

「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

本校では、平成24年度（2013年1月実施）から「人力サーマルサイクラー」の生徒実験を行っている。「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、DNAの特定領域の断片を短時間で増幅させる実習である。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る。今回、初年度から3回目となる実習を実施した。既製のキットを使用する都合上、前もって教師実験として試してみることができないため、毎回、少しずつ方法を変えて、試すことを行ってきたので、その中で分かってきたことについてまとめてみた。

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、（株）リバネス Feel so Bio シリーズの「PCRキット」を用いて実施した。

1. 3年間の実施内容

- ① 2013年（33回生） 3年理系 生物Ⅱ 3クラス 42名 2013年1月10日（木）～18日（金）
- ② 2014年（35回生） 2年理系 生物 2クラス 35名 2014年2月18日（火）～20日（木）
- ③ 2015年（36回生） 3年理系 生物 2クラス 35名 2015年5月14日（木）～15日（金）

いずれも、「遺伝情報の発現」の単元で通常の授業内での実験として以下の展開で実施した。

事前学習（0.5コマ）PCR法の復習と実験の手順について

マイクロピペットの操作練習・ダミーのゲルを用いてアプライの練習

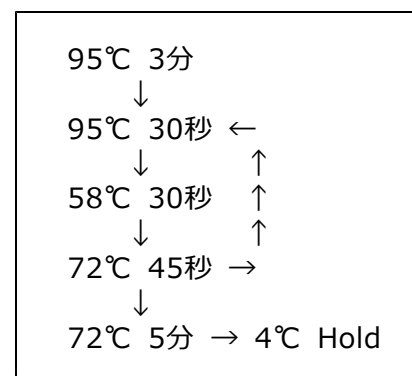
第1回（1コマ）PCR（約17～20サイクル可能）

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。

必要な試薬を取り、4種類のチューブを作る。

チューブを割り箸に挟んで湯に浸し、温度変化を与える。

- 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（右図）



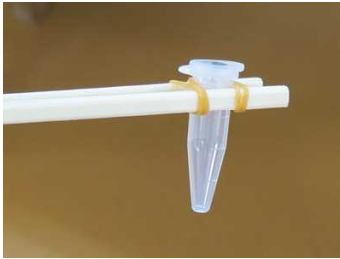
キットに指示された温度変化

第2回（1コマ）電気泳動と観察

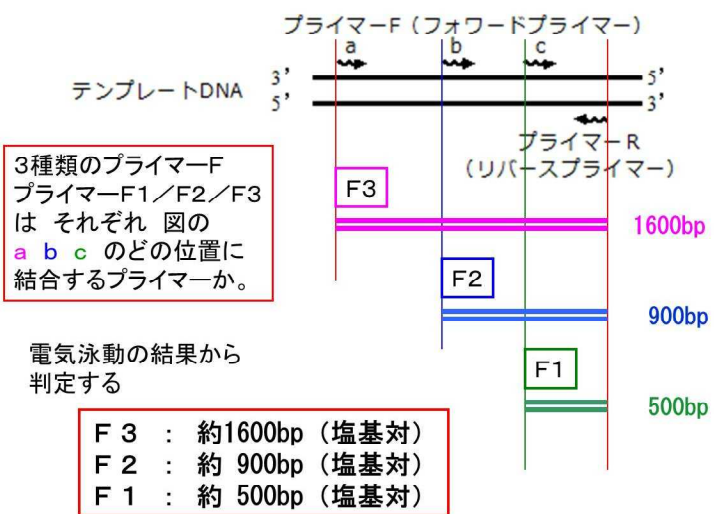
試料とマーカーにローディングバッファを加え、電気泳動を行う。泳動後、紫外線ランプでバンドの位置を確認する。泳動結果からプライマーの位置を推定する。

実験のようす

2014年（35回生）1.5mL チューブで実施



PCRではプライマーを選ぶことによりDNAの特定の領域だけを増やす



2015年（36回生）

0.2mL PCR チューブで実施



2. 変更・改善点とその検討

各回のトラブルに対応するために、主に使用チューブについて変更を行った。

① 2013年 PCRチューブを使用

輪ゴムは滑り止めの役割なので絞めてはいけないという指示が徹底せず、割り箸に巻くゴムをきつく絞めた班があり、チューブが変形したり途中でふたが開いたりして、チューブ内に水が入るトラブルがあった。

