度
Sapphire Amp Taqポリメラーゼ (dNTPと緩衝液を含む)	12.5 $\mu$ L	37.5 $\mu$ L	1倍
蒸留水(DNA抽出液量によって変化)	9.5 $\mu$ L	28.5 $\mu$ L	
プライマーミックス液(0.5 $\mu$ Lずつ4種類を混ぜたもの)	2.0 $\mu$ L	各6 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
DNA抽出液(0.5~2.0 $\mu$ L)	1.0 $\mu$ L	3 $\mu$ L	
計	25 $\mu$ L	75 $\mu$ L	

(a)事前準備(生徒に行わせてもよい)

- (1) 【表 15】 に従って、Sapphire Amp Taq と蒸留水を PCR 用のマイクロチューブに入れる。
- (2) 各マイクロチューブに油性ペン(もしくは耐水シール)で品種を書き、判別できるようにしておく。

※Sapphire Amp Taq は 1 本に 1 mL 入っており、25 $\mu$ L で PCR 反応液を作成する場合、約 80 本分の実験が可能である。1 班につき 12.5 $\mu$ L  $\times$  3 品種分=37.5 $\mu$ L 消費するので、約 26 班分に相当する。

※Sapphire Amp Taq は解凍後 4 $^{\circ}$ C 以下で 3 ヶ月間の保管が可能のため、前日に小分けにして冷蔵庫で保管できる。

(b)直前に準備するもの

- (1) 全てのプライマー【表 14】を混ぜたプライマーミックス溶液を作成する(各プライマーを 0.5 $\mu$ L ずつ混ぜて 2.0 $\mu$ L にしたものを 1 品種分として、PCR を行うマイクロチューブの本数分の量を用意する)。

- (2) 事前準備した PCR 反応液の入ったマイクロチューブを 1 班につき 3 本用意する。

- (3) 班ごとに手分けをしてプライマーミックス液と DNA 抽出液を PCR 反応液に加える。

※チューブに書いた品種と DNA 抽出液の品種が合っているか確認させる。

- (5) 液体がマイクロチューブの壁面に飛び散らないように注意しながら、マイクロチューブを指先で優しくはじくようにして(タッピングという)溶液を混ぜる。

- (6) 陰性コントロールとして、1 本のチューブに蒸留水を 1.0 $\mu$ L 添加する(実験によっては省略可)。

- (7) マイクロチューブのふたがきちんとしまっているか、生徒同士で確認させる。

※壁面に液体がついている場合は、チューブをしっかりとつかんで下に強く振り下ろすか、小型遠心分離機を使って液体を下に落とす(フラッシュという)。



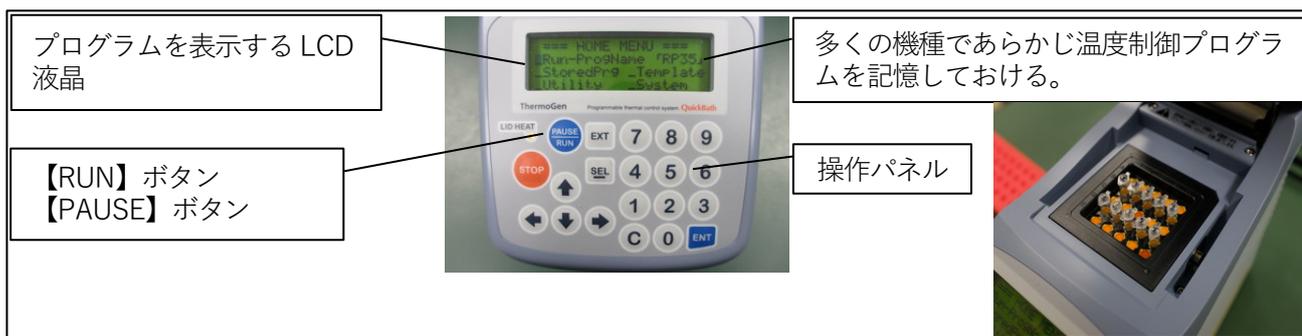
【図 30】 フラッシュの説明

## ②サーマルサイクラーでの実施

様々なサーマルサイクラーが販売されていますが、例として総合教育センターで貸し出しを行っているサーマルサイクラーについて、使用方法を示します(貸出しについては p.61)。

### [実験手順]

- (1)電源ケーブルをコンセントに接続し、背部電源ボタンを【ON】にする。ディスプレイが点灯したら、上部の蓋を開け、保護用のマイクロチューブを取り外す(必ず使用後は元の状態に戻すこと)。
- (2)【図 31】に示した操作パネルを使って、温度条件、サイクル数などを入力する【図 32】。



【図 31】サーマルサイクラーの操作パネル



【図 32】サーマルサイクラーに入力する PCR の条件

- (3)セットするチューブの容量や本数をサーマルサイクラーに入力し、【START】もしくは【RUN】ボタンを押す。
- (4)LCD 画面を見ながら装置が正常に稼働していることを確認する。【PAUSE】が表示されている場合は、装置が稼働していないので注意すること(反応が開始されると終了までの時間が表示される)。
- (5)反応終了のブザーが鳴ったら、【STOP】ボタンを押しマイクロチューブを取り出す。

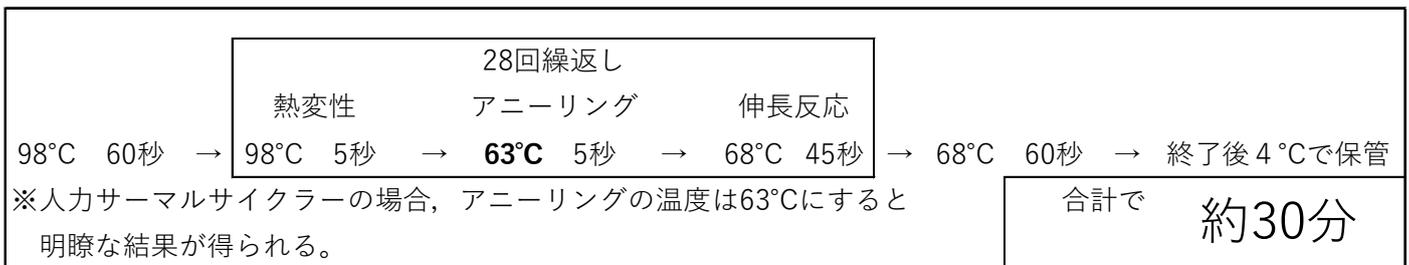
※反応終了後、通常の場合 4°C で保管するように設定してあるため、慌てて取り出す必要はない。

※装置全体が手で触れる程度に冷えていることを確認してから片付ける。

※近年使われているサーマルサイクラーの多くが、下からの加熱による PCR 反応液の蒸発を防ぐため、上部ヒーター(lid ヒーター)を装着している。上部ヒーターがない古い機種を使用する場合は、PCR 反応液の上部にミネラルオイルを積層して蒸発を防ぐ必要がある(総合教育センターで貸出ししているサーマルサイクラーには lid ヒーターが付属している)。

### ③人力サーマルサイクラーでの実施

県内の高等学校では、高額なサーマルサイクラーはほとんど配備されていません。そこでサーマルサイクラーが行っている温度制御を複数の恒温槽を用いて生徒自身が行う「人力サーマルサイクラー」の手法を導入し、器材不足の解消を図りました。また、この人力サーマルサイクラーでは直接恒温槽間を移動するため、加熱や冷却によるタイムロスがなく、前述(p.13)の Sapphire Amp Taq と併用することで、約30分でPCR反応が行えます【図33】。



【図33】 人力サーマルサイクラーで行うPCRの条件

#### [実験手順]

- (1)恒温槽3つを1セットとして用意する【図34】。(コンセントの最大電流に注意する。あらかじめお湯を沸かしておく消費電力が少なくなり、ブレーカーが落ちる危険性を回避できる。)
- (2)それぞれの恒温槽を98°C、63°C、68°Cに設定する。98°Cはお湯の量が減りやすいので注意する。特にアニーリングは厳密に温度をコントロールすることが望ましいので、デジタル温度計があるとよい。

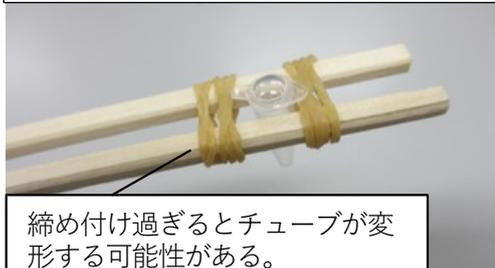


【図34】 人力サーマルサイクラー実施のための工夫

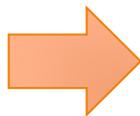
(3)PCR 反応液入りのマイクロチューブのふたがしまっているか確認し、割りばしや固定具に装着する【図 35】。

●従来の方法

割箸の間にチューブを挟み輪ゴムで固定する。



締め付け過ぎるとチューブが変形する可能性がある。



熱湯に手を入れないように注意させる

●本書でお勧めする固定具

1本ずつ加熱するタイプ



ダブルクリップ

防水糸

クリップに紐を通し釣針カバーで覆うようにする

釣針カバーを利用し、圧力を蓋にかけない。

防水糸を使うため、自由に熱源から距離をとれる。手を放しても保護ケースによりチューブは守られる。



3本同時に加熱できるタイプ



安価な玩具を利用 (ハンドスピナー)

ダブルクリップ

隙間にマイクロチューブを入れる。

チューブを入れた後でクリップを中心方向に押し込む。

中心に防水糸を通す



【図 35】 マイクロチューブの固定方法

(4)教員の合図で、98°Cに1分間マイクロチューブをつけ、その後 98°C5 秒→63°C5 秒→68°C45 秒の温度変化を 28 サイクル繰り返す。最後に 68°Cに1分間つけて実験操作を終了する(1時間以上放置する場合は水冷する)。

[注意点]

- ・マイクロチューブの漏れや破損を想定して予備や事前に作成した演示用の PCR 産物を用意しておくといよい。
- ・人力サーマルサイクラーは、恒温槽に浸かっている時間を多少変えても、基準の時間より長ければ成功する。特に、伸長反応は浸している時間を増やした方が明瞭なバンドパターンが得られる。

[他の器材で代替する方法について]

他の器材で代替する方法では、98°Cをガスコンロにすることで消費電力を抑えている。また、高額な恒温槽に代わって、より安価な電熱線調理器等とサーモスタットを組み合わせ、厳密な温度管理を可能にしている【表 16】。

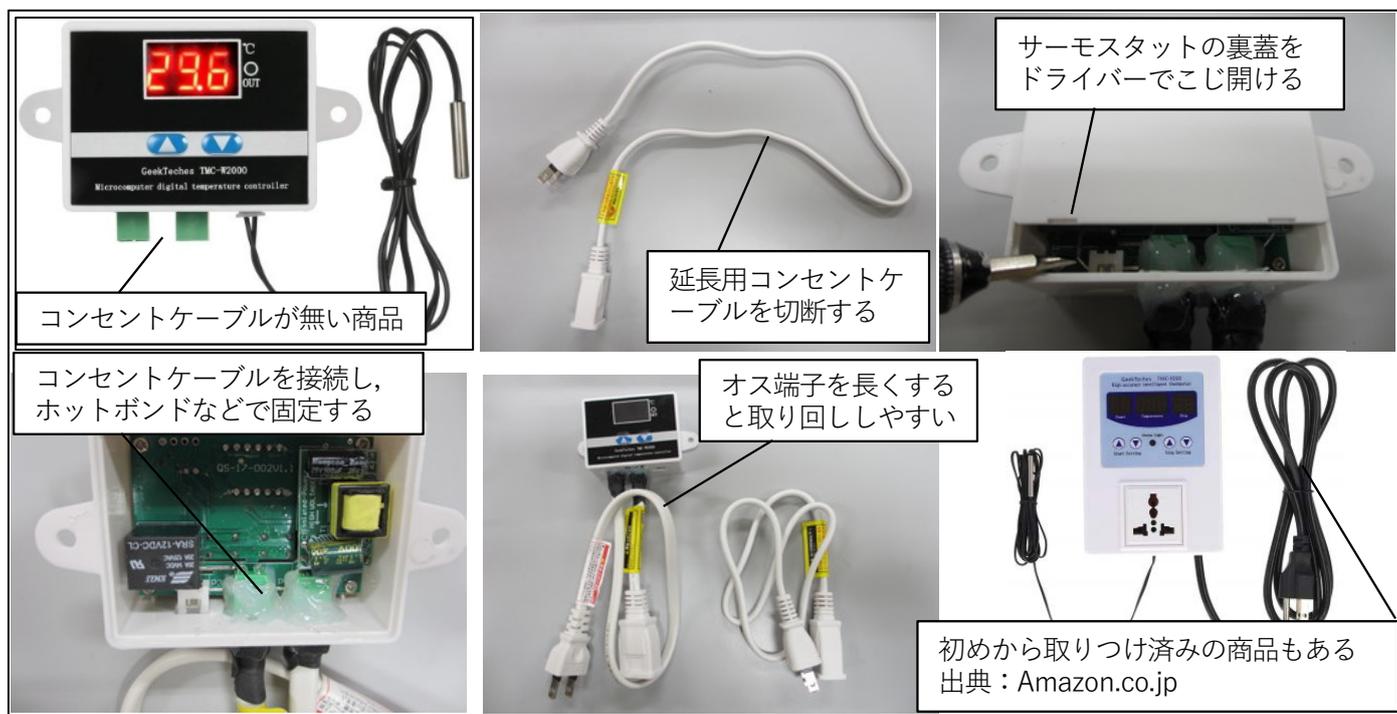
【表 16】 人カサーマルサイクラーに使用する実験器材の費用の比較

●恒温槽を用いる場合				●他の器材で代替する場合			
実験器具	費用	個数	合計	実験器具	費用	個数	合計
恒温槽	30,000	3	90,000	電熱線調理器	5,500	2	11,000
				サーモスタット	1,700	2	3,400
合計			¥90,000	合計			¥14,400

電熱線調理器とサーモスタットの組み合わせで実験を行うときは、設定温度に到達後、電熱線調理器の発熱量の設定を弱めておくと、温度がコントロールしやすい。サーモスタットは、設定温度に対して±0.5°Cで電化製品のスイッチがON/OFFになるように設定する。

[サーモスタットについて]

安価なサーモスタットの中には、日本規格のコンセントケーブルが付属していないものがあります。その場合は、100円均一ショップで販売している延長用のコンセントケーブルを加工して取りつける必要があります。電子工作に不安を感じる場合は、3,000円以下で日本規格のコンセントケーブルを取りつけて販売している商品がありますのでそちらの使用をお勧めします【図 36】。

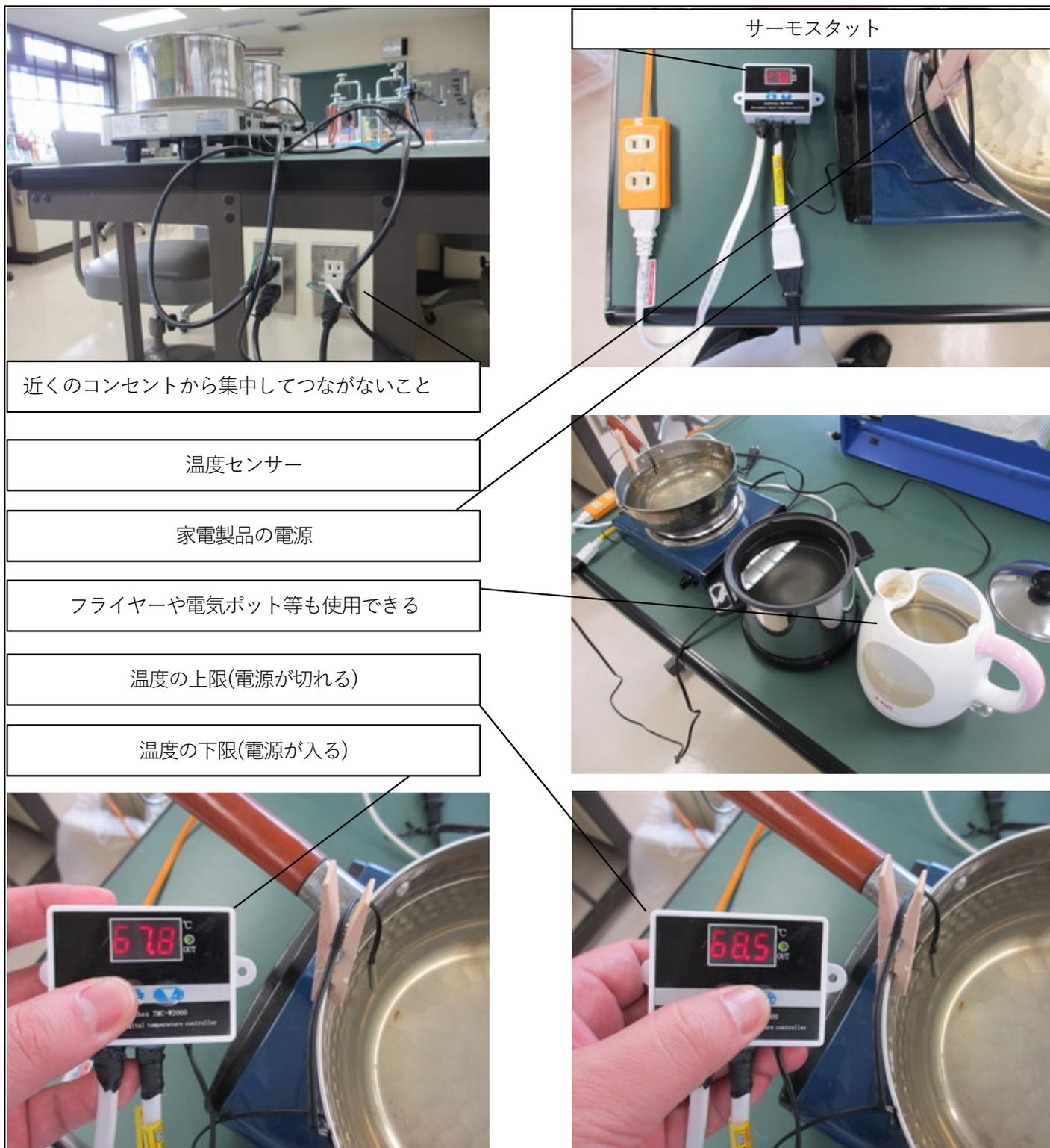


【図 36】 サーモスタットへのコンセントケーブルの取り付け

[サーモスタットを用いて人力サーマルサイクラーを行う利点]

