

9

DNAの抽出（ブロッコリー）

難易度	可能時期	教材の入手日数	準備時間	実施時間
★★☆	一年中	1日	前日 50分	40分

目的と内容

DNAの性質を利用して、実際に生物の細胞から遺伝子の本体であるDNAを抽出し、観察する。また、抽出した物体がDNAであることを確かめる。

生徒はDNAを、とうてい肉眼では見られないものという印象をもちやすいが、エタノールによって沈殿したDNAは、十分肉眼で見たり触ったりすることができ、物質としてDNAを認識できる。多様なすべての生物は、共通した物質であるDNAが遺伝情報を担っているという、「共通性と多様性」を実際に感じることができる実験である。

DNAは核に多く含まれるため、少量の材料からDNAを目に見えるくらいの収量を得るためには、十分な数の核を必要とする。核は同じ生物であれば大きさはあまり変わらないため、細胞が小さいほうが材料中の核の割合が高くなる。さらに、植物はDNA抽出の妨げになりやすいタンパク質が少ないため、簡易的な方法でも再現性が高い。ここでは、細胞が小さく入手も容易なブロッコリーを材料として用いる。

既習事項

中学校：生命の連続性

遺伝子の本体がDNAであること、遺伝子に変化が起きて形質が変化することがあることについて学習している。

中学校の教科書にはブロッコリーから抽出したDNAの写真が掲載されている。

留意点

【指導面】

- ・「遺伝情報を担う物質としてのDNAの特徴について理解すること」がこの単元の目標である。遺伝子は情報であり、DNAは物質である。遺伝子とDNAの違いを意識して指導する。
- ・細胞から遺伝子の本体であるDNAを抽出し、観察することがねらいであるので、手順①～手順⑥は生徒に実習させたい。手順⑦は演示で時間短縮が可能である。

-
- ・DNAは見ることができるか、DNAの色・形はどうかを発言させるなど導入を工夫し、生徒自身が疑問をもち主体的に実験に取り組むように指導する。
 - ・「DNAは1～2mol/Lの塩化ナトリウム水溶液に良く溶ける」「中性洗剤は細胞膜や核膜を破壊する」「常温ではDNA分解酵素がはたらく」「静かにかき混ぜないと、DNAが切断される」「DNAは冷えたエタノールに沈殿する」ことなど、操作の意味を生徒が理解するように指導する。
 - ・「花芽のつぶしが十分か、手際よく手早く行っているか」「抽出液を入れてからの操作が丁寧か」「アルコールを入れる操作で、上手に2層に分けられているか」「繊維状のDNAを得ることができたか」「DNAの確認操作を手際よく行っているか」などのDNAの抽出にかかわる操作ができているか、プリントやレポートなどに過程や結果の記録、整理をしているかなどを机間巡視して適宜指導する。

【安全面】

- ・材料をすりつぶす際に、乳鉢をしっかりと押さえ、手を滑らせないように注意を促す。
- ・高純度のエタノールを使うので、火気に注意する。

【その他】

- ・染色液は落ちにくいので、皮膚や衣服に付着しないように注意する。
- ・可能な限り、少人数の班を構成し、一人一人の生徒が実験に取り組めるようにする。

トピック

DNAの太さや長さほどのくらい？

DNAの太さは0.2nm、塩基間の距離は0.34nmである。(1nm=10⁻⁹m)

ヒトの体細胞1つに含まれる総塩基対は約60億対(=ゲノム約30億対×2組)なので、長さを計算する(※1)と、約2mになる。また、ヒトの染色体数は2n=46だから、1つの染色体に含まれるDNAの長さは平均約4.4cm(=204cm÷46)になる。

DNAの太さを髪の毛(0.1mm)に例えると、核の大きさ(直径)は約5～10μmなので、直径25cm～50cmのバスケットボールくらいの中に100kmの長さのひもが入っている計算になる(※2)。

ブロッコリーの体細胞1つに含まれる総塩基対は約12億対(=ゲノム約6億対×2組)なので、長さを計算する(※3)と、約41cmになる。また、ブロッコリーの染色体数は2n=18だから、1つの染色体に含まれるDNAの長さは平均約2.3cm(=41cm÷18)になる。

