

実践報告「人力サーマルサイクラー ～手動式 PCR 法で DNA を増やそう～」 実感をもってしくみを理解する 高等学校ならではのバイオ実習

兵庫県立須磨東高等学校 薄井 芳奈

1. はじめに

「遺伝子」の分野は、新課程では生命科学の急速な進展に対応した、新しい学びの大きな柱として位置づけられている。「生物基礎」では「遺伝子とそのはたらき」について学習し、「生物」では遺伝情報の発現のしくみや発現調節、さらにはバイオテクノロジーについて学ぶことになっている。特に、バイオテクノロジーの単元では、最先端の研究を支える手法や技術、現代社会のさまざまな分野との関わりも深い内容にふれていくことになるのだが、それが羅列的な扱いに終始してしまわないような工夫が求められる。

近年は、例えば SSH や SPP の取り組みなどで、大学で行われている実習の先取り体験や、バイオの手法を用いた課題研究が多くの学校で行われている。私自身も本校における SPP の取り組み^{注1}を通して、そのような体験が生徒たちに大きな成長をもたらすことを実感している。

しかしながら、それとは別に、この単元における授業の中での取り組みとしての実験実習を考えていく必要性を感じていた。例えば、ネギの根端を使って体細胞分裂の観察をする実習と同じように、授業の中で生物を学ぶ生徒みんなが取り組む実験実習、教室での学習を自分の手を動かすことで追体験し、実感をもって理解を深めるとともに、科学の手法にふれる機会をもつ実験実習の必要性である。そのため、本校では、平成 22 年度から 3 年間をかけて、兵庫県の事業「魅力あるひょうごの高校づくり推進事業 ～インスパイア・ハイスクール～」の取り組み^{注2}の一環として、遺伝子分野の実験教材を授業に取り入れ、実践を試みてきた。

そのような中、新課程「生物」の教科書の見本で、サーマルサイクラーを使わない PCR 実験「DNA を増やそう」(数研出版「生物」p.133 に掲載)を目にし、そのコンセプトに大いに共感を覚えた。さっそく準備を行い、旧課程「生物 II」の授業で実施してみた。本稿ではその実践内容と今後の課題について報告したい。

2. 実習の概要

今回行った「人力サーマルサイクラー」は、通常、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、生徒たちが手動で与えていく実習である。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「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 法の原理を実感をもって理解する機会となる。

PCR 産物はそのまま 4℃で保存できるため、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る。そのため、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本実習の大きな魅力となっている。



図1 実習のようす

キットは(株)リバネス Feel so Bio シリーズの「PCR キット」を使用し、理系 3 年「生物 II」の授業として 3 クラス 42 名を対象に、事前学習も含めて 50 分授業 2 コマ半を使って実施した。

- ・第 1 回(0.5 コマ)
…事前学習 PCR 法の復習と実験の手順について
- ・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)

なお、授業時間数にゆとりのあった 1 クラスでは、電気泳動用バッファとゲルの作製、分注用マイクロチューブの準備も生徒たちに行ってもらった。

3. 実習の方法

準備:

- ① クラッシュアイスを用意する。
- ② キットの指示にしたがい、必要な試薬を班ごとのマイクロチューブに分注しておく。
- ③ 電気ポットやウォーターバスを用いて、95℃・58℃・72℃の湯を用意する。

実習:

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

- | | |
|----------------|------------------|
| 1-:プライマー F1 使用 | … PCR の温度変化を与えない |
| 1+:プライマー F1 使用 | } PCR の温度変化を与える |
| 2+:プライマー F2 使用 | |
| 3+:プライマー F3 使用 | |

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トで PCR チューブに取る。
- ② 割りばしと輪ゴムを用いた器具に PCR チューブを挿しこむ(図 2)。チューブに持ち手をつけることで、やけどを防ぎ、水槽の移動もスムーズになる。

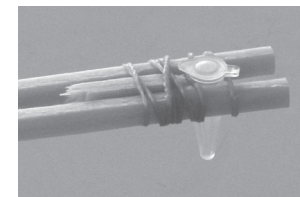


図2 割りばしに挿しこんだチューブ

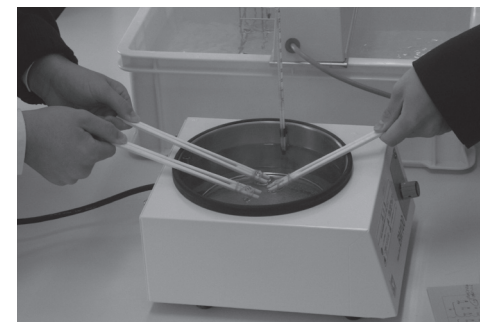
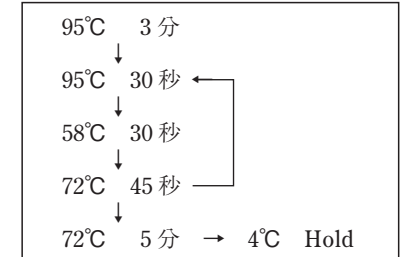