サーモスタットを用いて人力サーマルサイクラーを行う場合、電気ポットやフライヤーなど、水を沸騰させる機能を持った家電製品を全て利用して実験ができるようになります。各学校に初めからある家電製品を利用して実験が行えるようになりますのでお勧めします。

また、サーモスタットはデジタル制御なので、水温の管理が簡単に行えます。教員の負担を減らす意味でもサーモスタットは優れています【図37】。

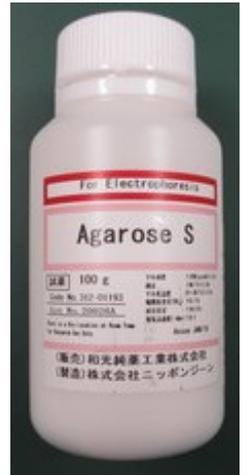


【図37】サーモスタットを用いて人力サーマルサイクラーを行う際の設定

### (3) 電気泳動

#### ①ゲルの作製方法

PCR産物の電気泳動に使用するゲルは、1%の濃度で作製します【表17】。作製するゲルの量は、ゲルトレイ(大)を使う場合は30mL、ゲルトレイ(小)は15mLとして計算します(大×2、小×4の場合、30×2+15×4=120mL)。教科書では2%で実験を行っていますが、1%でも問題なくバンドパターンが検出できます。



#### [調整方法]

【表17】アガロースゲル作製のための試薬

試薬もしくは溶液		15mL ゲルトレイ(小)	30mL ゲルトレイ(大)	200mL 10班分	最終濃度
アガロースゲル粉末		0.15 g	0.3 g	2 g	1%
50×TAE溶液		0.3mL	0.6mL	4mL	1倍
①	DNA染色液(SAFELOOK™プレグリーン)*	0.75μL	1.5μL	10μL	0.5μg/μL
	蒸留水	14.7mL	29.4mL	196mL	
②	DNA染色液(ViewaBlue® Stain)**	0.15mL	0.3mL	2mL	100倍希釈
	蒸留水	14.6mL	29.1mL	194mL	
③	DNA染色液(EtBr)	0.75μL	1.5μL	10μL	0.5μg/μL
	蒸留水	14.7mL	29.4mL	196mL	

\* ゲル100mLに5μL添加する。また泳動の際に+極側の泳動バッファーに5~10μL加える。  
 \*\* ゲル100mLに1mL添加する。十分な発色が得られない時は、原液を用いて後染めする。  
 ※①・③で染色したゲルは、②で後染めすることもできる。  
 ※先染めの場合は、染色液の分解を防ぐため、ゲルを冷却して60°C以下にしてから試薬を加える。

#### (a)電子レンジを使用して200mL(10班分)を作製する場合【図38】

(1)容器にアガロース2g、50×TAE溶液4mL、蒸留水196mLを加える。

※容器の壁面につかないように溶液にアガロースを入れて軽く混ぜること。

(3)突沸を防ぐため、三角フラスコを使う場合はラップを煙突状にまく。また、耐熱容器を使う

場合は付属の蓋をつけて、それぞれ500~600Wで30秒間電子レンジにかける。

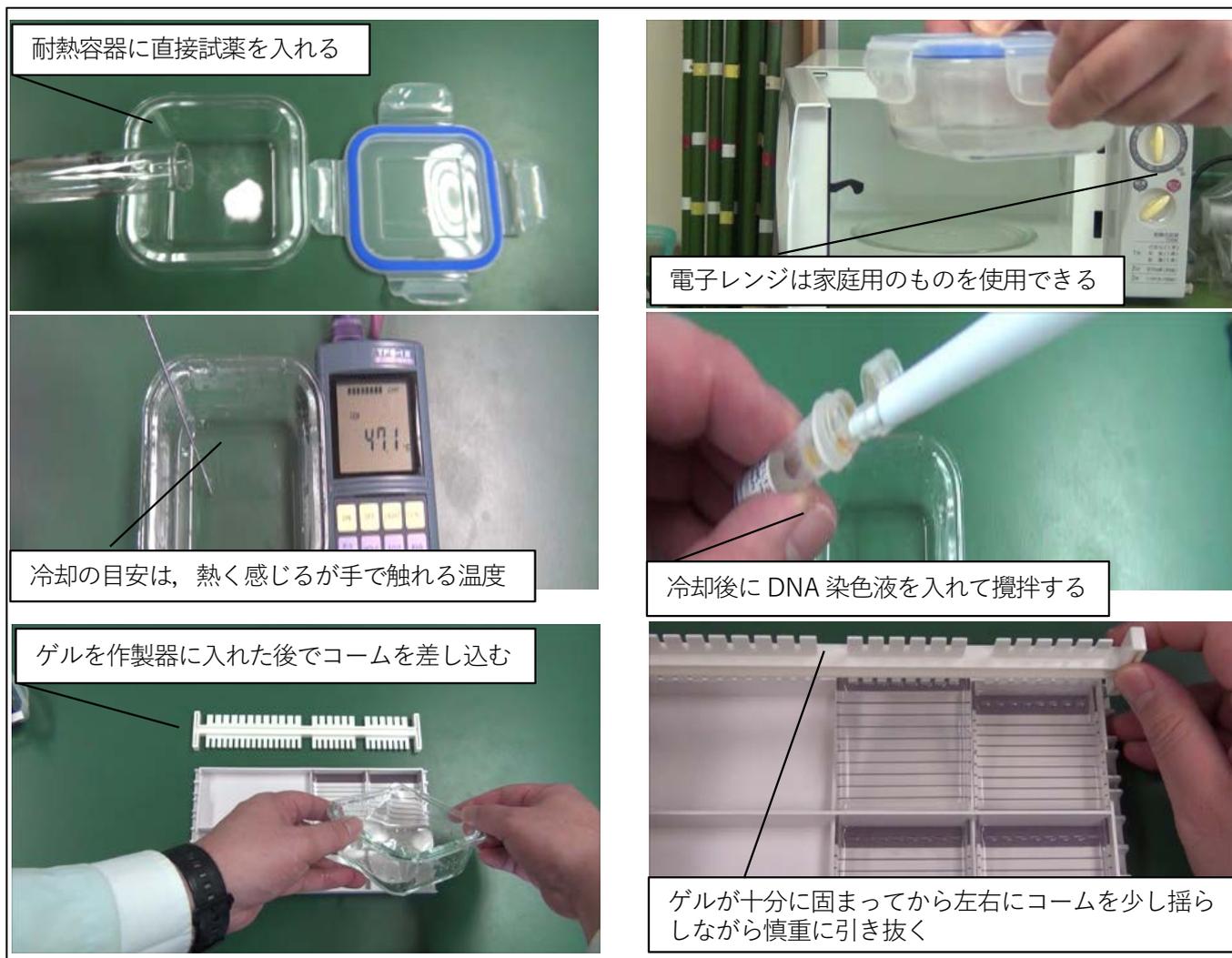
(4)加熱と確認を繰り返し、2~3回沸騰させる。(確認の際は、軍手着用の上、優しく振り混ぜること。)

(5)人肌より少し熱い程度に冷却してから染色液を加えて攪拌し、ゲル作製器に流し込む。

※ゲルを高温のまま作製器に入れると変形の可能性がある。また、作製後のゲルはもろいので取り扱いに注意する。

※ゲルは、ゲルトレイごとサランラップ等で包んで乾燥を防ぎ、冷蔵庫で保管すれば、数日間使用できる。





【図 38】耐熱容器を使ったゲルの作成

### (b) オートクレーブや圧力鍋を使用する場合

- (1) 200mL フラスコにアガロース 2g, 50×TAE 溶液 4 mL, 蒸留水 196mL を加える。
- (2) オートクレーブにかけ、火傷に注意しながらアガロースを溶かす。
- (4) 50～60°Cに冷却してから、ゲル作製器に流し込む。(DNA 染色液は冷却後に入れる)

## ②電気泳動について

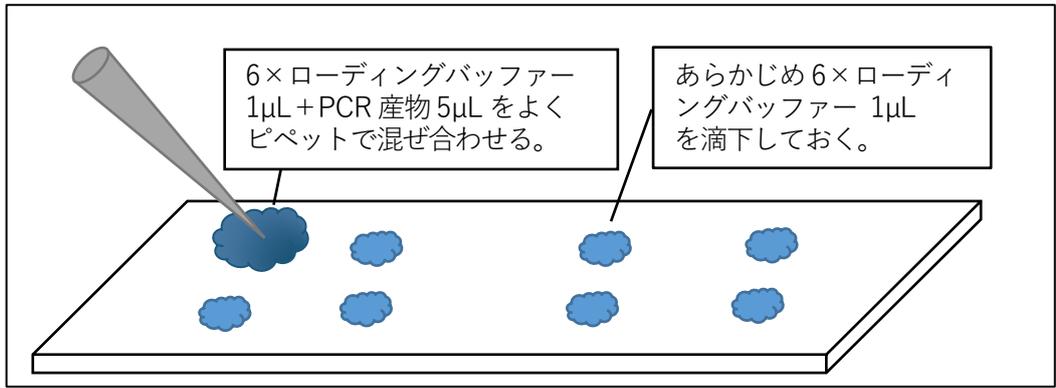
### [泳動用試料の調整]

#### (a) ローディングバッファーを用いる場合 【図 39】

通常の Taq ポリメラーゼを用いる場合は、PCR 産物にローディングバッファーを加える必要があります。

- (1) スライドガラスに、PCR 産物の数だけ、6×ローディングバッファーを 1μL ずつ滴下する。
- (2) PCR 産物を 5μL とり、スライドガラス上の 6×ローディングバッファーに加え、ピペットを使って混合する(ピペッティング)。

※PCR 産物同士が混じらないようにチップを変えて操作を行う。



【図 39】 ローディングバッファーの混合の仕方

(b) Sapphire Amp Taq を用いる場合

ローディングバッファーがあらかじめ混合されているため、PCR 産物をそのまま泳動できます(p.13)。

[電気泳動] 【図 40, 41】

(1)泳動槽にゲルをセットしてから、ゲルの上部まで浸るように泳動用バッファー(1×TAE 溶液)を入れる。

※必要に応じて蛍光染色液を加える。

(2)ゲルの1番左端のウェルに DNA サイズマーカーを 6 μL 注入し、2 番目のウェルから順に泳動する PCR 産物を 6 μL ずつ注入し、電気泳動を開始する。

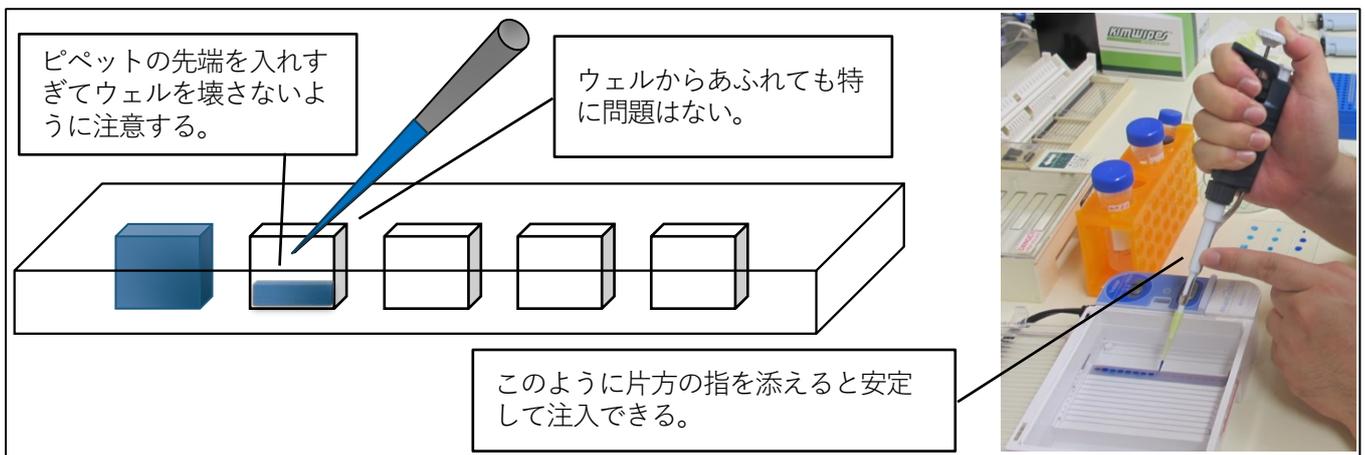
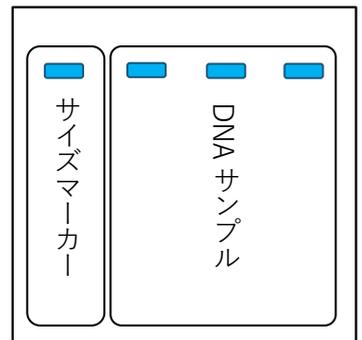
(3)ローディングバッファーの先頭がゲルの全長の 6～8 割程度(約 25 分間)まで進んだところで、泳動を終了する。