※1 60億×0.34nm=6.0×10⁹×0.34×10⁻⁹m=2.04m

※2 DNA：髪の毛=0.2nm：0.1mm=2m：100km=核：ボール=5μm：25cm=10μm：50cm

※3 12億×0.34nm=1.2×10⁹×0.34×10⁻⁹m=0.408m=40.8cm

実験で析出したDNAはそれらがからまった集まりなので肉眼で確認できるが、光学顕微鏡では観察できない。

◎準備

準備の流れ

1ヶ月前～

(発注, 調製, 代替の検討時間含む)

- 器具の在庫確認
- 塩化ナトリウム (食塩), エタノール, 中性洗剤, 染色液の在庫確認
- 実験室の備品確認

～前日

- ブロッコリーの購入, 小分け, 冷凍
- 実験プリント作成・印刷
- 無水エタノールの小分け, 冷凍庫保管

当日

- 器具・教材・薬品の分配
- 熱湯の準備

☆教材の入手方法

・ブロッコリーの入手方法

- ①スーパーマーケットで年中入手できる。大きさによるが1株で約2～4袋分の花芽が得られる。季節毎で値段の差が大きい。1株 80～300円程度
- ②種から育てる(岩手県)。春まきでは, 3月中旬～4月中旬に種をまき, 7月から収穫できる。夏まきでは, 7月に種をまき, 10月下旬から収穫できる。



ブロッコリー

教材の情報

・ブロッコリー

ブロッコリーの蕾には小さい細胞が多く存在するために, 同質量の他の部位に比べ核が多いためDNAも多く, 抽出の材料として適している。

アブラナ科アブラナ属のヤセイカンラン

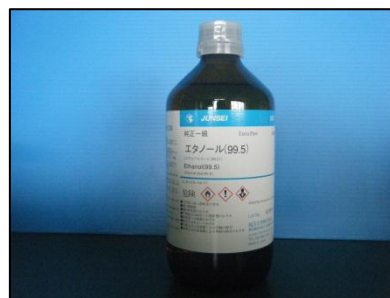
キャベツの変種の1つで, 別変種としてカリフラワーがある。

ブロッコリーは頂花蕾だけでなく, 側枝からも収穫できるのに対し, カリフラワーは頂花蕾だけを食用とできる。ブロッコリーは結球がカリフラワーほど密集しておらず, 伸びた茎の先端に密集した蕾をつくるのに対して, カリフラワーは蕾が一つの塊のように堅く結び付いている。

薬品の情報

・無水エタノール

無水エタノールは冷凍庫に入れても融点が -114.3°C のため凍らない。エタノールが低温のほうがDNAは溶解度が下がり, DNA収率が上がる。



無水エタノール

・染色液

酢酸カーミン染色液, 酢酸オルセイン染色液, ヘマトキシリン染色液など, 細胞観察で染色体を染色する液があれば調製する必要はない。

準備

当日のセット

☆生徒用

<input type="checkbox"/> ブロccoli	約 30 g (1/4~1/2 株分)
<input type="checkbox"/> 無水エタノール (冷凍庫で冷やしたもの)	100mL
<input type="checkbox"/> 塩化ナトリウム	4.0 g
<input type="checkbox"/> スポイト (または割箸)	1つ
<input type="checkbox"/> ろ紙	1枚/人
<input type="checkbox"/> 100mL ビーカー	1つ
<input type="checkbox"/> 水 (水道水で可)	50mL
<input type="checkbox"/> 中性洗剤	1つ
<input type="checkbox"/> 乳鉢・乳棒	1組
<input type="checkbox"/> 茶こし (またはガーゼ)	1つ
<input type="checkbox"/> ガラス棒 (またはピペット)	1つ
<input type="checkbox"/> ピンセット	1つ
<input type="checkbox"/> 9 cm ペトリ皿	1組
<input type="checkbox"/> 染色液	1つ
<input type="checkbox"/> キッチンペーパー (または新聞紙)	1枚

★教員用

<input type="checkbox"/> 熱湯	適量
<input type="checkbox"/> ドライヤー	



準備に必要な用具

- ・切ったブロッコリーを入れる袋
- ・解剖ばさみなど蕾部分を切るもの
- ・はかり
- ・冷凍庫
- ・冷凍庫
- ・プラスチック容器
- ・薬さじ
- ・薬包紙
- ・はかり
- ・50mL ビーカー
- ・ラップ
- ・くぎ
- ・熱湯
- ・はさみ