1.5mL
チューブ

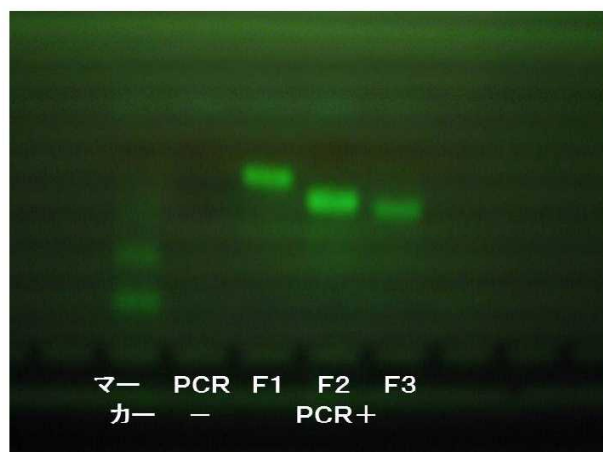


0.2mL
PCR
チューブ

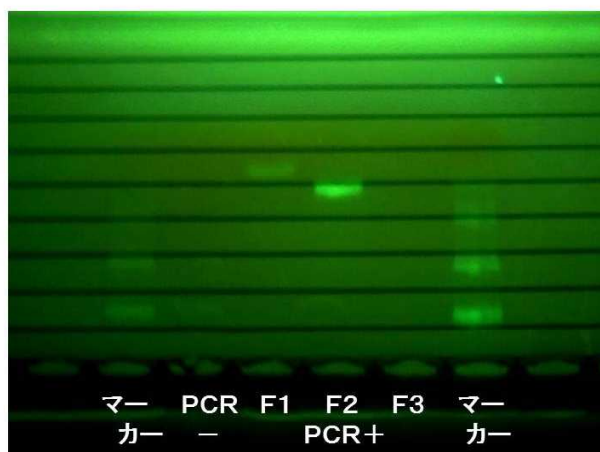
② 2014年 1.5mL マイクロチューブを使用

PCRチューブは薄くて変形しやすいことから、前年のトラブルを回避するために、数研出版の教科書ではマイクロチューブを使っていることを参考に、マイクロチューブで実施した。

2013年(PCRチューブ使用)



2014年(1.5mLチューブ使用)



F 1 : 約 500bp (塩基対)
F 2 : 約 900bp (塩基対)
F 3 : 約1600bp (塩基対)

昨年ほどの班もF3が出なかった
なぜでしょう？
2013年と変えたのは、
試料を入れるチューブ！

すべての班でF3のバンドが出なかった。その原因を、キットを出している(株)リバネスのスタッフの方にも連絡を取るなどして検討した。マイクロチューブは厚みがあり、温度の伝わりがPCRチューブよりも鈍くなったため、プライマーで挟まれた領域が一番長いプライマーF3では、キットに指示された72℃45秒の複製時間の間に複製しきれず、そのため、プライマーに挟まれた領域の断片が作られなかったためと考えられる。

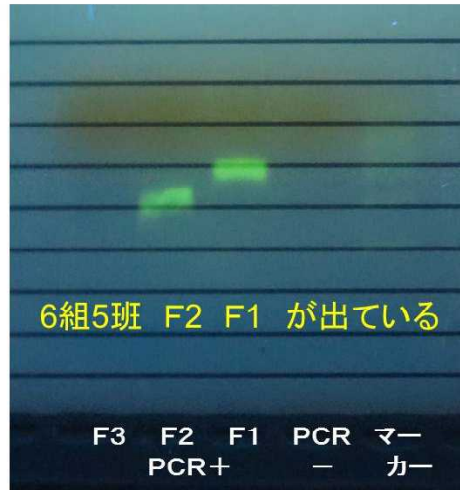
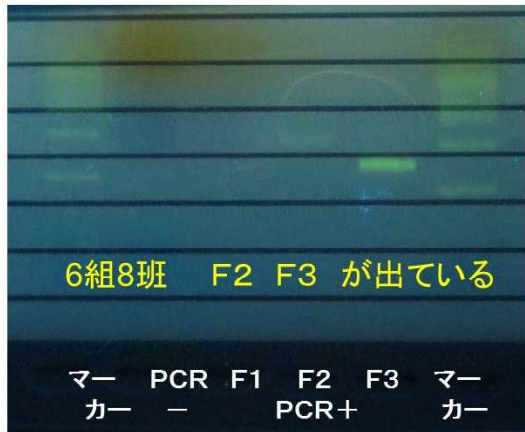
③ 2015年 PCRチューブを使用

再び、PCRチューブに戻して、チューブの変形を防ぐ以下の2つの指示を徹底して行った。

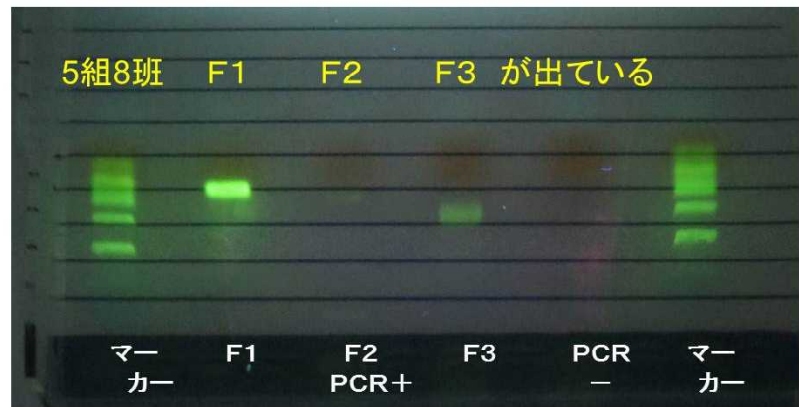
- ・割り箸に巻く輪ゴムを絞めすぎない
- ・ふたが開くことがあっても水が流れ込まないようにチューブを深く湯に沈めない