(4)泳動後、ゲルを取り出し UV トランスイルミネーターで結果を確認する。

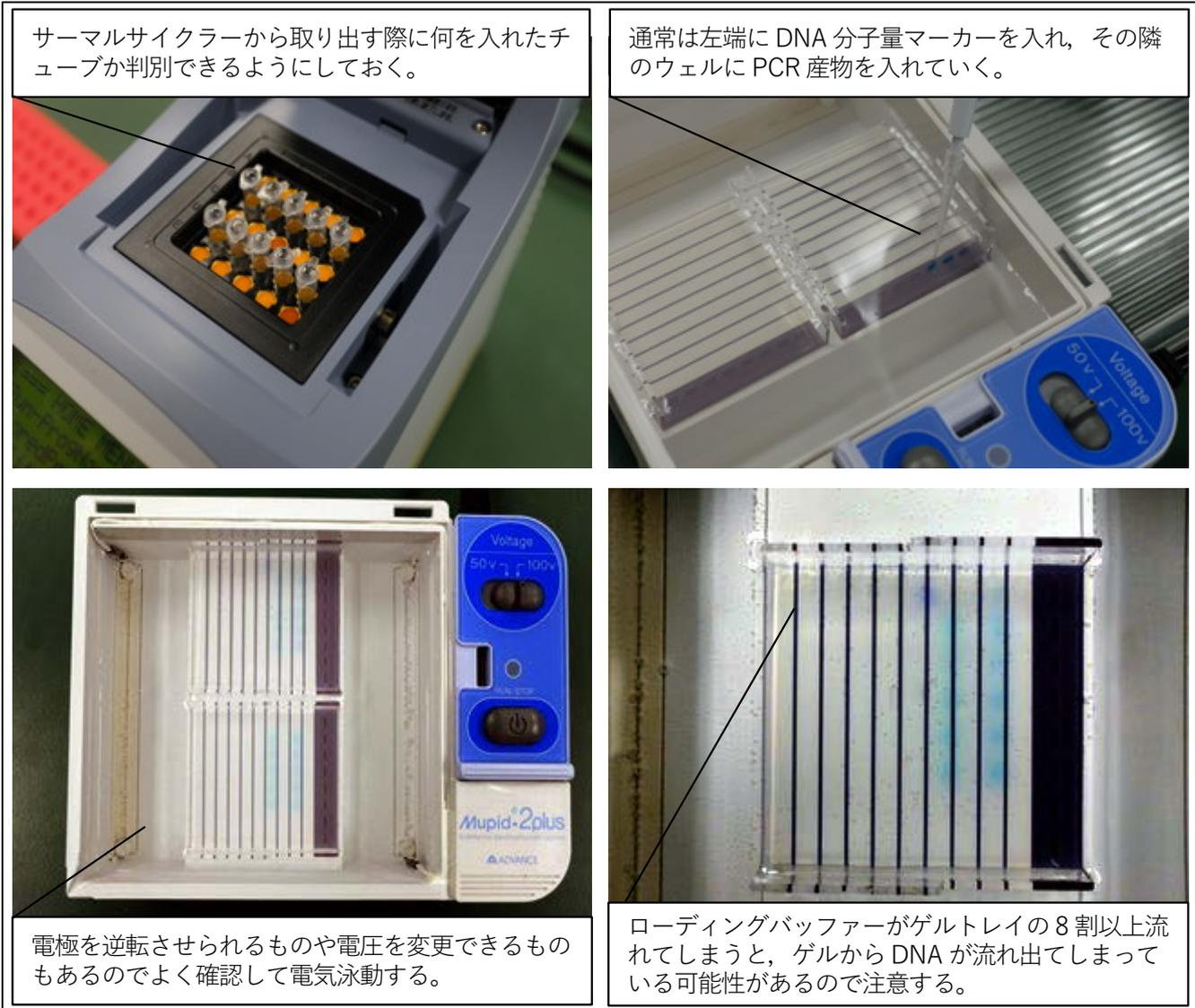
(5)泳動槽は、バッファーを捨てて蒸留水などで洗う。

※染色液による後染めをする場合は、ゲルトレイからゲルを外して別容器に移してから染色・脱色する。

※泳動バッファーは、2～3 回使いまわすことができるが、浮遊物等が現れた場合は交換する



【図 40】 PCR 産物注入の仕方



【図 41】電気泳動の流れ

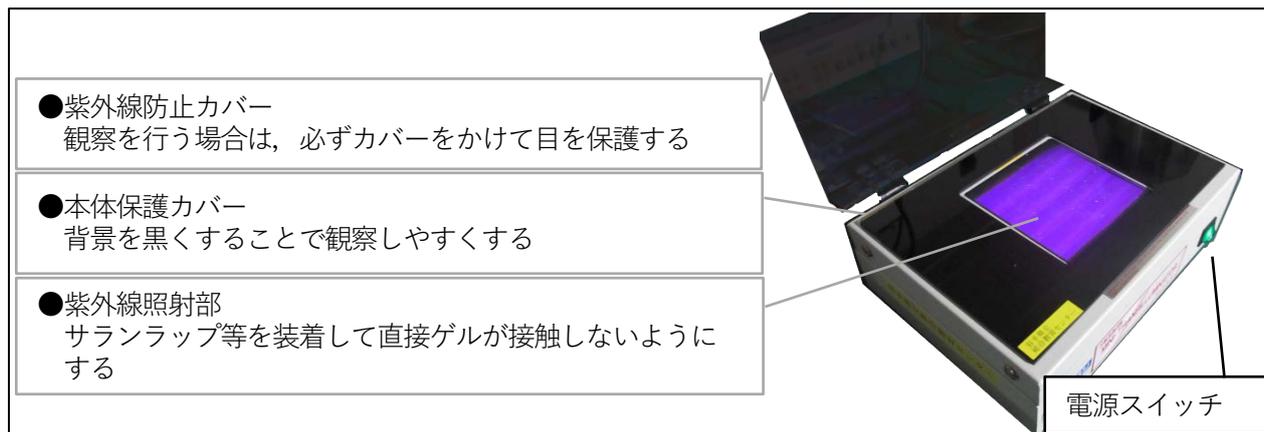


### ③ UV トランスイルミネーターの使い方

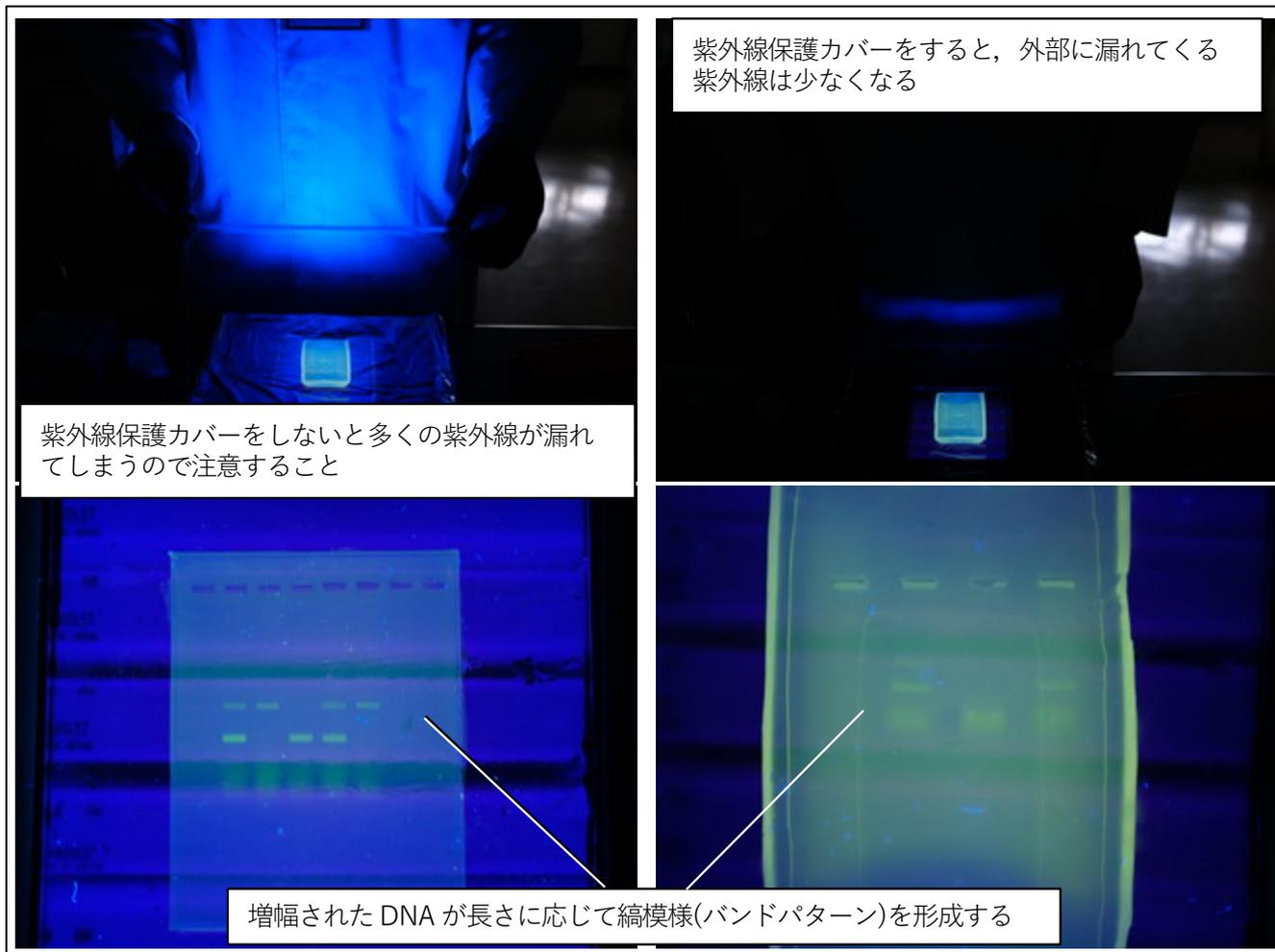
蛍光染色した PCR 産物のバンドパターンの確認するために使用する。強力な紫外線が照射されるため、透明(もしくはオレンジ色)の紫外線防止カバーが付属している。

#### [操作]

- (1) UV 照射面にゲルを置き、紫外線防止カバー(オレンジカバー)を適切な位置に調整します。
- (2) 本体と電源コードをつなぎ、電源コードをコンセントに差し込む。
- (3) 電源を入れて観察や作業を行う。



【図 42】 UV トランスイルミネーターの各部の名称と役割



【図 43】 UV トランスイルミネーターの使い方

# 実験を授業に取り入れる（授業展開案）

## ① マイクロピペットの使い方と電気泳動による DNA の分離の原理を学ぶ

※簡易的な電気泳動装置の作成については p.46～p.51 を参照してください。

### ・ 評価の観点

関心・意欲・態度	思考・判断・表現	観察・実験の技能	知識・理解
—	—	マイクロピペットの容量を変更し、正しく扱うことができる。 正確に溶液を吸い取ってゲルのウェルに注入できる。	電気泳動により DNA が分離する原理を理解している。

### ・ 授業展開

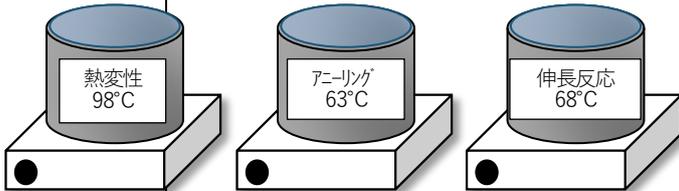
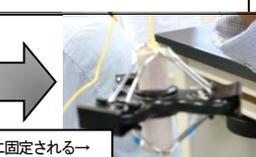
	学 習 活 動	指 導 上 の 留 意 点	評 価 規 準(方法)
導 入 10 分	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ バイオテクノロジーと現在の生活との関連性を認識する。</li> <li>・ 遺伝子を切断、結合、増幅する技術について学ぶ。</li> <li>・ 本時の実験内容を理解する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 遺伝子診断の CM を見せながら、生活との関連性を説明する。</li> <li>・ 生徒向け実験テキストを用いて、遺伝子操作する技術を説明する。</li> <li>・ マイクロピペットが遺伝子実験になくてはならないことを説明する。</li> </ul>	
	学習課題：遺伝子実験に必要なマイクロピペットを使えるようになって、DNA サイズマーカー( $\lambda$ -HindIII)を電気泳動し、DNA の分離がどのように行われるか理解する。		
展 開 35 分	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 実験道具の使い方をワークシートや説明を聞きながら確認する。</li> <li>・ マイクロチューブに入っているローディングバッファを 10<math>\mu</math>L 取り、空のマイクロチューブに移す(一人2回行う)。</li> <li>・ 電気泳動装置を使う際の注意事項や実験方法を確認する。</li> <li>・ 電気泳動装置にアガロースゲルをセットし、先ほど取り分けたローディングバッファを 10<math>\mu</math>L ずつアガロースゲルのウェルに注入する。最後に、DNA サイズマーカーが入ったマイクロチューブから 6<math>\mu</math>L をゲルに注入する。</li> <li>・ 15～20 分ほど電気泳動する。電気泳動中の様子を観察する。</li> <li>・ 使用した道具を片付ける。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 2人一組にマイクロピペット(P2, P20)とピペットチップ、DNA サイズマーカーの入ったマイクロチューブとローディングバッファの入ったマイクロチューブ、空のマイクロチューブを配付する。</li> <li>・ テキストやプレゼン資料を使い、マイクロチューブや、マイクロピペットの正しい使い方を説明する。生徒同士が協力して実験を行えるようサポートする。</li> <li>・ 机間指導をしながらピペットの使い方や全員が溶液の移動を行ったか確認する。</li> <li>・ 電気泳動装置を扱う際の注意事項を全員に確認させる。</li> <li>・ 机間指導をしながらピペットの使い方や全員がウェルに注入する操作を行っているか確認する。</li> <li>・ 電気泳動中にその原理を説明する。また、電気泳動中のアガロースゲルを観察させる。</li> <li>・ 片付けの指示をする。</li> </ul>	<p>【観察・実験の技能】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ マイクロピペットの容量を変更し、正しく扱うことができる。</li> </ul> <p>【観察・実験の技能】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 正確に溶液を吸い取ってアガロースゲルのウェルに注入できる。</li> </ul>
ま と め 10 分	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 電気泳動の結果についてテキストで、原理を確認する。</li> <li>・ 事前に用意した記録媒体でバンドパターンを撮影する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 電気泳動の結果から、DNA 断片は短いものから早く泳動されることを理解させる。</li> <li>・ 事前に用意させた記録媒体(デジタルカメラやスマートフォン等)にバンドパターンを撮影させる。</li> </ul>	<p>【知識・理解】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 電気泳動の結果を観察し、DNA が分離する原理を理解している。</li> </ul>

## ② 人力サーマルサイクラーを用いた PCR

### ・ 評価の観点

関心・意欲・態度	思考・判断・表現	観察・実験の技能	知識・理解
人力サーマルサイクラーを他の班員と協力して行うことができる。	—	—	異なる温度条件の反復により、DNA が増幅されることを理解している。

### ・ 授業展開

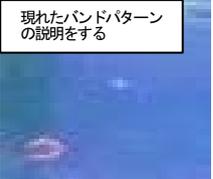
	学 習 活 動	指 導 上 の 留 意 点	評 価 規 準(方法)
導 入 5 分	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR の原理及びサーマルサイクラーが行っている温度制御を理解する。</li> <li>本時の実験内容を理解する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3 品種のコメの DNA 抽出液と PCR 反応液を準備しておく。</li> <li>恒温槽の水を下図のように加熱しておく。</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>実験テキストを用いて、本時の実験内容等を説明する。</li> </ul>	
学習課題：人力サーマルサイクラーでコメの遺伝子を増幅し、PCR の原理を理解する。			
展 開 45 分	<ul style="list-style-type: none"> <li>マイクロチューブ 3 本にそれぞれ DNA 抽出液(3 種類)、プライマー、Sapphire Amp Taq、蒸留水を規定量入れる。</li> <li>3 本のマイクロチューブを固定具に装着する。</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>マイクロチューブを 98°C で 1 分間加熱した後で、98°C で 5 秒、63°C で 5 秒、68°C で 45 秒の順で恒温槽につける作業を 28 サイクル行い、その後 68°C に 1 分間つける。</li> <li>人力サーマルサイクラーを行っていない生徒は、空いた時間を利用して PCR の原理を学ぶためのペーパークラフト(p.55)を完成させる。</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>終了後、マイクロチューブを長時間放置する場合は 4°C で保存する。(長期保存の場合は -20°C)</li> <li>使用した道具を片付ける。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>試薬をマイクロチューブに確実に入れさせる。プライマーや DNA 抽出液は誤って多く入れても問題なく反応するので生徒を慌てさせないようにする。</li> <li>役割分担させて、できるだけ素早く準備を行えるようにする。</li> <li>マイクロチューブのふたがきちんとしまっているか確認させる。</li> </ul>   <ul style="list-style-type: none"> <li>2 人一組で行い、7 サイクルごとに生徒を交代させることで全員に人力サーマルサイクラーを経験させる。</li> <li>やけどをしないように、特に 98°C の恒温槽周辺では注意させる。</li> <li>ペーパークラフトを行う生徒に手順を説明する。</li> <li>事前にはさみとのりを用意しておく。</li> </ul>	<p>【関心・意欲・態度】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>人力サーマルサイクラーを他の班員と協力して行うことができる。</li> </ul>
ま と め 5 分	<ul style="list-style-type: none"> <li>人力サーマルサイクラーで行ったそれぞれの温度設定でどんな現象が起きていたか再度考える。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>人力サーマルサイクラーで行った 3 つの温度設定の意味を解説し、DNA が増幅される過程を理解させる。</li> </ul>	<p>【知識・理解】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>異なる温度条件の反復により、DNA が増幅されることを理解している。</li> </ul>

### ③岩手県産品種のイネを使った遺伝子判定実験

#### ・評価の観点

関心・意欲・態度	思考・判断・表現	観察・実験の技能	知識・理解
—	PCRの結果を基に、岩手県産品種のコメがどのような遺伝的性質を持っているか判断できる。	—	—

#### ・授業展開

	学 習 活 動	指 導 上 の 留 意 点	評 価 規 準(方法)
導入 5分	<ul style="list-style-type: none"> <li>電気泳動の仕方について実験テキストで確認する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3種類のコメのPCR産物を用意する。</li> <li>実験テキストを用いて、電気泳動について説明する。</li> </ul>	
	学習課題：PCRで増幅したイネのDNAを電気泳動し、県産品種の遺伝的性質を判定する。		
展 開 35分	<ul style="list-style-type: none"> <li>ゲルを電気泳動槽に設置し、1×TEA溶液をゲルが浸るくらいまで入れる。</li> <li>pHY マーカーを6μL取り、第一レーンに入れる。第二レーン以降は、金色の風、銀河のしずく、コシヒカリの順にPCR産物を入れる。</li> </ul>  <p style="text-align: center;">ゲルへの注入</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>電気泳動を開始する。(泳動の時間は概ね25分)</li> <li>電気泳動を行っている間に、今回行った実験や技術が、社会においてどのように使われているかを学ぶ。</li> <li>電気泳動後のゲルにUVライトを照射してバンドパターンを確認する。</li> </ul>  <p style="text-align: center;">現れたバンドパターンの説明をする</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>使用した道具を片付ける。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2人一組で実験を行う</li> <li>電気泳動装置は、2組に1台用意する。(簡易的な電気泳動装置を使用する場合は、1組に1台)</li> <li>マイクロピペットの設定や正しいピペットチップの選択及び装着を行っているか確認する。</li> <li>ゲルの向きを確認させる。</li> <li>ゲルを破損してしまった際は、空いているレーンに入れさせる(漏れてしまったPCR産物は気にする必要はない)。</li> <li>ローディングバッファーがゲルの6～8割の位置になるまで泳動することを確認させる。</li> <li>電圧が50Vになっていないか確認する。また、安全カバーがうまくはまっていないと通電しないので確認させること。</li> <li>テキストの資料を使って説明する。(教科書に掲載されていないが、ゲノム編集についても触れる)</li> <li>生徒にデジタルカメラやスマートフォンを用いて撮影させる。(第1時限に持ってきてよいことを指示)</li> <li>pHY マーカーを基に、バンドパターンがどのPCR産物であるか確認する。</li> </ul>	
ま と め 10分	<ul style="list-style-type: none"> <li>自分の班の結果と、教員がサーマルサイクラーで行ったPCR法の結果を比較して、人力サーマルサイクラーと同じことが機械によって行われていることを理解する。</li> <li>テキストを基に、岩手県産品種の遺伝的特性を分析し、発表する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>参考としてサーマルサイクラーで行ったPCR産物を電気泳動し、生徒に結果を比較させる。</li> <li>あきたこまちやひとめぼれのPCR産物の泳動結果も提示する。ひとめぼれと金色の風、あきたこまちと銀河のしずくがそれぞれ同様の遺伝的特性を持っていることを説明する。</li> <li>※まったく同じ遺伝子であると誤解させないように、資料を提示して解説する。</li> </ul>	<b>【思考・判断・表現】</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>電気泳動の結果と教科書の内容を比較して、岩手県産品種のコメがどのような遺伝的性質を持っているか判断できる。</li> </ul>