容器, 抽出液を得るための用具, エタノールを入れる用具, DNAを取り出す用具, 乾かしやすくするための用具などは代わりになるものを工夫してかまわない。

サポート資料の見方

顕微鏡の使い方

生物の特徴

遺伝子とDNA


生物の体内環境の維持


生物の多様性と生態系

巻末資料

①前日まで

ブロッコリー、無水エタノール、塩化ナトリウム（食塩）、中性洗剤、染色液、ろ紙を用意する。

 茎部分は少ない方が細胞を粉碎しやすいため、ブロッコリーの蕾部分を切り取り、約 30g ずつ小分けして冷凍する。



 凍らせることで乳棒で細胞が壊れやすくなり、また、DNA分解酵素のはたらきを抑えることができる。




ブロッコリーの蕾部分の切り取り



ブロッコリーの冷凍

 無水エタノール（99.5%）は容量の少ないポリ容器に約 100mL ずつ分けて、実験の直前まで冷凍庫（普通-20℃程度）でよく冷やしておく。  ガラス容器に入れてしまうと冷たくて持てない。

塩化ナトリウムは 50mL ビーカーの中に 4.0g ずつ取り分けておく。吸湿性があるため、ラップ等で上部を覆う。  実験直前に水溶液にしたほうがつくり置きした水溶液よりDNAとヒストンタンパク質が離れやすい。

染色液がなければ、調製（巻末資料「調製集」を参照）後、小分けする。

ろ紙をはさみで2つに切っておく。

スポイトでDNAを取り出す場合、温めた釘をスポイトの吸い口に入れて内径を広げておくと、DNAを吸い取りやすく便利である。



塩化ナトリウムの計量



無水エタノールの冷却

②当日

器具・薬品を分配してセットを用意する。冷凍庫に入れているブロッコリー、エタノールはセットに入れない。熱湯の準備をする。

ブロッコリー、エタノールは実際に使う直前に冷凍庫から取り出し、配付する。

◎観察, 実験

観察, 実験の流れ

□導入

- ・ DNA を見ることができるか 答) エタノール沈殿によって見るができる
- ・ 色・形はどうか 答) 溶解しているときは無色透明, エタノールによって白い繊維状で析出する
- ・ なぜブロッコリーを材料に使うのか 答) 細胞が多いためDNAが得やすい,
DNA抽出の妨げになるタンパク質が少ない
- ・ DNAを確認する方法はどんなものがあるか 答) 酢酸オルセイン染色液などを使う,
ジフェニルアミン反応などで検出する

・ 既習事項の確認

□目的を理解させる

□観察, 実験

- ・ 実験手順の指導
- ・ 生徒へのアドバイス
- ・ 安全面への注意
- ・ DNAを抽出し, DNAであることを確認させる(本実験)

□結果のまとめ, 考察

- ・ 観察からわかったこと
- ・ タンパク質の多い動物でDNAを抽出するにはどのようにすればいいか
答) タンパク質分解酵素や熱などによる変性を利用して, タンパク質を除去して抽出する


□後片付けの指示

手順

時間のめど (およそ 40 分)

※詳しい手順は付録「09 DNAの抽出.pptx」を参照

① 抽出液の作成 (3分)

塩化ナトリウム(食塩) 4.0g が入った 50mL ビーカーに水 50mL を溶かし, 中性洗剤を 2 滴ほど加える。  → 状態 1 の原因 3 (p. 111)



1 ~ 2 mol/L の塩化ナトリウム水溶液がDNAをよく溶かす。 DNAは染色体の中でヒストンタンパク質と結合しているが, この濃度で離れやすくなる。水 50mL に塩化ナトリウム 4.0g を溶かすと, 約 1.4 mol/L の塩化ナトリウム水溶液になる。