図3 温度変化を与えているようす

- 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(図 3)。何サイクル行ったか、記録しておく。水の混入を防ぐため、チューブはふたを水中に浸さないように注意。



(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。本キットはゲルの染色をする必要がないので、泳動後のゲルに紫外線ランプの光を照射して、蛍光を発するバンドの位置を記録する。観察は目を保護するために黄色いセロファン(キットに指示がある)を通して行う。

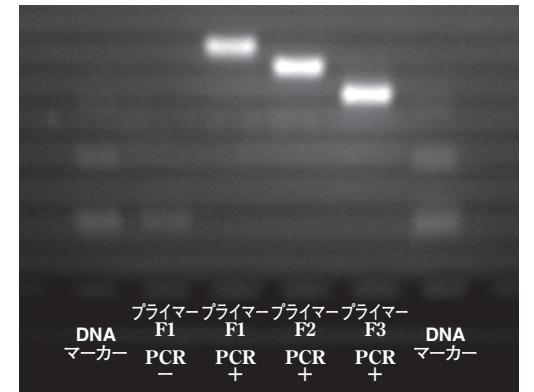


図4 電気泳動結果の例

考察:

- ① 繰り返したサイクル数で、DNA が何倍に増幅されているかを計算する。
- ② 電気泳動の結果から、テンプレート DNA に結合するプライマー F1/F2/F3 とプライマー R との位置関係を類推する。
- ③ マーカーとの比較により、増幅された DNA 断片の大きさを推定する。

4. 実験結果について

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。

冬場で温度の管理が難しく、途中1～2°Cの湯温の低下はあったようだが、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。

PCRチューブのふたが途中で開いてポットの湯が混入してしまったものはバンドが上手く出なかった。PCRチューブは肉薄で高温下では柔らかくなり、変形して密閉が失われたり、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ふたが開いてしまうこともあった。今後、最も重要なこの過程を確実にを行うために、1.5 mL マイクロチューブを使うなど、さらに工夫が必要である。

5. 使用キットと器具について

(1) 使用キット

数研出版の教科書「生物」の教授資料(p.123)にも紹介されている、(株)リバネス Feel so Bio シリーズは、学校用にセットされているもので、説明書を(株)リバネスのホームページで閲覧できるため、導入の検討時にも便利である。

「PCRキット」はサーマルサイクラーを使うことを想定してつくられているキットであるが、本実習に問題なく使用できた。PCRに必要な試薬、電気泳動用バッファ、アガロースの粉末、1.5 mL マイクロチューブとともに0.2 mL PCRチューブもセットされていて、消耗品や試薬の買い足しをしなくても実習ができるようになっている。ネガティブコントロールの取り方を工夫すれば、1セットで3グループ6班まで実験が可能である。また、先に述べたように、電気泳動後のゲルを染色しなくてもよいため、泳動後すぐに観察に移れることも大きな利点である。

(2) 必要な器具類と準備

高等学校で新たな実験実習を始めようとしても、「備品」に相当する価格のものを導入する必要があるとなかなかすぐには難しい。その点、本実習で必要な器具は(学校によって事情はさまざまであろうが)「需用費(消耗品費)」の中で何とかかなり、また、ほかの実習にも転用していけるものが多く、手始めに行うのにも向いていると感じる。

① 電気泳動装置

本校では「水平型電気泳動装置 8-PitSub」を使用している。装置1台にゲル2枚分のゲルメーカーがついているので、いくつかのクラスで実

施するときに、一度にゲルを作製しておくことができる。

作製したゲルはトレーに乗せたままゲルメーカーから取り出し、市販の食品用シール容器に入れた電気泳動用バッファに浸して冷蔵庫で保存できる。トレーセット時(図5)に泳動装置の+極・-極どちら側にウェルをもってくるのか、といったことを確認しながら操作を進めることで、電気泳動のしくみについて理解を深めていくことができる。