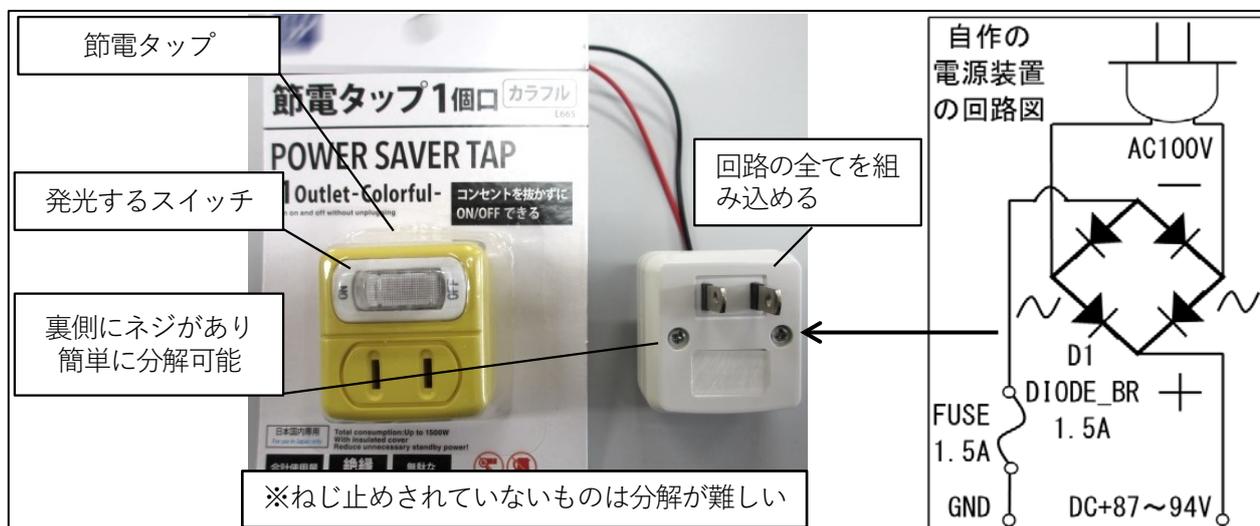
# 自作できる実験器具の作成

## ①電気泳動装置の作成と使い方

電気泳動装置は、交流電源を直流電源に変換する電源装置と、電流を水溶液中に流す電気泳動槽で構成されています。本書では、100円均一ショップなどで安価に購入できる部品を用いて電気泳動装置を作成する方法を紹介します。

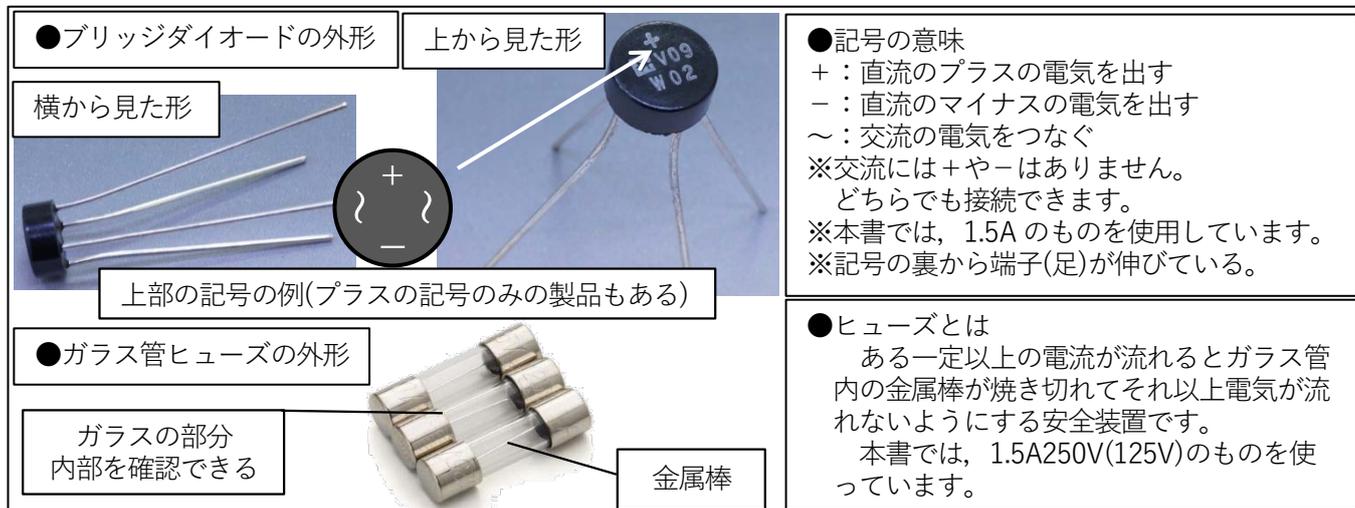
### [電源装置の作成]

電源装置の作成に必要な不可欠なのが100円均一ショップで購入できるスイッチ付き節電タップです【図44】。この節電タップは、裏のネジを外すと簡単に分解ができます。また、発光するスイッチが組み込まれているため、電源のON/OFFが分かりやすく、高電圧を使用する電気泳動では安全性の確保にもつながると考えられます。なおこの装置は、半田づけなしで作成が可能です。



【図44】電源装置作成で使用する節電タップ

この装置は、節電タップ内にコンセントから供給される交流100Vを直流100Vに変換する1.5Aのブリッジダイオードと安全装置である1.5Aヒューズを組み込んだものです【図45】。



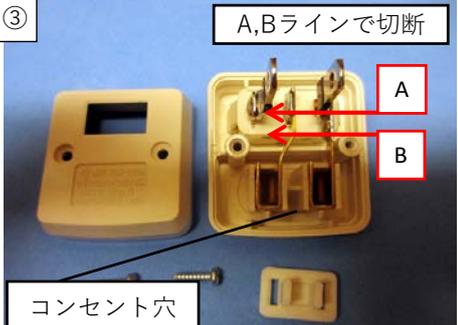
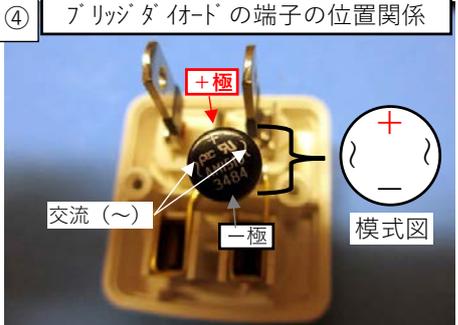
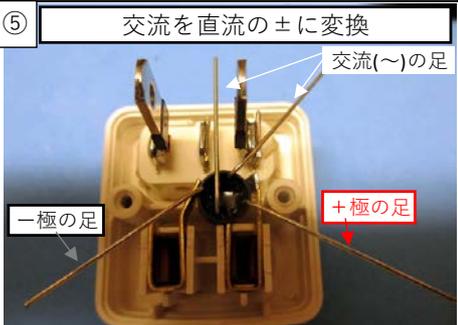
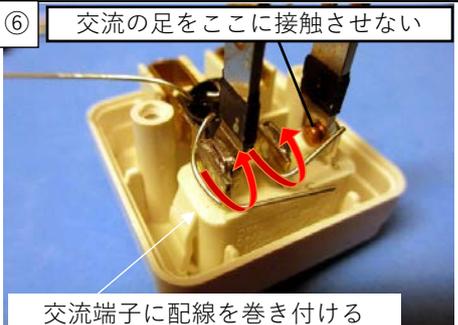
【図45】電源装置に組み込む電子部品

## [電源装置作成の手順]

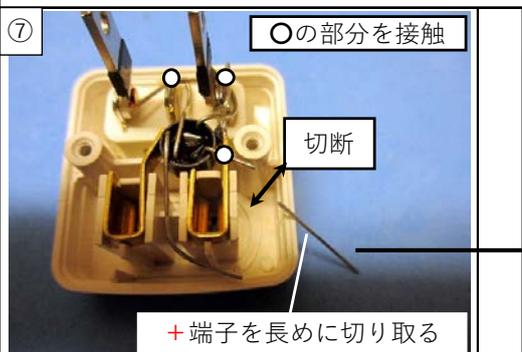
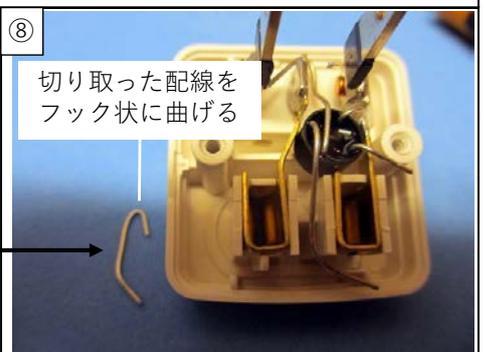
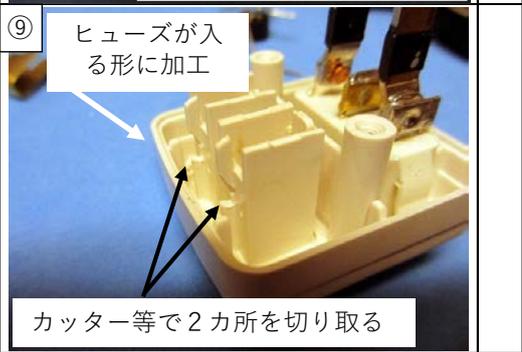
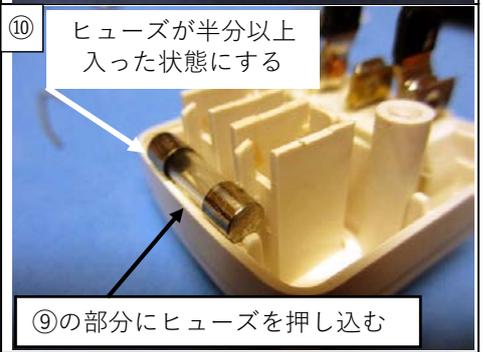
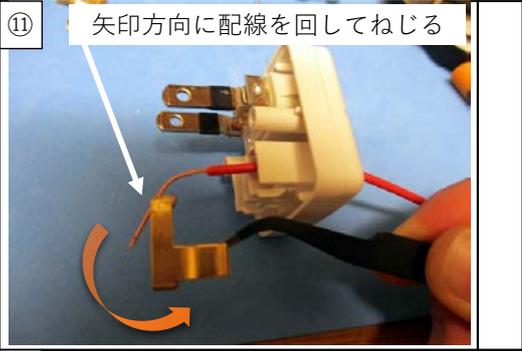
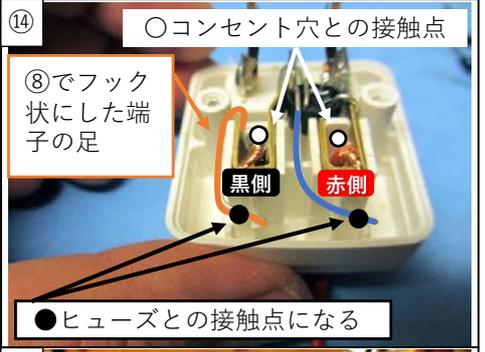
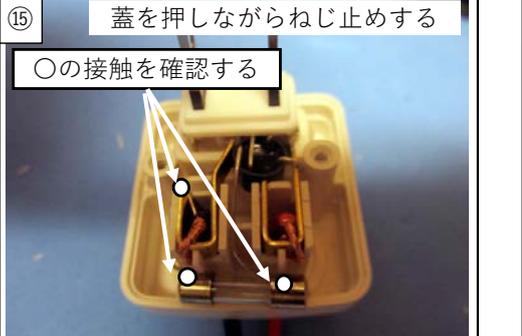
### 組立に必要な工具・材料

- 工具 プラスドライバー、ワイヤーカッター、熱収縮チューブ※、ワイヤーストリッパー※、半田ごて※
  - 材料 節電タップ、ワニ口クリップ(できれば色違い)×2本、ブリッジダイオード(1.5A)、  
ガラス管ヒューズ(1.5A・250V(125V)・20 mm)
- ※所持していなくても組立可能です。

下の組立て手順の②で金属板の配線を切断しますが、金属板にはある程度の厚さがあり、ニッパーでは刃が欠ける可能性がありますので、ワイヤーカッターを使うことをお勧めします。また、多数の配線の被覆を剥ぎ操作には、200円程度で販売されているワイヤーストリッパーを用いると効率的に作成できます。ブリッジダイオードとヒューズについては、インターネットで販売されています。個別店舗で購入する場合は、エレパーツ(住所：岩手県盛岡市三ツ割1丁目9-7、電話番号：019-681-3575)で購入できます。

	組立手順	図	解
1	<p>①ワニ口クリップの末端の被覆を5cm剥ぎ、ねじってまとめておく。</p> <p>②節電タップの裏ネジを外して、中の配線を露出させる。</p>	<p>① 配線の被覆を剥ぎ取る</p> 	<p>② 裏のネジを取り外す</p> 
2	<p>③2本の金属板の配線をAとBのラインで切断して、交流電流がコンセント穴の方に流れないように遮断する。</p> <p>④ブリッジダイオードの金属製の足を、表の印刷を見ながら確認して交流側、直流側に折り曲げる。</p>	<p>③ A,Bラインで切断</p>  <p>コンセント穴</p>	<p>④ ブリッジダイオードの端子の位置関係</p>  <p>交流(～)</p> <p>+極</p> <p>一極</p> <p>模式図</p>
3	<p>⑤右図のように、ブリッジダイオードをひっくり返して端子の間に押し込み、交流の足を上に、プラスを右に、マイナスの足を左側に折り曲げる。</p> <p>⑥交流側の足を端子にしっかりと接触するように巻き付ける。</p>	<p>⑤ 交流を直流の±に変換</p>  <p>交流(～)の足</p> <p>一極の足</p> <p>+極の足</p>	<p>⑥ 交流の足をここに接触させない</p>  <p>交流端子に配線を巻き付ける</p>

今回作成する電源装置は、必要以上の電流が流れないように1.5Aを最大電流としており、1.5Aのヒューズを組み込むことで安全性を増しています。ブリッジダイオードは長時間使用すると発熱する特徴を持っていますが、電気泳動に必要な30分前後の使用においては異常に加熱するなどの問題は発生しませんでした。

組立手順	図	解
<p>4</p> <p>⑦+極側の足を長めに切り取り、残った側を+極側の端子に接触するように折り曲げる。 ※白丸は半田づけする場合</p> <p>⑧切り取った足の部分を図のようにフック状に折り曲げる。(ヒューズ用の)</p>	<p>⑦</p> 	<p>⑧</p> 
<p>5</p> <p>⑨右図のようにカッターで切り取りヒューズを押し込む場所を作る。</p> <p>⑩切り取った部分にヒューズが入るか確認し、入らない場合はさらに深く切り取る。</p>	<p>⑨</p> 	<p>⑩</p> 
<p>6</p> <p>⑪右図のように右側のコンセント穴から赤の配線を通し、切り離しておいたコンセント端子に配線をねじって巻きつける。</p> <p>⑫右図のように巻き付けた後で配線を引張り、配線がほどけないことを確認する。</p>	<p>⑪</p> 	<p>⑫</p> 
<p>7</p> <p>⑬図のように配線をコンセント端子部分にドライバーなどで隙間を作って押し込めて固定する。</p> <p>⑭マイナス極側の足を赤の配線側に折り曲げ、⑧で作ったフックを黒の配線側の隙間に押し込み、右図のように配置する。</p>	<p>⑬</p> 	<p>⑭</p> 
<p>8</p> <p>⑮二つの足がヒューズの金属部と接触していることを確認しながらヒューズを押し込む。(全ての配線をテスターでチェックするとよい) ※白丸は半田づけする場合</p> <p>⑯ケースに「+」、「-」を書き込み、通電をテスターなどで確認する。</p>	<p>⑮</p> 	<p>⑯</p> 