中性洗剤は細胞膜や核膜を破壊する。 DNAは細胞内の核にあり, 細胞膜や核膜の主成分はリン脂質であるため, 中性洗剤中の界面活性剤のはたらきで膜が壊れる。



② 細胞の粉碎（5分）

凍ったままのブロッコリーの蕾部分を乳鉢に入れ、蕾が確認できないくらいまで乳棒ですりつぶす。



常温ではDNA分解酵素がはらたくので、手順

②～⑤の操作を15分以内に行う。



→状態2の原因1 (p. 111)




細胞の粉碎



粉碎のめど

③ DNAの抽出（1分）

②に①の抽出液を加え、乳棒で静かにかき混ぜる。 →状態2の原因2 (p. 111)



静かにかき混ぜないと、DNAが切断されるので注意する。



④ DNAの抽出液のろ過（3分）

茶こし（なければガーゼ）で③をろ過する。


ろ液の中にDNAが含まれている。多少の混入は気にせず、乳棒で上から軽く押すようにして多くのろ液を得たほうがよい。



→状態1の原因1 (p. 111)



⑤ DNAの析出（5分）

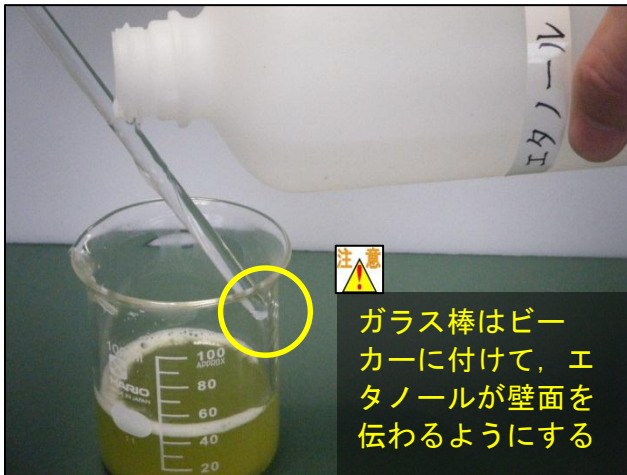
ガラス棒を使って、④のろ液にろ液と同量程度の冷エタノールを、エタノールの層がろ液の上部にできるように静かに注ぐ。 → 状態3の原因1 (p. 111)



付録資料のスライド17



動画ファイル「エタノール入れ」に動画あり



DNAは冷えたエタノールに難溶性で析出、沈殿する。析出したDNAは白い物質である。

エタノールは水より比重が軽いいため、静かに注ぐと、上からエタノールと水の2層になり、ろ液との接触面からDNAが析出し、エタノール層に沈殿が浮かんでくる。エタノールは高価なため同量程度としたが、加える量は多くてもよい。

DNAが析出する際、気泡を含んだものが現れることがある。この気泡は、エタノールにもともと溶けていた空気が、水と混合した際に溶けきれなくなったものがDNAに付いたものである。



生徒の技量に応じて、エタノールを壁面にピペットを使って静かに加えてもよい。

⑥ DNAの回収（5分）

白い繊維状になったDNAをスポイトや割箸などで取り出す。




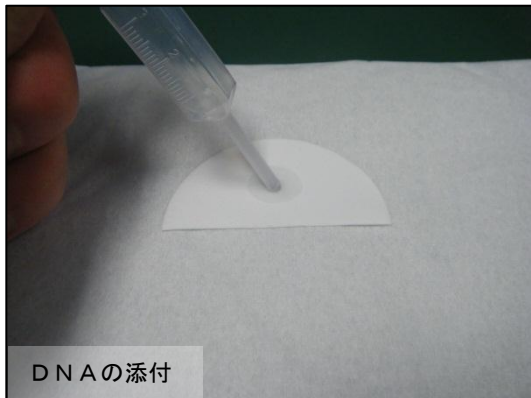
教科書ではガラス棒で巻き取るものが多いが、ガラス棒では絡みにくいため取り出しにくい。

スポイトはDNAを回収しやすい、次の手順で思った所に置きやすいというメリットがある反面、エタノールを含みやすいため、ろ紙が乾きにくい。割箸はガラス棒よりDNAを回収しやすい、エタノールをあまり含まないというメリットがある反面、DNAを置く位置が思い通りになりにくい。



⑦ DNAの確認 (18分) 

