

平成24年度 インスパイア・ハイスクール事業

教材開発・実践「電気泳動法を使ったDNAに関する実習」取り組み報告

生徒実習「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 薄井 芳奈

電気泳動法を使ったDNAに関する実習では、小さなマイクロチューブにいろいろな溶液をマイクロピペッターで入れて反応させ、産物を電気泳動にかける、という操作になり、操作をする生徒たちがきちんと意識を持っていないと、実感を持ちにくい、あるいは、何をやっているのかわけが分からなくなってしまう、といった不安もあります。また、器具や装置が研究の現場で用いられているものであるため、高校現場にとっては高価で導入しにくいことも否めません。

今回行った「人力サーマルサイクラー」は、実際には専用の機器「サーマルサイクラー」を用いて自動的に与えるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法の温度変化を、電気ポットや恒温槽を使って、生徒たちが人力で与えていく実習です。この方法を使えば、高価なサーマルサイクラーがなくてもPCR法を行うことができ、生徒たちにとっては「ブラックボックス」的な機器の中で進むことを外に取り出して自分たちで行うので、PCR法の原理を実感を持って理解することができます。



取り組みの概要

この実習は新課程「生物」の教科書(数研出版 p.133)「観察&実験 DNAを増やそう」を参考に、キットは(株)リバネス Feel so Bio シリーズの「PCRキット」を用いて行いました。

理系3年 生物Ⅱ の授業として3クラス42名を対象に 1月10日(木)～18日(金)の期間に2コマ半を使って取り組みました。

第1回(0.5コマ) PCR法の復習と実験の手順について

(1クラスのみ電気泳動用バッファとゲルの作製、チューブの準備)

第2回(1コマ) PCR(約17～20サイクル可能)

第3回(1コマ) 電気泳動と観察(泳動中に関連の入試問題演習)

1組	4組	8組
10日	10日	11日
—	11日	—
15日	15日	16日
18日	16日	17日

PCR産物は4℃で保存することができるため、PCRの操作と電気泳動を別々の日に分けて行うことができます。そのため、本実習は2コマ連続の授業を設定することなく通常の時間割の中で実施できることも大きな魅力と考えます。

使用キットのほか、本年度のインスパイア事業で導入したウォーターバス(ヤマト科学 BM100)は温度精度もよく本実習に使い勝手がよいものでした。また、電気泳動装置をはじめ、カラーマイクロチューブやアイスクラッシャーなど、本事業で導入したものを十分に活用できました。

実習の方法

準備：

- ① クラッシュアイスを用意する。
- ② キットの指示に従い、必要な試薬をマイクロチューブに分注しておく。
- ③ 電気ポット、恒温水槽、ウォーターバスを用いて、95℃・58℃・72℃の湯を用意する。
PCRチューブは小さく、水中に深く入れることはできないので、水面近くの温度が設定通りになるようにしなければならない。
(電気ポットは98℃保温にしているにもかかわらず水面近くの温度はすぐ下がるので、実験中は「再沸騰」ボタンをこまめに押して、チューブを入れていないときにはフタをしておく必要があった。)

実習：

キットにはプライマーFが3種類、プライマーRは1種類入っているため、試料は次の4種類を2班(3~4人)で2種類ずつ担当する。

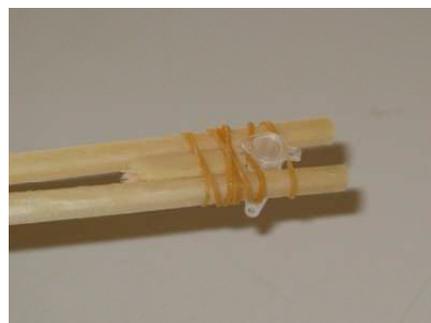
- 1-：プライマーF 1使用・PCRの温度変化を与えない
 - 1+：プライマーF 1使用
 - 2：プライマーF 2使用
 - 3：プライマーF 3使用
- } PCRの温度変化を与える

この4種類の試料とDNAマーカー各班1本、合わせて6つの試料を1枚のゲルに走らせて、泳動結果を比較する。

→ 温度変化を与えなければDNAの増幅が起こらないこと、温度変化を与えると、プライマーで挟まれた特定の部分の決まった長さのDNAが増幅されることを確かめる。

1. PCR

- ① 必要な試薬をマイクロピペッターでPCRチューブに取る。
- ② 割り箸と輪ゴムを用いた器具にPCRチューブを差し込む。
- ③ 温度管理と時間に注意し、キットで指示された温度変化を与える。チューブはフタを水中に浸さないように注意。



95℃ 3分
↓
95℃ 30秒 ←
↓ ↑
58℃ 30秒 ↑
↓ ↑
72℃ 45秒 →
↓
72℃ 5分 → 4℃ Hold

2. 電気泳動

試料とマーカーにローディングバッファを加え、電気泳動を行う。



泳動結果の例 ↑

取り組みの成果・今後の検討事項

- ◇ 冬場で温度の管理が難しく、生徒の行っている様子を見ると、1～2℃の湯温の低下はあったようだが、どの班も増幅できたチューブがひとつ以上あり、温度のずれがあっても電気泳動で確認できるだけの増幅はできていたことがわかった。
- ◇ PCRのサイクルは50分の授業時間内に17～20回行うことができおり、17サイクルで十分明瞭に電気泳動でバンドが確認できることがわかった。
- ◇ バンドが確認できなかった、または、薄くしか出なかったのは、PCRチューブのフタが途中で開いて、ポットの湯が混入してしまったものであった。PCRチューブは肉薄で、高温下ではやわらかくなって「割り箸で挟む」固定法だと変形して密閉が失われやすかった。そのため、あとに実施したのクラスでは、チューブの変形が起りにくいようにチューブの直径に合わせて割り箸の開き具合を調節し、生徒にもチューブを湯に深く浸さないように注意を促した。しかし、チューブが小さいため、温度が上がって内容物が気化したときに内圧に耐えきれずにフタが開いてしまうことがあり、ポットの湯が混入してしまった班もあった。今後、最も重要なこの過程を確実にを行うために、たとえば、PCRチューブではなく1.5mLのマイクロチューブを使ってみるなど、工夫がさらに必要である。
- ◇ 今回実施したクラスはすでにDNA切断・結合実験でマイクロチューブやマイクロピペッターの扱い、電気泳動用ゲルのウェルへのサンプルのアプライなどを経験済みで、操作自体はスムーズに行うことができていた。そのため、生徒の側にも何をやっているのかをきちんと把握するゆとりがあったようすであった。



単純な行程の繰り返しだけで、DNAの増幅が行われているのかどうか、半信半疑で実験をしていた生徒たちが、泳動結果を見て、プライマーの違いによって本当にそれぞれ異なる長さのDNA断片が増幅されて鮮明なバンドとして認められることに驚きの歓声を上げていました。

PCRの過程を実感を持って理解することができ、また、機器によって何を自動化しているのか、なぜそれができるようになったのか、といったことへの理解も深まったようです。

この分野における、高等学校ならではの、実りのある実習であると感じたので、今後、キットの価格の問題はあるものの、できれば引き続き、工夫を加えて実施していきたいと考えています。