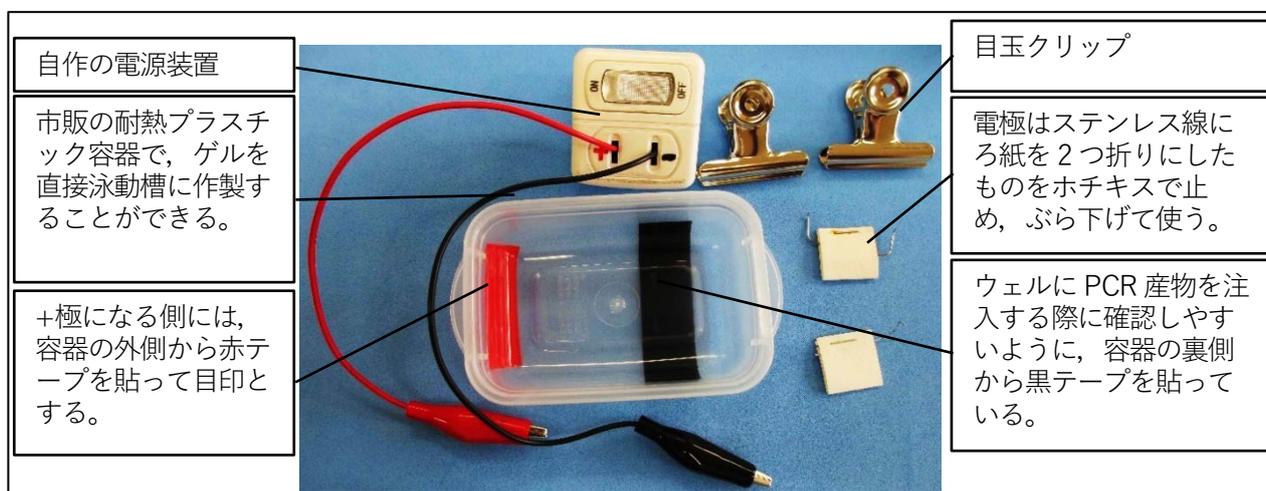
## [泳動槽の作成]

本書で作成する泳動槽は、100円均一ショップで販売している耐熱のプラスチック容器を泳動槽として使用しています。通常はゲルをゲル作製器で作成してから泳動槽に設置する必要がありますが、この泳動槽は、直接泳動槽内にゲルを作製することができます【図46】。

### 組立に必要な工具・材料

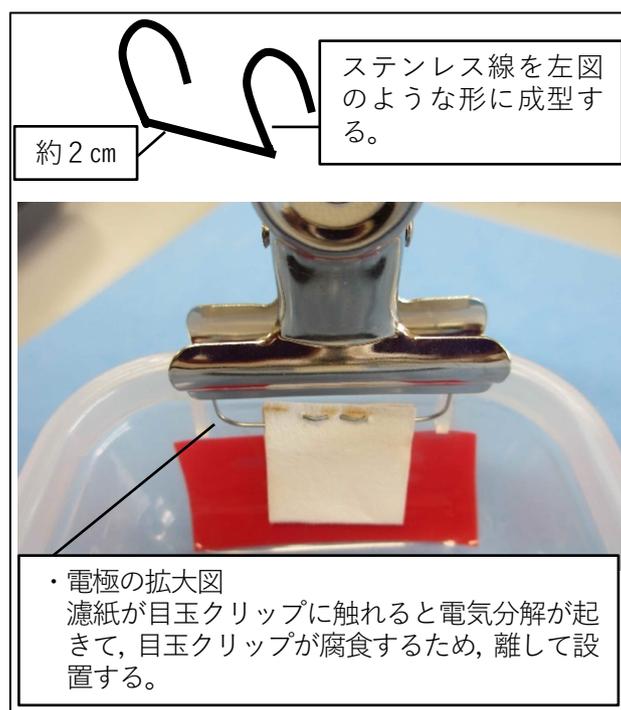
- 工具 はさみ, ホチキス, 絶縁テープ(赤・黒)\*
- 材料 耐熱容器(120°C対応, ポリプロピレン製, 105mL, 蓋つきだとゲル作製後保管しやすい), 目玉クリップ×2, ステンレス線(Φ0.9mm以上), ろ紙(短冊状のものが使いやすい)

※所持していなくても組立可能です。



【図46】自作の電気泳動槽装置の泳動槽の概要

- (1) ステンレス線を6cmずつ切り離す。(1つの装置に2本使用する)
- (2) 【図47】のように、ステンレスワイヤーを折り曲げる。
- (3) 加工したステンレス線にろ紙を2つ折りにしたものをホチキスで止め、ぶら下げる。
- (4) 完成した電極を容器内に引っ掛け、目玉クリップで固定する。

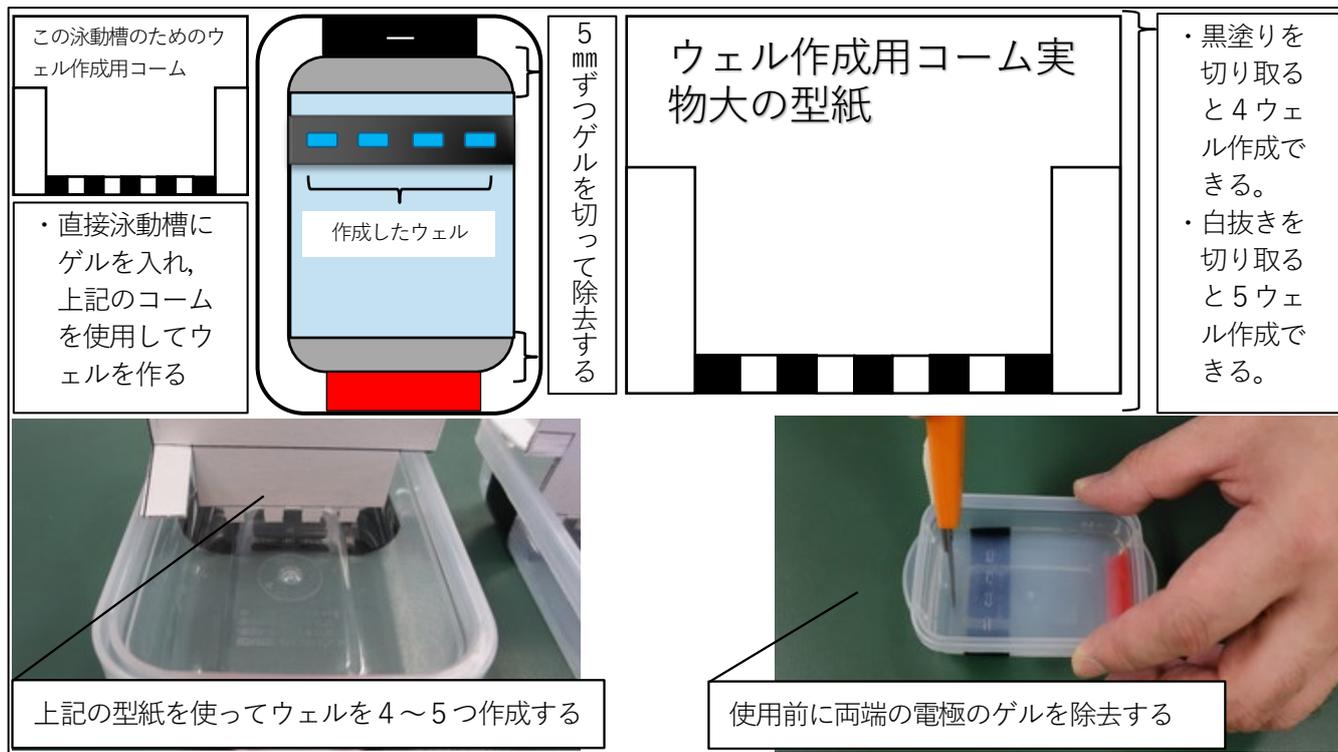


【図47】自作の泳動槽用電極の作成

## [泳動槽を使用する準備] 【図 48】

- (1) 泳動槽は、電子レンジ対応でふたが付属しているものを選び、直接アガロースゲルの粉末と水を入れて電子レンジで加熱してゲルを作成する。
- (2) 下記に示した、この泳動槽に合わせたウェル作成用コームを厚紙で作成し、これを用いてウェルを作成する。
- (3) 泳動槽に直接作製したアガロースゲルの両端を、それぞれ5 mm切り取って除去する。
- (4) ゲルの表面が浸るまで1×TAE 溶液を注ぐ。

※1×TAE 溶液は、電極のステンレス線が浸らないように注ぐこと。



【図 48】 泳動槽を使用するための準備

## [電気泳動] 【図 49・50】

- (1) PCR を行う際の電極の設定は、泳動上流側に一極、下流側に+極になるように接続する。
- (2) 調整しておいた DNA サイズマーカー 6 $\mu$ L をウェルの1番左側に注入する。
- (3) PCR 産物が入ったマイクロチューブから 6 $\mu$ L 取り、ウェルの左側から2番以降に注入する。

※異なる PCR 産物同士が混じらないように、ピペットチップを変えて同様の操作を行う。

- (4) 感電や回路がショートする危険性のあるものがないか装置の周りを確認し、電源を入れる。

※通電中も回路がショートしないように装置に不用意に触れないように注意させること。

- (5) ローディングバッファの先端がゲルの全長の6~8割程度まで進んだところで、泳動を終了する。

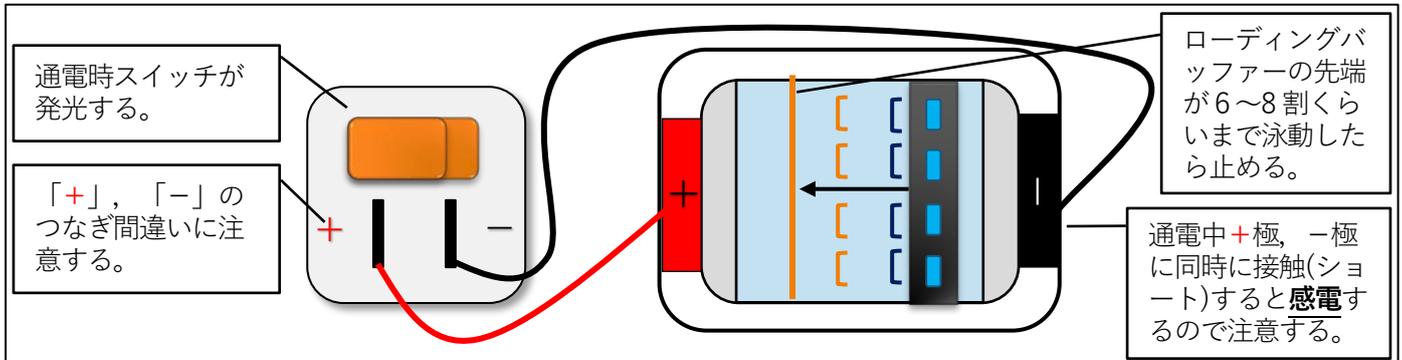
- (6) 泳動後、UV トランスイルミネーターで結果を確認する。



※結果が確認しにくい場合は、黒テープをはがすとよい。

※ビューワブルーステイン(染色液)を使用する場合は、右図のように泳

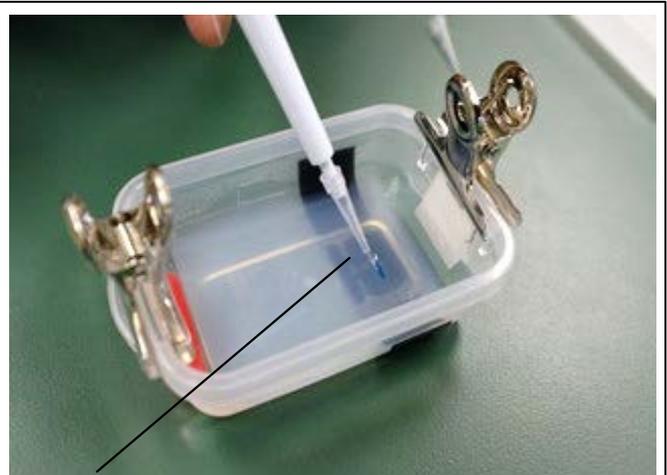
動槽に直接染色液を入れて染色・脱色する。



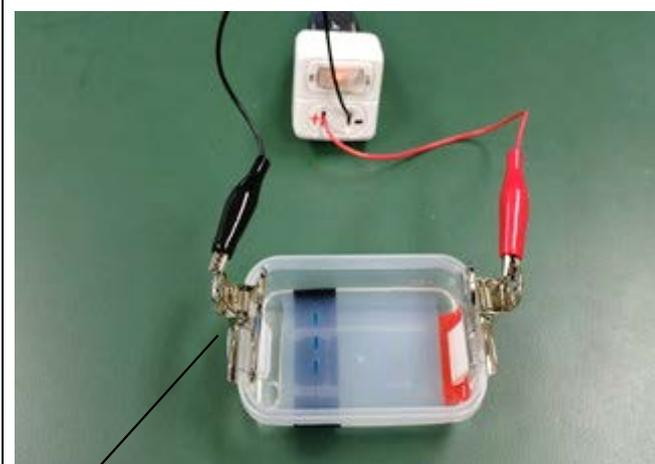
【図 49】 自作の電気泳動装置を使う際の注意事項



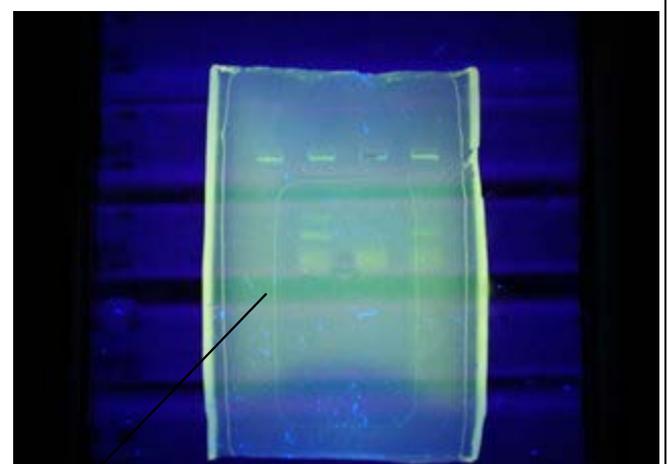
ステンレスとろ紙を使った電極をクリップで固定する。



電気泳動用バッファーを入れ、電気泳動槽に直接作製したゲルに PCR 産物を分注していく。



電極を間違わないように電源装置を接続し、電極同士をショートさせないようにしながら電源を入れる。



電気泳動槽からバッファーを取り除き、容器ごとUV トランスイルミネーターに乗せて観察を行う(見にくい時はゲルを外して観察する)。

【図 50】 自作の電気泳動装置の使い方

## ②人力遠心分離機の作り方

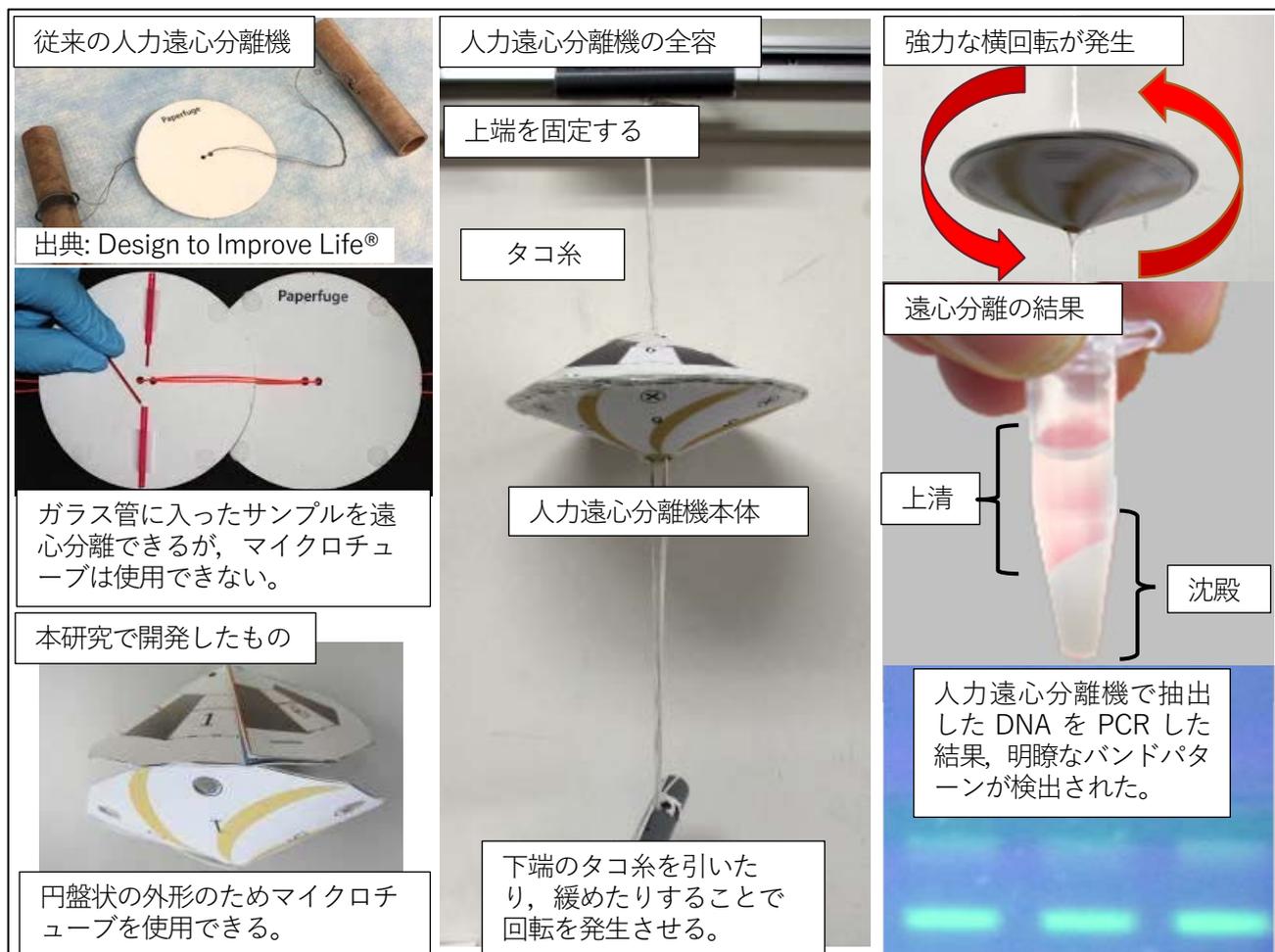
人力遠心分離機は、「松風ごま」や「ぶんぶんゴマ」と呼ばれる伝統的な玩具の原理を利用したものです。この原理を利用した「Paperfuge」と呼ばれる装置は、回転数は毎分 12 万回転、遠心加速度は 3 万×g になり、2 分間で血液から血漿を分離する実験に使用できると報告されています