取り出したDNAをろ紙の上に置き、ドライヤーなどで風を送ってエタノールをとばす。ろ紙の下にキッチンペーパーを敷いた方が乾きやすい。乾燥後、染色液に3分程度浸してから、ペトリ皿の中に、ろ紙に直接かからないように熱湯を注ぎ、ろ紙を静かにゆするよう脱色して確認する。



DNAの添付



染色




脱色



DNAが染色されたもの



注意 熱湯は、ろ紙に直接かけないこと。

生徒実験でのDNA検出方法として、酢酸カーミン染色液や酢酸オルセイン染色液などでの染色がある。核や染色体の染色液として生徒も使っているため、理解しやすい。ろ紙にDNAを置くとき、●や▲などの記号や簡単な字を書かせるとよい。スポイトの場合、吸い取りやすいがにじみやすいので細かいものは難しい。水を交換し脱色を念入りしてから乾かすと差がわかりやすい。

まとめ

- ① DNAは1~2 mol/Lの塩化ナトリウム水溶液に溶けやすい、冷えたエタノールには難溶性で白く沈殿するなどの性質を利用して、遺伝子の本体であるDNAを生物の細胞から抽出できた。
- ② また、核を染める染色液を利用した方法で、抽出できたものがDNAであることを確認できた。

◎後片付け

■後片付けのさせ方

- ・流しに捨てて問題になる薬品を使用していないので、ビーカーのろ液などは洗い流してよい。ただし、細かいブロッコリーが残ると悪臭の原因になるため、しっかり水で流させる。
- ・茶こしの中のブロッコリーの粉碎物は、生ゴミとして捨てさせる。教卓に回収容器を準備しておくとうよい。ろ紙は、燃えるゴミに捨てさせる。
- ・解剖ばさみ、ビーカー、乳鉢、乳棒、茶こし(ガーゼ)、ガラス棒、スポイトなどは水で洗わせる。
- ・洗った器具は回収し、洗い方が不十分なものは再提出させる。

■器具等の管理

- ・回収したものは種類毎に分け、再点検した上で乾かし、所定の器具置き場に戻す。

失敗例

●状態1 最後に何も出てこない

原因1 収量が少なすぎる

最大の原因はDNAが途中で無くなってしまうことである。純度よりも収量を多くすることを目指すことよい。

- (1) 部位：茎の部分をあまり入れず、花芽を多くする。
- (2) 総量：すりつぶす材料を多くする。
- (3) 操作：実験手順③で、しっかりすりつぶす。（しかし、時間をかけ過ぎない。）
- (4) 操作：実験手順④で、しっかり抽出液を取り出す。

原因2 温度が高すぎる

エタノールによるDNAの沈殿は温度が高いとうまくいかないの、エタノールをよく冷やしておくこと。さらに、DNA抽出液も冷やすとよい。

原因3 食塩水濃度が下がりすぎる

1～2mol/Lの食塩水がDNAを良く溶かすので、食塩水の終濃度が1mol/Lより下がらないように食塩の量を調整すること。

原因4 実験操作を間違えている

中性洗剤を入れたか、エタノールを十分加えたかなど確認すること。

●状態2 白く濁って、糸状のものが出てこない

原因1 最初にすりつぶすときに時間をかけすぎる

DNA分解酵素がはたらくので、時間をかけすぎると分解されてしまう。長くても10分以内にする。

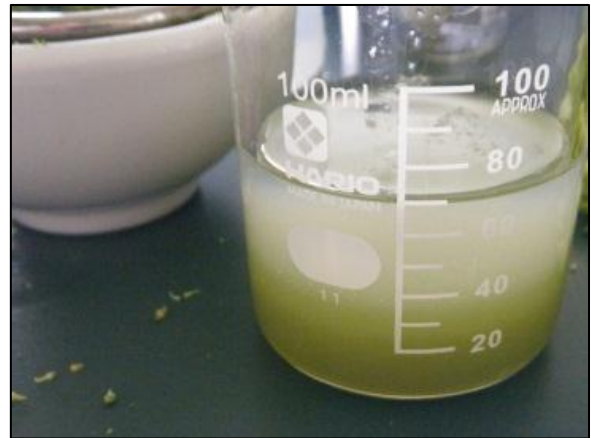
DNA分解酵素がはたらきにくいように、また、細胞を破壊しやすいように、材料を凍らせること。