図5 ゲルトレーを泳動装置にセット

1枚のゲルに12ウェルのコームでウェルをつくっておくと、くぼみが比較的大きく、生徒は試料を入れやすい。本実習では1グループ2班で6レーンを使用するので、1台で2グループ4班分の試料を一度に泳動できる。

② マイクロピペット

Feel so Bio シリーズのほかのキットでは1 μLを取ることが求められるものがあるが、この「PCRキット」は2～20 μL用のマイクロピペットが各班1本あれば十分対応できる。

③ 紫外線ランプ

ハンディ型紫外線ランプ UVGL-15を使用した。短波長(254 nm)を使うので、波長切り替え式でなくても、もう少し出力が大きいほうが見やすいかもしれない。本校教諭手製の、段ボール箱にランプをはめこみ、黄色いセロファンを貼りつけたのぞき窓をつけた簡易暗箱(図6)を使って観察している。

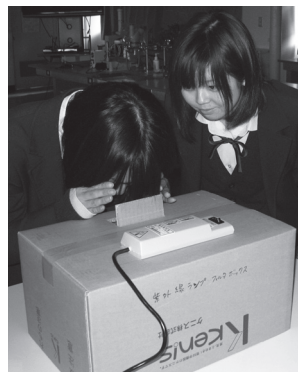


図6 簡易暗箱

④ 恒温水槽・電気ポット

58°C、72°Cの設定にはヤマト科学(株)のウォーターバス BM100 など、恒温水槽を使用

し、95°Cには電気ポットを使用した。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°C保温にしても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ふたをしておく必要があった。機種によっては水面近くが90°C程度にしか上がらないものもあったので、事前に確認してポットを選ぶ必要がある。

⑤ アイスクラッシャー

数年前、本校でDNAを扱う実習を始めようとしたとき、実は「氷問題」はなかなかの難題であった。年間何度も使うのではないから、と、余分な出費を惜しみつつ氷そのものを近隣のコンビニで購入したりしていた。そのような中で導入した「初雪 業務用アイスクラッシャー HA-1700」は冷凍庫のキューブアイスを軽い力で簡単にクラッシュアイスにでき、重宝している。1班に500 mL ビーカーに軽く1杯、家庭用製氷皿1、2枚分の氷で十分である。

⑥ そのほかの消耗品

- ・手袋は電気泳動槽にゲルを出し入れする生徒だけに着用させている。
- ・マイクロチューブはキットについているもので間に合うが、カラーチューブがあれば指示しやすく、生徒もチューブの色とラベルで内容物を確認しながら操作するので、間違いを減らす効果がある。

6. テクニカルトレーニング

この分野では、実習に先立ち、事前学習のときに次のような技術的な練習を行っている。

① マイクロピペットの使い方

方形に切ったパラフィルムを用意し、その上にマイクロピペットで12 μLの水を取る。その水滴から、4 μLを2回取り、同じ大きさの3つの水滴にする。再び水滴を1つに集め、3 μLを3回取り、同じ大きさの4つの水滴にする。

この方法では、単にピペットの操作を覚えるだけでなく、3 μL、4 μLといった小さい量の液体のしずくを目の当たりにすることで、量的な感覚

や、ピペットのチップに溶液がどれくらい入るのか、それを混ぜるためにはどのような配慮や操作が必要か、ということをつかむことができる。

そのあと、チューブの中でわずかな量の液体をピペッティングにより混合する練習もしておく。

② ゲルへのアプライ

電気泳動用ゲルのウェルに試料を注入する操作は、普通の寒天を固めた練習用ゲルをシール容器の水に浸して練習する。試料の代用として、水で薄めたグリセリンをメチレンブルーで青くした溶液をマイクロチューブに入れて配布する。

7. おわりに

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トで入れて反応させ、産物を電気泳動にかけるといふ操作になり、操作をする生徒たちがきちんと意識をもっていないと、何をやっているのかわけがわからなくなってしまう、実感をもちにくい、といった不安も生じる。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ない。

この実習は、実験前の手洗いから始まり、繊細なピペット操作に緊張し、その後は計時係、サイクルカウント係、などと分担し、楽しく実験に取り組める。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あげていた。PCRの過程を実感をも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ある。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る。

注1. 注2 兵庫県立須磨東高等学校における理科実験実習の取り組みを本校ホームページで公開している。数研出版の教科書「生物」p.196～199に掲載の探究活動「鳥類の発生の観察」についても詳しい実践報告をしているので、ご参照いただきたい。