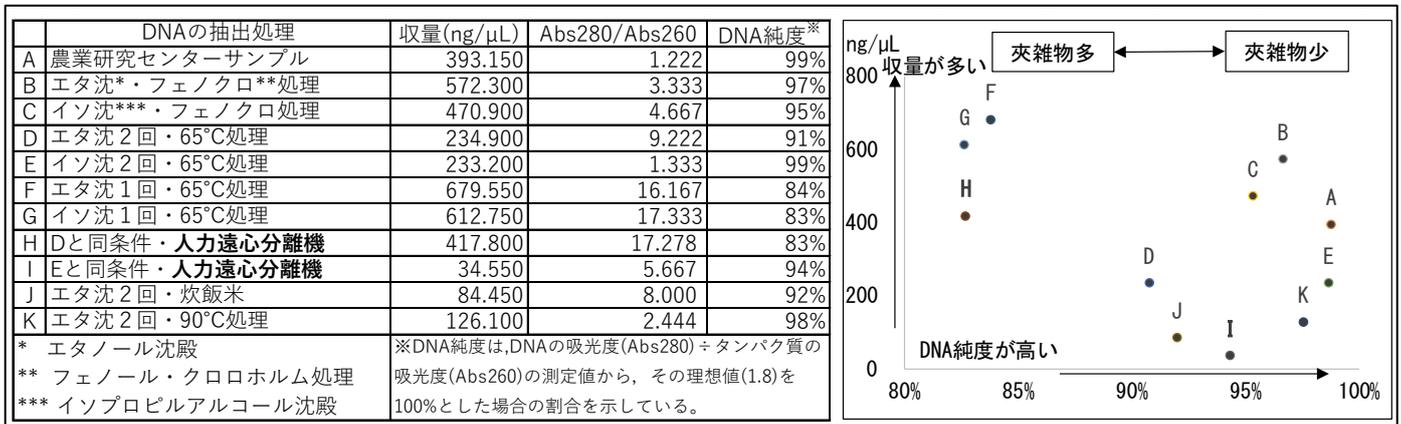
(Bhamla, 2017)。しかしこの器具は、細いガラスチューブなどに入れた

サンプルの遠心分離にしか使用できず、マイクロチューブを用いた遠心分離を行うことはできませんでした。そこで、回転部を平面から円盤状にすることで、装置自体に厚みを持たせ、マイクロチューブを使用できるように改良しました【図 51】。

この装置を利用して、コメからの DNA 抽出を行ったところ、遠心分離機よりも不純物の沈殿効率は悪かったものの、PCR では目的の遺伝子の増幅が確認されました。DNA 抽出の際に、採取する上清の量を少なくすることで、十分な DNA の純度になります【図 52】。



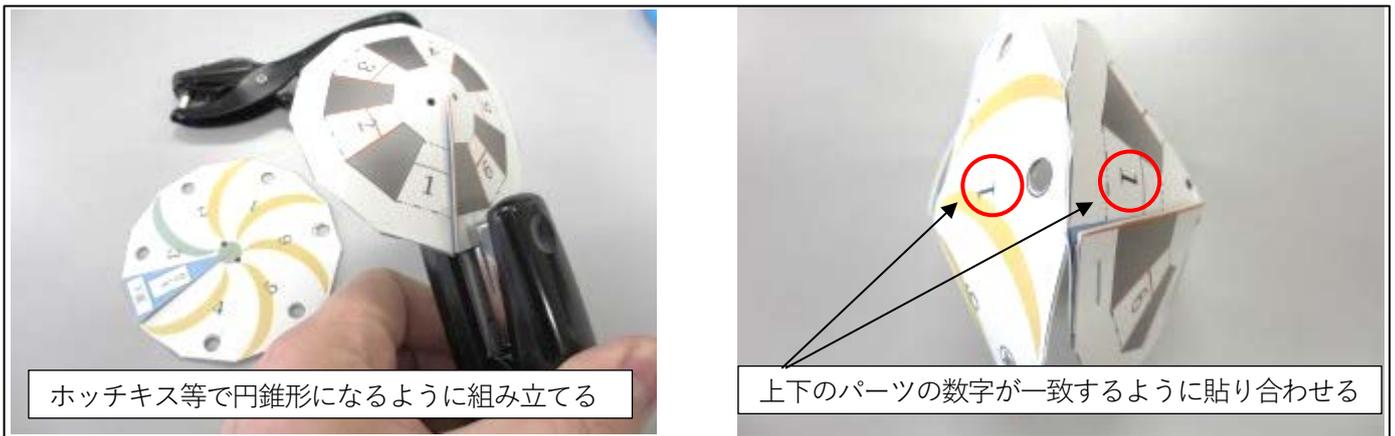
【図 51】 人力遠心分離機の概要



【図 52】 様々な方法で抽出したDNAの純度

[人力遠心分離機の作成] 【図 53】

人力遠心分離機の型紙(p.52)を厚紙やプラスチック素材に貼りつけて切り離してください。穴あけや切込みが必要な部分については組立前に行っておくと組み立てやすくなります。組み立てには、糊だけでなく両面テープやホチキスなどで補強すると壊れにくくなります。また、タコ糸はほどけないように固結んでください。タコ糸については、100円均一ショップで販売している太目のタコ糸を2重にすると耐久性が増します。



【図 53】 人力遠心分離機の組み立て方

[人力遠心分離機の使い方]

番号のついている部分の切れ込みにマイクロチューブがきちんと固定されるように差し込む。紐の上下を持って10回程度回転させ、紐にねじれを作る。上下の紐を引き、回転が始まったら引く力を緩めると、回転力によってねじった方向と逆方向にさらにねじれる。これを繰り返すと回転力が増加していく【図 54】。



【図 54】 人力遠心分離機の使い方

# 人力遠心分離機作成用型紙と説明書

## ○記号の種類



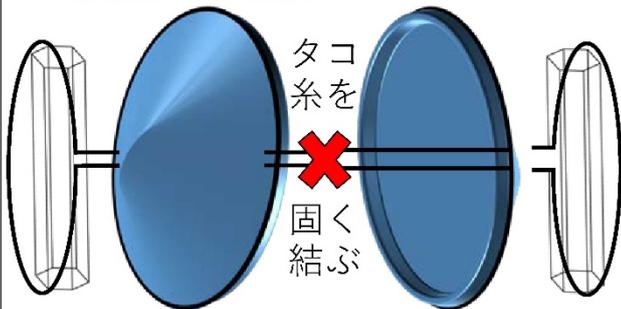
## ○必要な道具



※拡大印刷して使用する場合は、プラスチック素材での作成を推奨します。

## ○作成方法

- ①本紙を厚紙に印刷するか貼りつける。
- ②型紙の[上面]、[下面]、[持ち手]2枚を切り離す。
- ③切込線に沿ってカッターなどで切込みを入れる。
- ④穴あけの部分に穴をあける。
- ⑤大穴の部分は円形に切り取るか、十字型の切込みを入れる。
- ⑥のりしろにのりや接着剤をぬり、重ね合わせるように貼りつけ、円錐形を作る。(接着しにくい時には、ホチキス等で止める。)
- ⑦[持ち手]も同様に六角柱状に組み立てる。
- ⑧タコ糸を、30~40cm×2本用意し、下図のように糸を通して中心で結ぶ。



- ⑨円錐の部品同士を、中心の結び目が隠れるようにガムテープなどで接着し円盤状に組み立てる。

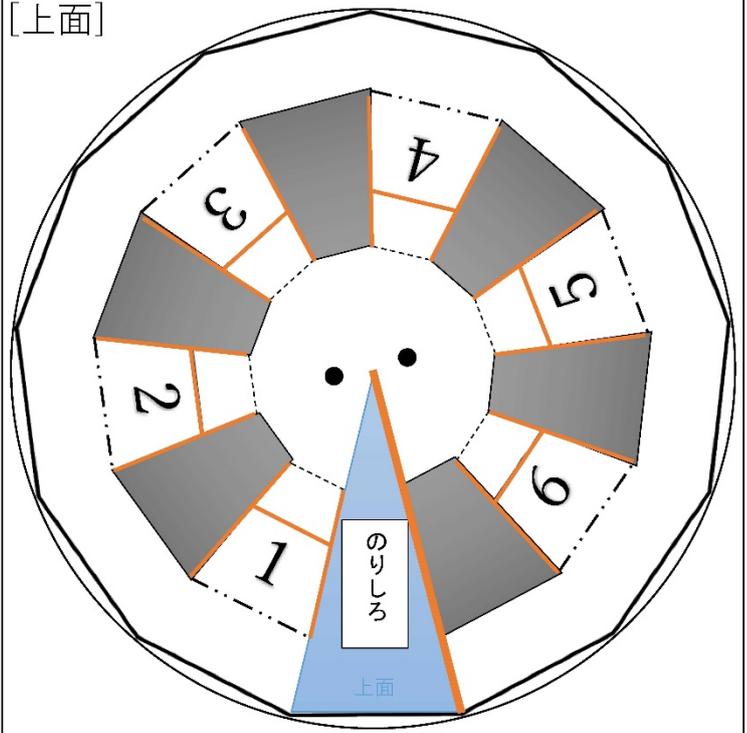
## ○使用方法

- ①上面の番号がついている部分に、チューブをセットする。1.5mL チューブは、下面の大穴から突き出すようにしっかり差し込む。
- ②六角柱の持ち手が上下方向になるように持ち、水平方向に回転させてタコ糸にねじれを作る。
- ③ねじれが出来たら、持ち手を上下にひくと回転を始めるので、引ききらずに途中で力を緩めると逆方向にねじれる。これを繰り返すと回転が加速して遠心分離機のような回転数を得られる。

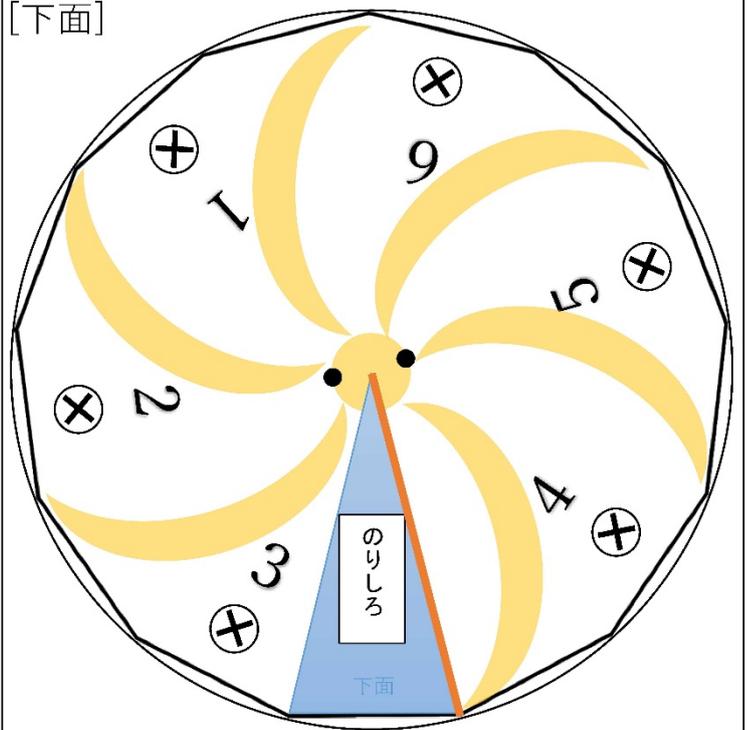
## ○使用上の留意点

- ※タコ糸や紙の素材は、何度か使用すると消耗して切れたり、壊れたりすることがある。本体に通すタコ糸の本数を増やすか、予備を十分に用意しておく必要がある。また、持ち手や装置の外周を、ガムテープで補強するか、丈夫な素材を使用することが望ましい。
- ※タコ糸を通す穴には大きな負荷がかかるので、ガムテープや金属製のハトメで補強する。
- ※より強い遠心分離を行いたい時は、本紙を拡大コピーして大型化すると良い。

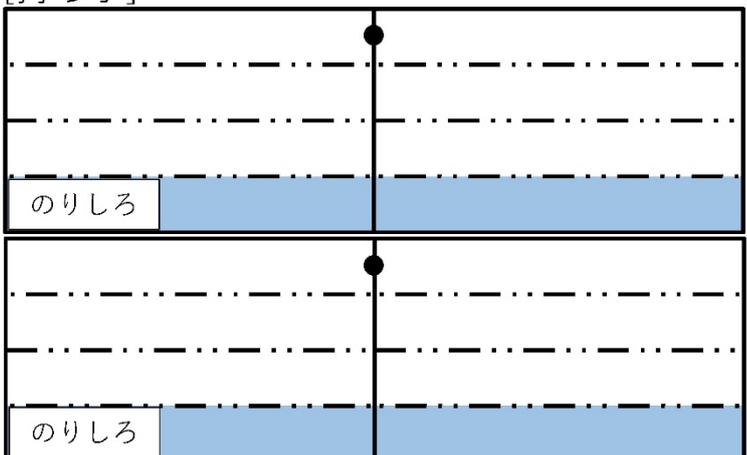
[上面]



[下面]



[持ち手]



### ③PCR の原理を学べるペーパークラフト

PCR の原理を学べるペーパークラフトは、無限に開けるカード (endless card) と呼ばれるペーパークラフトを応用したものです。4 枚の絵が繰り返し現れる特徴に注目し、同じ温度変化を繰り返すサーマルサイクラーがその温度ごとに何を行っているかを視覚的に学べる教材として作成しました【図 55】。

何名かの班で人力サーマルサイクラーを行う際には、実験操作を行っていない生徒に、このペーパークラフトを作成させることで時間を有効に使うことができます。型紙(p.56)は、A4用紙1枚に、組み立て方法を含めた全ての情報が記載されており、20~30分の製作時間で完成させることができます。

① PCR の原理を学べるペーパークラフトの組み立て方  
 ① 4 枚のプリントから下記の通りに紙を切り取る。  
 ② 裏側の穴から裏面テープを貼る。  
 ③ 裏面テープを貼った後、裏面に開く部分の裏面テープを貼る。  
 ④ 人力サーマルサイクラーの3つの温度がそれぞれ書かれている部分を切り取る。

## PCR の原理

Polymerase Chain Reaction ポリメラーゼ連鎖反応  
 やってみよう PCR!  
 ・DNA のすごい性質を利用しているよ  
 高温にすると  
 1本鎖にほどける  
 低温にすると  
 2本鎖に復活!  
 ・ほどけてる間に  
 足場を作って... (プライマー)  
 DNA 合成酵素 (polymerase) が遺伝子増幅!  
 このサイクルをくり返すと 2<sup>n</sup>倍に増えていく!

### ① DNA 熱変性

温度設定 **98°C**  
 DNA がほどけて 1本鎖になるよ!  
 時間設定 **5秒**

### ② アニールング

温度設定 **64°C**  
 足場になるプライマーをくっつけよう!  
 DNA 合成酵素をくっつけよう!  
 時間設定 **5秒**

### ③ DNA 伸長反応

温度設定 **68°C**  
 酵素がどんどん DNA を伸ばしていくよ!  
 時間設定 **45秒**

中心からカードを開く

表紙→①→②→③→表紙を繰り返す

【図 55】 PCR の原理を学べるペーパークラフト

### ① DNA

温度設定 **98℃**

DNA がほどけて

### ② アニールング

温度設定 **64℃**

足場になるプライマーをくっつけよう

DNA 合成酵素をくっつけよう!

時間設定 **5秒**

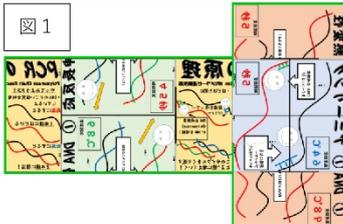
### 熱変性

一本鎖になるよ!

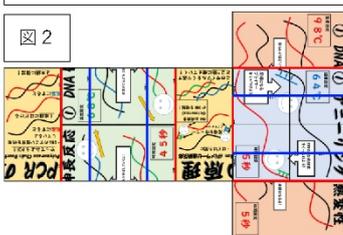
時間設定 **5秒**

**PCRの原理を理解する**  
ペーパークラフトⅡ

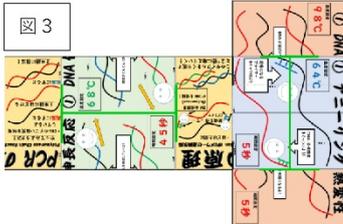
【作り方】  
①図1の**緑線**で示した部分を切る。



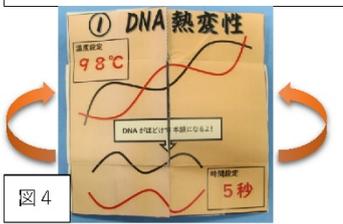
②図2に示した**赤線**を山折り、**青線**を谷折りにして折る前の状態に開いておく。



③図3に示した**緑線**の部分に切り込みを入れる。



④図4のようにDNA熱変性が上にして折り、左右の表面を折り返す。



## PCRの原理

ポリメラーゼ連鎖反応

• ほどけた間に足場を作って... (プライマー)

DNA合成酵素 (Polymerase) がDNAを増幅!