原因2 抽出液を入れてから強くかき混ぜすぎる

抽出液を入れると、DNAを守るように結合しているヒストンというタンパク質が離れるために、DNAが切れやすくなっている。

抽出液を入れてからは、静かに優しくかき混ぜること。

※生徒がDNAを判別できないだけの場合もあるので、確認すること。



断片になり白く見えるDNA

●状態3 DNAがどれか分らない

原因 ろ液とエタノールを混合させた

ろ液に勢いよくエタノールを注ぐと、ろ液とエタノールが混合する。エタノール量を増やすとDNAは沈殿するが、DNAにブロッコリーの組織片がからまりわかりにくくなる。

エタノールをろ液の上に層になるように注ぐと、ろ液との接触面からDNAが析出し、エタノール層に沈殿が浮かんでくる。

別法 ※別法②については、概略のみ掲載（別ファイルに詳しく記述）

別法①

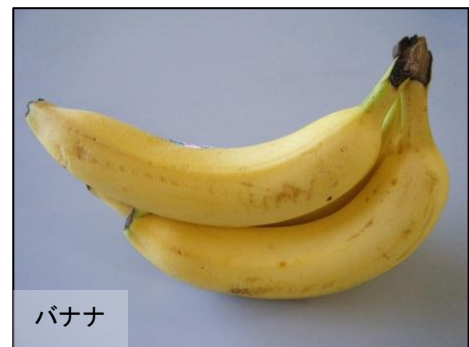
- ・材料に同じくブロッコリーを使うが、乳鉢、乳棒を使わず、ミキサーを利用するもの
- ・材料にタマネギなどを使い、ミキサーを利用するもの
- ・材料にバナナを利用するもの

ミキサーを粉砕用を使う場合、材料を氷とともに粉砕する。このペースト状のものを数班に分け、生徒は抽出液作成、DNAの抽出、ろ液の収集、DNAの沈殿、DNAの確認を行う。抽出液の塩化ナトリウム濃度は最終濃度が1～2 mol/Lになるように、少し高濃度の抽出液をつくる必要がある。

バナナは、細胞間の結びつきが弱くすりつぶしやすいが、細胞が大きいため量が必要なこと、ペースト状になるためろ過は重ねたガーゼを使うことや後片付けが手間なこと、糖度が高いため器具の水洗いや実験台の清掃を念入りにする必要がある。




タマネギ



バナナ

別法②

- ・動物性のトリのレバーを材料とするもの
- ・魚（タラなど）の白子を材料とするもの
- ・口腔上皮細胞を材料とするもの

動物性の材料をDNA抽出に使う場合、タンパク質が多いためタンパク質分解酵素（ コンタクトレンズ用タンパク除去剤）を使い、DNA分解酵素があるため加熱して熱変性させ、その後DNA沈殿のためろ液を冷やすなど、手間が多いため1単位時間には収まりにくい。また、ブロッコリーに比べ臭いが強い。

2時間続きの実験とし、植物と動物のDNAを抽出する探究活動として取り組ませるとよい。

器具の取り扱い

・解剖ばさみ（準備で使用）

生物実験で、生物の組織を切るための器具。留め金が固定されているタイプと分離するタイプがある。普通のはさみと同様に使うが、生物の組織を切るため、洗浄後に水気をしっかり取らないとサビの原因となる。分離するタイプでは、ペアを間違えると切れないことがあるので、注意する。



・乳鉢、乳棒

試料を細かくすりつぶしたり、混ぜ合わせたりするための器具。壊れやすいので、乳棒をたたきつけるなどはしない。試料を押し付けるように回転を加え、圧搾粉碎する。乳鉢を直接、机の上に置かず、ゴムマットや本の上などにおいて使ったほうがよい。

9 cm のもので実験できる分量にしたが、大きい乳鉢のほうがつぶしやすい。



・ガラス棒

エタノールを注ぐ際に、ビーカーのろ液より上部の壁面にガラス棒を付け、静かにガラス棒に伝えるようにする。抽出液の上層にエタノールの層をつくると、境界付近から比較的純度の高いDNAが沈殿してくる。