結果としては、バンドが出ないレーン、バンドが薄いレーン、が、班によって異なる、ばらつきの大きい結果になった。いくつかの班の結果を以下に示す。

今年 2015年(PCRチューブ使用)



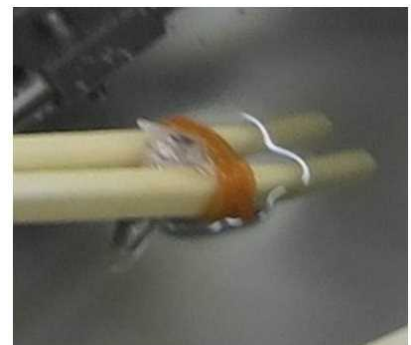
F1 約 500bp
F2 約 900bp
F3 約 1600bp



ピペット操作の不確実さから、必要なものがきちんとチューブに入って混合されていたかどうか、の検討は必要であるが、今回はチューブを湯に浸すときの浸し方に問題があったのではないかと考えられる。

特に、5組8班に見られるように、バンドが出ているものの一部のバンドがうすい、というのは、きちんと複製できなかったサイクルと、複製できたサイクルがあって、断片の量が十分増えていないためと考えられる。

今回、割り箸に挟む位置（なるべく先端に挟む）の指示やフタぎりぎりの深さまでチューブをきちんと浸す、といった細かな指示が不十分で、当日の写真を見ると、右図のような浸し方になっているものがあった。これでは、温度が正しく上がらなかった可能性がある。チューブを深く沈めないという指示が、返って不適切な操作につながってしまったようだ。



3. 今後の課題

50分という限られた時間で一定回数以上のサイクルを繰り返す必要があるため、生徒のピペット操作のスムーズさ、確実に溶液を取り、取った溶液が混ざっていることなど、手元をよく見て正しく操作する基本的なことが重要になる。事前学習と練習が大切である。

必要なサイクル数については2014年（35回生）に班による回数の差があり、

- ・12サイクルでは全くバンドが現れなかった。
- ・15サイクルで判別できるバンドが現れた。
- ・17サイクル以上で鮮明なバンドが得られた。

の結果であった。

手順よく行えば、50分で17サイクルは可能であるため、各チューブに入れるものと分量の組み合わせ、ピペットのダイヤルの確認など、実験書や板書を工夫して、班の全員が何をしているかを理解して、連携して的確に早くできるようにすることが必要である。

	①-	①	②	③	温度	時間
① テンプレート DNA	5μL	5μL	5μL	5μL	95°C	30s
② プライマー-R (11ハース)	5μL	5μL	5μL	5μL	95°C	30s
③ プライマー-F (74ハース)	5μL	5μL	5μL	5μL	58°C	30s
④ マスターミックス	15μL	15μL	15μL	15μL	72°C	45s
結果	PCR-	PCR+	PCR+	PCR+	72°C	5s

マクロピペットのチップは
交換する液ごとに交換

ピペットダイヤル
5μL 2本
15μL 1本

分注は
5分ごと
おぼろ!!

正確にピ
底に入らせる
マスターミックス
きちんと混ぜる!!

マスターミックス
入れたりよく見て
ピペッティング

特に、複製を確実にするために、72°C 45秒が確実に行われなければならない。72°Cの時間を50秒、55秒など、少し長めに取ることも試してみたいが、時間を延ばすとサイクル数が減ってしまう心配が出てくるので、悩ましいところである。

チューブについては、0.2mLのPCRチューブを使用する。

割り箸に挟むときに、ゴムを絞めすぎないことが肝要である。その指示を徹底した2015年では変形は見られなかった。

ただし、湯に浸すときにはチューブをフタぎりぎりまで、確実に湯に入れる必要がある。そのため、チューブの保持に、割り箸と輪ゴム以外の工夫ができないか、さらに検討が必要と考えている。水面に垂直にチューブを差し入れることができる方が望ましいので、針金と割り箸などを利用して保持用の器具を作製してみたい。

生徒にも、漫然と浸すのではなく、チューブの状態をきちんと見ておくことを求める必要がある。さらに、温度設定は水面近くの温度が指定の温度になっているかを確認することが大切である。

フタが開いてしまった2013年には、チューブ内での溶液の蒸発も気になり、ミネラルオイルの添加も考える必要があるかと思ったが、PCRチューブを用いた2015年にはふたは開かず、すべてのバンドが観察できた班もあったので、当面は無しで続けてみようと考えている。

3年間にわたって生徒たちの協力を得る形で試行錯誤をしてきた。その中でいろいろと押さえておかなければならないことが分かってきた。この実験は、高等学校ならではの魅力的な実習であると考えているので、より、確実に結果が得られるように、工夫を重ねて実験をプランしたい。

(2015年6月10日)