このサイクルをくり返すと2<sup>n</sup>倍に増えていく!

### 伸長反応

温度設定 **68℃**

酵素がDNAを伸ばしていきよ!

時間設定 **45秒**

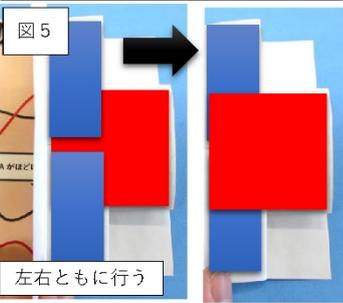
## PCRの原理

Polymerase Chain Reaction

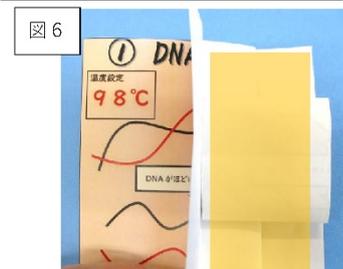
やってみようPCR!

- DNAのすごい性質を利用して
- 高温にすると1本鎖にほどける
- 低温にすると2本鎖に復活!

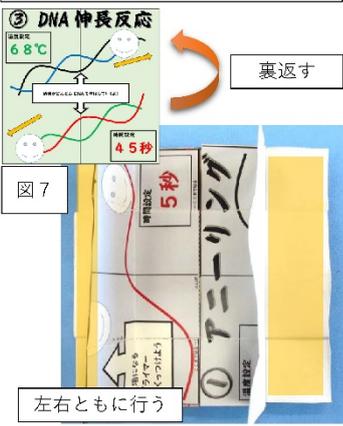
⑤図5のように、**青く示した面**の下に、**赤く示した面**を引き出す。



⑥図6の**黄色**で示した部分にのりをつけて貼り合わせる。



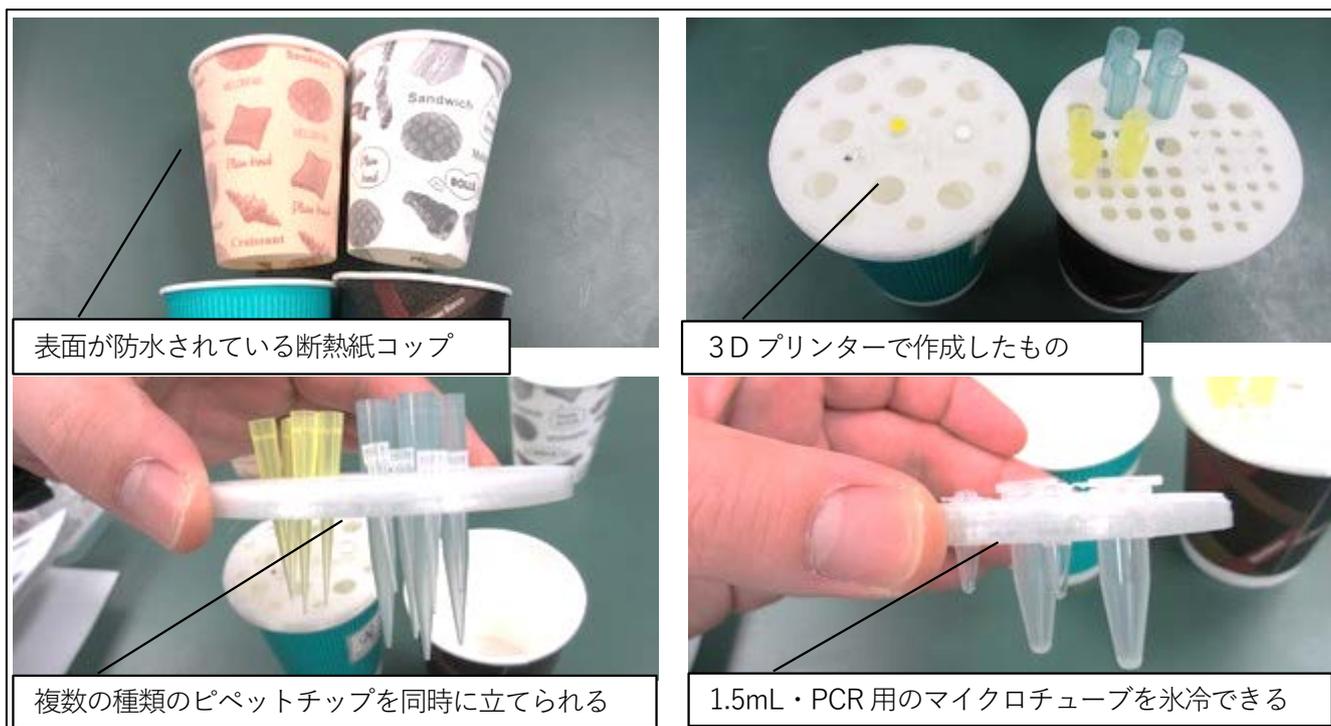
⑦中央から開くように折返し、**伸長反応**の面が出たら裏面にする。図7のように**黄色**で示した部分にのりをつけて貼り合わせる。



#### ④断熱紙コップを用いたチューブ・チップ立ての作成

班ごとにマイクロチューブやピペットチップを配布するのは大変です。そこで断熱性の紙コップを用いたマイクロチューブ立てとピペットチップ立てを作成しました。断熱性紙コップは、通常の紙コップよりも強度と耐水性に優れ、氷を入れてマイクロチューブの冷却もできます。また、再利用も可能で安価に購入できる素材です【図 56】。

本書では、断熱紙コップのふたのような形状のチューブ・チップ立てを設計し、3Dプリンターで作成【図 56】して実験に使用できることを確認しました。



【図 56】断熱紙コップを使ったチューブ・チップ立ての概要

また、厚紙やプラスチック素材に貼りつけて、チューブ・チップ立てを作成するための型紙(p.58)を作成しました【図 57】。100円均一ショップで購入できるポンチ等で穴をあけるだけで作成できます。用途に応じて穴の数の調整や、型紙のパーツを拡大・縮小することで様々な断熱紙コップの大きさに対応できます。

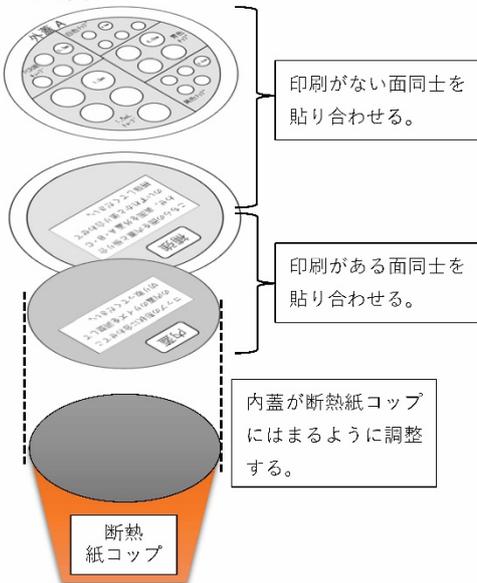


【図 57】ペーパークラフトによるチューブ・チップ立ての再現

# 断熱紙コップを用いたチューブ・チップ立ての型紙と説明書(A3版に拡大してください)

## ○作成方法

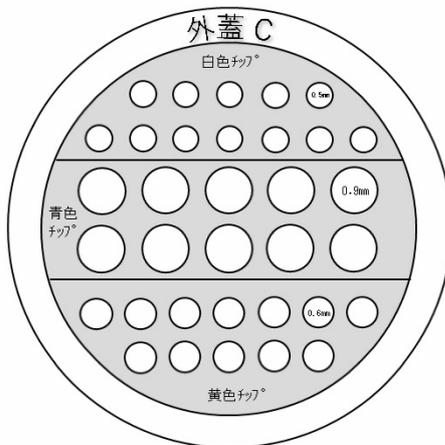
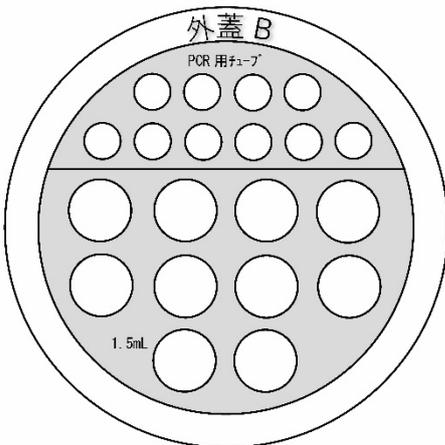
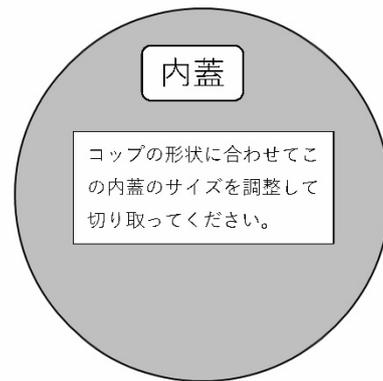
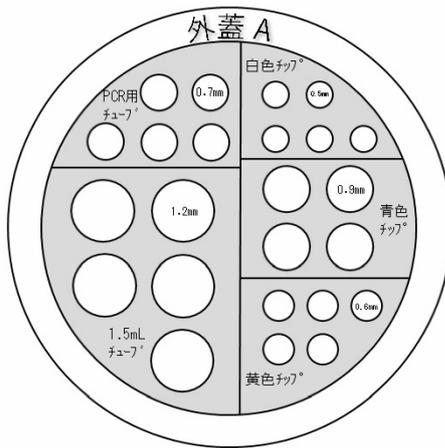
- ①本紙を厚紙や耐水紙に印刷するか、印刷したものをプラスチック素材に貼りつける。(この用紙はA3版のため、A4で印刷した場合はもう一度拡大コピーしてください。)
- ②必要とする外蓋A～Cパーツと内蓋、補強パーツを切り取る。
- ③下図のように外蓋→補強→内蓋の順に貼り合わせる。(あらかじめコップと内蓋のサイズを合わせておく。)



- ④穴の大きさに合わせてカッターや穴あけパンチ、ポンチなどで穴をあける。
- ⑤完成したチューブ・チップ立てを断熱紙コップにかぶせ、内蓋が断熱紙コップにはまり、チューブ・チップ立てがずれないか確認する。
- ⑥穴の大きさをヤスリ等で調節する。

## ○使用上の留意点

※外蓋Aは、チューブ・チップ立てが一緒のタイプである。氷を使用してマイクロチューブを冷却しながら使用する場合は、外蓋Bパーツを使用し、チューブ立てとチップ立てを分けて使用する。



# 試薬や器材の入手方法

## ① 試薬・実験器材関連

現在、試薬や実験器材については、多くの業者が様々な商品を販売しているため、どれを購入すればよいか迷うと思います。そこで【表 18】には、本書の実験を行うにあたって便利な規格のものや最も安価なものを選んで一覧にしました。各校で実験器具や試薬をそろえる一つの目安としてお使いください。(サーマルサイクラーや遠心分離機は年々低価格化しています。業者に現在の価格を確認してください。)

【表 18】 試薬・実験器材の入手方法一覧

### [DNA抽出関係]

●試薬	正式名称・容量・型番等	容量	価格	取扱業者	備考
TAE溶液	50×TAE	500mL	¥9,000	ニッポン・ジーン	25L分
TE溶液	1×TE(pH8.0)	100mL	¥8,000	ニッポン・ジーン	DNAを含む試薬調整
SDS(界面活性剤)	ドデシル硫酸ナトリウム	25g	¥2,450	富士フィルム・和光純薬	取扱注意
Tris	トリスヒドロキシメチルアミノメタン	25g	¥1,350	ナカライテスク株式会社	
EDTA	エチレンジアミン四酢酸	50g	¥3,000	同仁化学	Mgイオンのキレート剤
エタノール	99%	500mL	¥1,000	モノタロウ	DNAの析出
●器材	正式名称・容量・型番等	容量	価格	取扱業者	備考
マイクロピペット(容量調整可)	AccumaxPro(p.2, p.20)	0.2~10mL	¥8,000~	日本テクノサービス	p.13参照
マイクロピペット(定量タイプ)	AccumaxJr	5~200μL	¥1,600~	日本テクノサービス	決まった容量のみ取り取れる
卓上型遠心分離機	HSC-12000	1.5mL×6	¥23,500~	アズワン	速度調整可能(抽出に必要)

### [PCR関係]

●試薬	正式名称・容量・型番等	容量	価格	取扱業者	備考
DNA合成酵素(Taqポリメラーゼ)	SapphireAmp® Fast PCR Master Mix	1mL×4本	¥17,000	タカラバイオ	1mLで1クラス分
各種プライマー	p.14参照	p.14参照	¥8,000~	Thermo Fisher	10クラス分
DNAサイズマーカー (どちらかを選択する)	λ-Hind III digest	100μg	¥10,500	タカラバイオ	1000ウェル分
	pHY Marker	20μg	¥14,000	タカラバイオ	200ウェル分
●器材	正式名称・容量・型番等	規格	価格	取扱業者	備考
サーマルサイクラー	Qamp Mini Portable PCR Thermal Cycler	8本	¥200,000~	フナコシ	p.6, 25参照

### [DNA抽出関係]

●試薬	正式名称・容量・型番等	容量	価格	取扱業者	備考
電気泳動用ゲル	アガロースゲル	5g	¥2,000	ニッポン・ジーン	0.5gずつ小分けになっている
DNA染色液	SAFELOOK™ プレグリーン	50μL	¥3,000	富士フィルム・和光純薬	蛍光染色液
	ViewaBlue® Stain KANTO	500mL	¥6,200	関東化学	可視光下で観察可能
●器材	正式名称・容量・型番等	規格	価格	取扱業者	備考
水平型電気泳動装置	CM-5001K(ウェル数最大17)	ゲル50×75	約¥30,000	ケニス	ゲル作製器付属
UVトランスイルミネーター	SRT-TUBE		¥21,000	アズワン	

### [実験キット]

●試薬	正式名称・容量・型番等	容量	価格	取扱業者	備考
DNA合成酵素(Taqポリメラーゼ)	MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3	250U	¥34,000	タカラバイオ	コメ粉から直接PCR可能
コシヒカリ鑑定団®		24人用	¥72,000	ビジョンバイオ	全てがキットに含まれる
コメDNA抽出キット(精米20粒)		50回	¥26,400	タカラバイオ	抽出のみのセット
コメ判別用PCR Kit I		100回	¥57,000	タカラバイオ	Kit II では他品種の判別可能

### [自作できる実験器材関係]

●人力遠心分離機	正式名称・容量・型番等	容量	価格	取扱業者	備考
タコ糸	太目		¥100	100円均一ショップ	
穴あけパンチ・ボンチ		2本セット	¥100	100円均一ショップ	チューブ・チップ立てにも使用
●簡易的な電気泳動装置	正式名称・容量・型番等	容量	価格	取扱業者	備考
耐熱タッパー	長方形	4個セット	¥100	100円均一ショップ	ゲル保管時、蓋つきが便利
ステンレス線	太さは0.9mm以上		¥100	100円均一ショップ	アルミ線は溶解するので注意
目玉クリップ	中(耐熱タッパーの短辺よりも短いもの)	6個セット	¥100	100円均一ショップ	
節電タップ	発光するスイッチがついたもの		¥100	100円均一ショップ	裏蓋がネジ止めされているもの
●人力サーマルサイクラー	正式名称・容量・型番等	容量	価格	取扱業者	備考
サーモスタット(電源コード無)			¥1,700	Amazon	電源コードの加工が必要
サーモスタット(電源コード有)			¥2,700	Amazon	電源コード取付済み

## ②実験材料の入手について

現在、毎年様々な水稲品種が開発され、地域を代表するブランド米として全国に流通しています。そのため、様々なブランド米を試したいという消費者のニーズに合わせ、1～3合単位の個別包装の商品が増えてきており、入手が容易になってきています【図58】。例えば、岩手県産品種はJA全農いわてが贈答品として、3合ほどのパッケージで販売しています。また、他県の米粒を使用したい時には、株式会社PEBORAのペットボトルライスを利用すれば、他県産品種も手に入れることができます。

また今回開発した実験器具・実験器材の多くは、できるだけ手に入りやすい素材で作成できるように、100円均一ショップや大手の量販店で販売している商品を使用して実験器具を作成しています。



【図58】様々なコメの品種の入手方法について



## 困った時は？

### ◇実験器具の貸出しについて

岩手県立総合教育センターでは、下の表にある物品を貸出ししています【図 59】。また、随時研修として当センターで使用することができます。遺伝子実験の普及のため積極的にご活用ください。

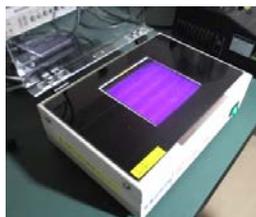
#### [連絡先]

電話番号 0198-27-2742 (生物直通)

担 当 理科教育担当

	器材名称	用途など	外観	数量
①	PCR装置(サーマルサイクラー)	PCRに必要な温度制御をプログラム通りに行う装置で、複数のマイクロチューブを同時にPCRすることができる。		2台
②	電気泳動装置	液体に高電圧を流して、電気泳動を行う装置、ふたが閉められていないと電流が流れないようにになっている。		5台
③	ゲル作製器	電気泳動に使用するアガロースゲルを作製する。コームと呼ばれる器具を使って、ゲルにウェルと呼ばれる穴を作る。		4台
④	卓上型遠心分離機	DNA抽出やチューブの壁面にくっついた少量の液体を下に落とす際に使用する。		2台
⑤	高速冷却遠心分離機	サンプルを冷却しながら遠心分離することができる大型の遠心分離機で、持ち出しはできない。		1台
⑥	チューブ攪拌機 (ボルテックスミキサー)	液体を攪拌するときに使用する。		1台

【図 59】 岩手県総合教育センターで貸出し・使用が可能な実験器材(次ページへ続く)

器材名称		用途など	外観	数量
⑦	マイクロピペット (P2, P20)	設定した微量の液体を取れるピペットで、様々な容量のものがある。		各10本ずつ
⑧	教員用マイクロピペット (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)	教員への貸出用に様々な容量のマイクロピペットがある。		各1本ずつ
⑨	UVトランスイルミネーター(紫外線防護マスクが付属する)	蛍光DNA染色液で染色されたDNAを発光させて観察できるようにする装置で、強い紫外線を照射する。		1台
⑩	真空エバポレーター(真空ポンプとのセット)	真空状態を作り出してDNA抽出液を乾燥させる。		1台
⑪	ドライヒーター	DNA抽出の際にマイクロチューブを一定の温度で加熱するために使用する。		2台
⑫	恒温槽(ウォーターバス)	一定の温度のお湯を作る。人力サーマルサイクラーに使用する。		6台
⑬	実験解説DVD	実験準備や操作について撮影したもので、貸出し時に自由にコピーして使用してもよい。		5枚

【図 59】 岩手県総合教育センターで貸出し・使用が可能な実験器材



## ◇廃棄物の処理について

### ①試薬の廃棄方法

本書の実験方法では、廃液に有害な物質が出ないように配慮しています。しかし一般的に、PCR法ではフェノールやクロロホルム等の取扱い方に注意を要する物質を使用することがあります。そこでp.64の【図61】に実験廃液の一般的な取扱い方法をまとめました。

また、発がん性があるとされるDNA染色液であるエチジウムブロマイドの処分方法については、日本では特定の規則はありませんが、一般的な処分方法について【表19】にまとめました。

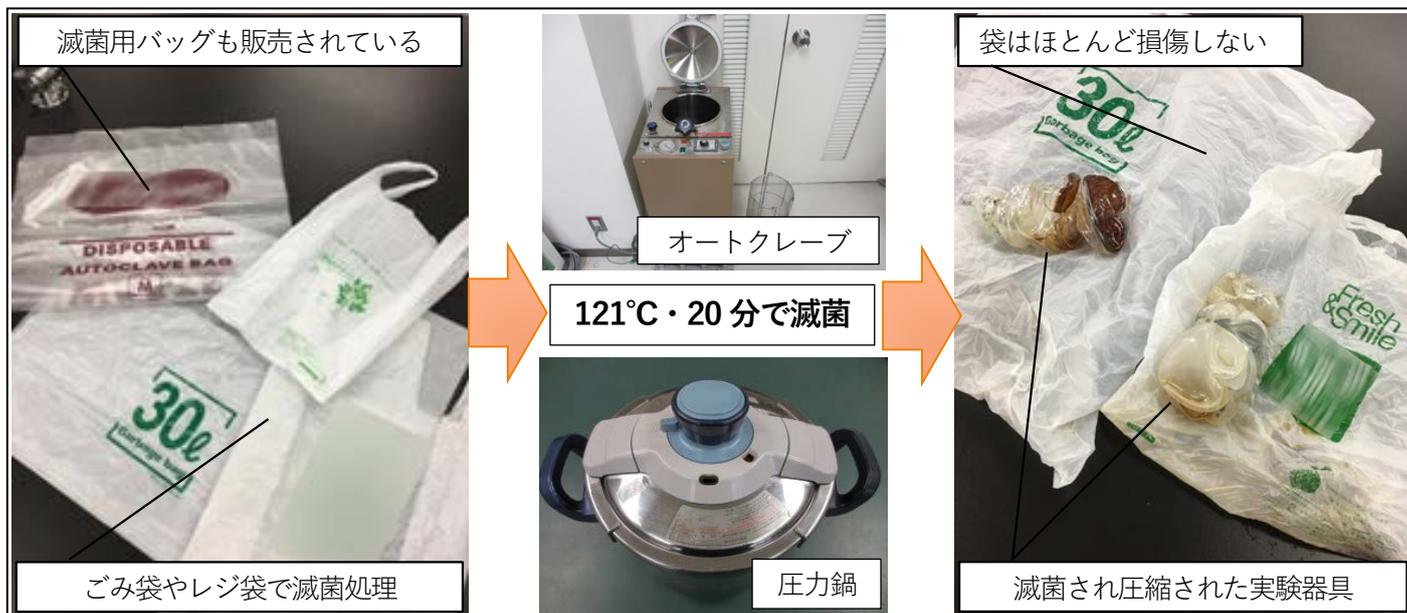
【表 19】エチジウムブロマイドの処分方法について

処分方法	原理	操作性	処理能力	処分方法	コスト	備考
下水への放流	希釈	◎	∞	×	◎	環境への影響を考えると行ってはいけない
次亜塩素酸(ハイター)	脱色	△	×	業者引渡し	○	より有毒な物質になるとの報告がある
活性炭・樹脂	吸着	○	○	業者引渡し	△	処理後は不燃物として業者引渡し
おからへの吸着	吸着	○	○	一般ゴミ(可燃)	○	処理後は可燃物として廃棄できる
ゼロ・カラム【AXEL】	吸着	○	◎	一般ゴミ(可燃)	△	処理後は可燃物として廃棄できる
EtBr Destroyer【チヨダサイエンス】	分解	◎	◎	—	△	スプレーで吹きかけるだけで分解できる
日光による分解	分解	◎	◎	一般排水	◎	ペットボトル等に保管し日光で分解する

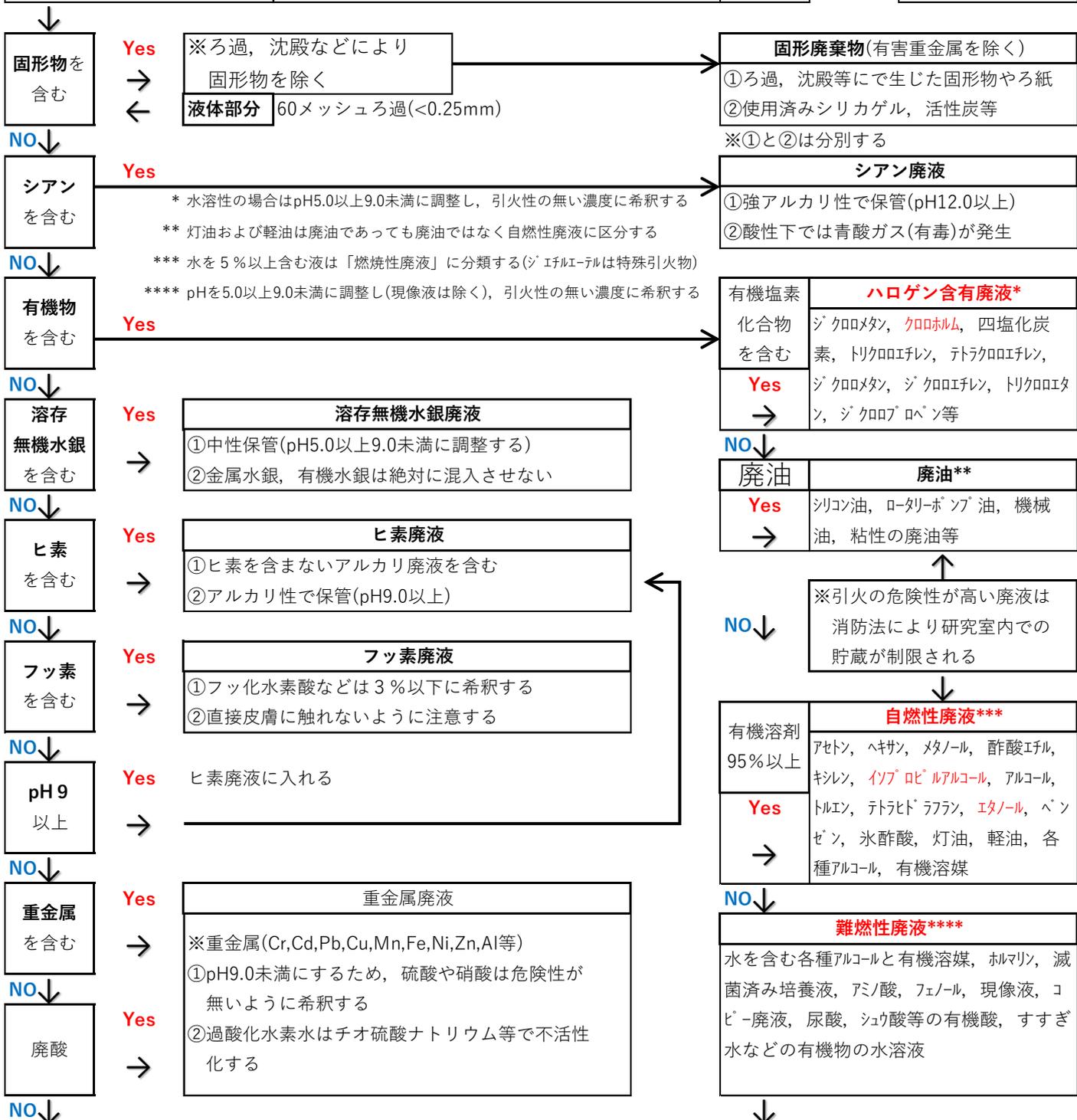
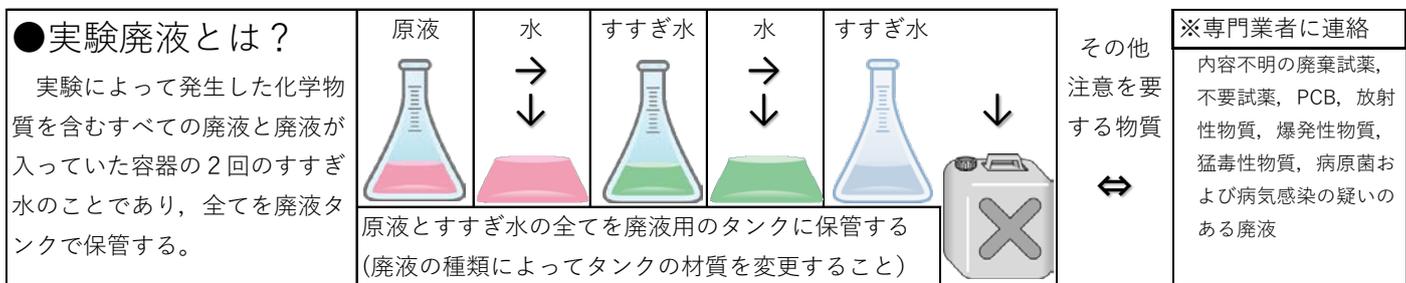
◎非常に良い ○良い △問題あり ×非常に問題あり

### ②DNAを含む使い捨て実験器具の廃棄について

本書では扱っていませんが、大腸菌の遺伝子組換えキットなどでは、使い捨ての実験器具ごとビニール袋に入れ、【図60】に示したようにオートクレーブで不活性化処理する必要があります。生徒には授業の中で、こうした廃棄方法が遺伝子実験を行う場合は必要であることを周知させてください。



【図 60】DNAを含む使い捨て実験器具の処理方法



※専門業者へ連絡：岩手県産業廃棄物処理業者名簿 <http://www.pref.iwate.jp/kankyuu/sanpai/009601.html>

※以下の①～⑦に該当する場合は「その他」区分として申請し、専門業者に回収してもらう。

- ①金属水銀は密閉容器に入れる。水銀温度計は破損防止措置をして袋に入れる。
- ②有機水銀化合物, 溶存無機水銀(有機物が共存)は, 有機物を含む水銀廃液として申請する。
- ③有機リン化合物は, 有機リン化合物名を明記する。
- ④消防法の第3類危険物(金属ナトリウム等)は別に回収する。
- ⑤消防法の第4類の特殊引火物(ジエチルエーテル等)は「第4類 特殊引火物 火気厳禁 危険等級Ⅰ」と表記し, 運搬時に転倒・漏洩防止対策を行う。
- ⑥消防法の第5類危険物(ピクリン酸等)は爆発の恐れのない濃度まで希釈する。
- ⑦消防法上の危険物である有機塩素化合物(ジクロロエタン等)は「第4類 第1石油類 火気厳禁 危険等級Ⅱ」と表記する。

【図 61】 実験廃液の一般的な廃棄方法の流れ

## ◇参考文献など

### 【参考文献】

- 厚生労働省 (2016), 『ゲノム医療等の実現・発展のための具体的方策について (意見とりまとめ)』ゲノム情報を用いた医療等の実用化推進タスクフォース
- 内閣府 (2017), 『科学技術イノベーション総合戦略 2017』
- 文部科学省 (2018), 『高等学校学習指導要領解説理科編理数編』
- 文部科学省 (2009), 『高等学校学習指導要領解説理科編理数編』実教出版株式会社
- 岩手県農業研究センター (2016), 「平成 28 年度岩手県農業研究センター試験研究成果書」『品種極良食味の主食用晩生粳水稻「金色の風」』岩手県農業研究センター-Bull. Iwate Agric. Res. Ctr.
- 岩手県農業研究センター (2017), 『水稻新品種「銀河のしずく」の育成』岩手県農業研究センター-Bull. Iwate Agric. Res. Ctr. 16
- 貝沼喜兵・斉藤淳一・原田和雄・小林興 (2003), 「科学教育研究」『中・高校生を対象とした組換え DNA 実験に対する生徒の理解度と体験学習の意義』日本科学教育学会, Vol.27, No3
- 貝沼喜兵・大藤道衛・中島春紫・斉藤淳一・飯田秀利・原田和雄・小林興 (2005), 「科学教育研究」『現職教員の中・高等学校生物教育に対する認識と展望—SPP 研修会参加者のアンケート調査より—』日本科学教育学会, Vol.29, No3
- 笹川由紀・小野道之 (2009), 「科学教育研究」『高等学校におけるヒトゲノム・遺伝子解析実験に関する現状と教員意識の調査研究』日本科学教育学会, Vol.33
- 山内宗治 (2012), 「平成 24 年度研究報告」『高等学校生物における PCR 法を利用した遺伝子判定実験を取り入れた教材開発—遺伝子組換え「青いバラ」を可能にした遺伝子の起源の探求を通して—』広島県立教育センター
- 菅万希子・鈴木紀子・藤原靖也・吉澤剛・工藤充・加納圭 (2017), 「科学技術コミュニケーション」『国民参画型科学技術イノベーション政策形成に向けたセグメンテーションの開発: 科学技術イノベーション政策に関する世論調査をもとに』北海道大学高等教育推進機構オープンエデュケーションセンター (科学技術コミュニケーション教育研究部門), No22
- 薄井芳奈 (2015), 「授業実践報告 50 分授業で行う遺伝子分野の生徒実験」『人力サーマルサイクラー〜PCR 法で DNA を増やそう〜』兵庫県立須磨東高等学校
- 大藤道衛 (2016), 『「教員のための遺伝子組換え実験教育研修会アドバンスコース」遺伝子リテラシー教育と米国の教育教材』
- 奥村仁一 (2018), 「理科教育学研究」『高等学校生物における科学技術の発展を踏まえた実験の在り方についての実践的研究』日本理科教育学会, Vol.59, No1doi:10.11639/sist.17038
- Bhamla et al. (2017), 『Hand-powered ultralow-cost paper centrifuge』Nat.Biomed.Eng.1: 0009.doi:10.1038/s41551-016-0009
- 吉田晋弥・李余良・玉木克知・塩飽邦子 (2000), 『米粒からの簡易な DNA 抽出と RAPD 法による兵庫県奨励品種の識別』兵庫県農業技術研究センター-Bull. Hyogo Pre. Agri. Inst.(Agriculture)48

### 【参考 Web ページ】

- 内閣府・科学技術政策・科学技術イノベーション総合戦略 2017  
<http://www8.cao.go.jp/cstp/sogosenryaku/2017.html> (平成 30 年 6 月 8 日閲覧)
- 文部科学省・新しい時代における教養教育の在り方について (答申)  
[http://www.mext.go.jp/b\\_menu/shingi/chukyo/chukyo0/toushin/020203.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/chukyo/chukyo0/toushin/020203.htm) (平成 31 年 1 月 15 日閲覧)
- 文部科学省 科学技術基本計画・第 4 期科学技術基本計画  
[http://www.mext.go.jp/a\\_menu/kagaku/kihon/main5\\_a4.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/kagaku/kihon/main5_a4.htm) (平成 30 年 6 月 8 日閲覧)
- PAPERFUGE -INDEX: Design to Improve Life®  
<https://designtoimprovelife.dk/paperfuge/> (平成 30 年 11 月 21 日閲覧)