



Biotechnology Explorer™
実習用テキスト

Gene in a Bottle キット

カタログ番号

166-2300JEDU

166-2000JEDU

<http://explorer.bio-rad.com>



自分の“素”を入手しよう

DNA については、クローニング、ゲノム配列決定、フィンガープリント、マッピングまたは遺伝子工学など、メディアや授業のなかでも毎日話題にのぼるようになってきました。生徒や学生達に、自分自身の本質である DNA を用いて、生物学の分子的枠組みを理解させるきっかけを作ってみませんか？生徒達は自分の DNA を取り出し、保存し、小さなボトルに詰めることができます。

研究者は、主として脂質、タンパク質、炭水化物および塩類からなる細胞から、どのようにして純粋な DNA を取り出しているのでしょうか。まず、界面活性剤で細胞膜を破壊し、溶液中に DNA を放出させます。次に、タンパク質およびその他の有機分子を分解・分離すると、DNA が無傷のまま残ります。最終的に、希望通りの操作ができるような形で、DNA を析出させ、採取します。

実際にはさまざまな実験に利用する為に、様々な生物から DNA を抽出しますが、その基本的手法をこのキットを使用した授業では学習し、実用的な知識を得ることになります。学生は自分の頬の細胞から得られたゲノム DNA を、ネックレスモジュール (166-2200JEDU) を用いてガラス製の小さなボトルにいれ、ペンダントにすることも可能です。

このキットは、幅広い学年の生徒や学生対象の授業等に使用することができます。(米国では小学校高学年でも利用することがあるそうです) センラルドグマを含めた DNA や遺伝子に関する最低限の予備知識を必要とします。また、通常の生物学またはライフサイエンスの授業で、細胞、細胞構造、有糸分裂および減数分裂、遺伝学、DNA 技術などのいずれかの講義を行った時点で実施してみたいかでしょうか？

生物学の分子的枠組みについて初めて学習する学生にとって、DNA は抽象的で漠然としたものでしょう。この手法により、目に見えないものが、目に見えるものとなり、自分の DNA が現実的なものであることが実感するかもしれません。DNA の実例や、その他の実習は、学生は DNA の機能を遺伝的写真として理解したり、これまで目に見えなかった生命の実態を理解したりするのに役立つものです。

このキットは、あらゆるレベルの教育に対して DNA について学習する機会を提供するものです。このキットを使用した実験は、できるだけ一般の実験室に適するようデザインされており、特別な装置等を必要としません。その後、DNA 構造やその機能、細胞構造、酵素の機能などについての授業と組み合わせて、今回の実習をより効果的にすることもできます。中学校の生徒では、この実習は、DNA や遺伝子の科学に興味を持たせる教材にもなるでしょう。

この Biotechnology Explorer のカリキュラムはとてもユニークで、理科の先生方に非常に驚かれ、また興味を持って頂いています。バイオ・ラッドではこれからもカリキュラムや製品の改良をすすめていきます。皆様のお声はその意味でも大変重要です。ぜひご意見をお聞かせください。

目次

教師用テキスト	1
キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧	2
より効果的にキットをご使用いただくために	4
①なぜ DNA の抽出を教えなければならないのでしょうか？	4
②対象	4
③カリキュラムへの導入	4
④学生の側での望ましいバックグラウンド	5
⑤時間割例	5
⑥安全に実験を行う為に	5
⑦成功するためのポイント	5
⑧試薬の分注	5
⑨DNA ネックレスを作成する場合のポイント	5
バックグラウンド(基本編)	6
<DNA とは何でしょうか？そしてそれは何をしているのでしょうか？>	6
<DNA はどこにあるのでしょうか？>	6
<DNA はどのような形をしているのでしょうか？>	7
<DNA はどのようにすれば目に見えるようになるのですか？>	7
バックグラウンド(発展編)	8
<DNA 技術の応用>	8
<クローニング>	8
<遺伝子導入：遺伝子組換え体>	8
<DNA プロファイリング>	8
<DNA の抽出および析出：どのようにして行うのでしょうか？>	8
実験開始前の準備	10
<試薬の計量>	10
<実験準備>	10
<実験直前に準備すべき試薬・器具のチェックリスト>	11
クイックガイド	12
学生・生徒用テキスト：基本編	14
はじめに	15
<DNA とは何でしょうか、そしてそれは何をしているのでしょうか？>	15
<DNA はどこにあるのでしょうか？>	15
<DNA はどのような形をしているのでしょうか？>	16
<DNA はどのようにすれば目に見えるようになるのですか？>	16
<析出した DNA はどのように見えるのでしょうか？>	18
実験 - 自分のゲノム DNA を抽出してみよう！	19
<実験準備>	19
<試薬の計量>	19
<操作>	20

学生・生徒用テキスト:発展編.....	23
はじめに.....	24
<DNA の構造>	24
<ゲノム、染色体、遺伝子、DNA、RNA およびタンパク質…… どのような関係があるのでしょうか？>.....	25
<DNA はどのようにして細胞から単離できるのでしょうか？>	27
実験 - 自分のゲノム DNA を抽出してみよう！	32
<実験準備>	32
<試薬の計量>.....	32
<操作>	33
付録 A オプション実験.....	36
付録 B 質問に対する回答.....	37
(基本編).....	37
(発展編).....	38
付録 C ヒトゲノムを取扱う実験について	41

教師用テキスト

教師用テキスト.....	1
キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧	2
より効果的にキットをご使用いただくために.....	4
①なぜ DNA の抽出を教えなければならないのでしょうか？.....	4
②対象.....	4
③カリキュラムへの導入.....	4
④学生の側での望ましいバックグラウンド	5
⑤時間割例	5
⑥安全に実験を行う為に.....	5
⑦成功するためのポイント.....	5
⑧試薬の分注	5
⑨DNA ネックレスを作成する場合のポイント.....	5
バックグラウンド(基本編).....	6
<DNA とは何でしょうか？そしてそれは何をしているのでしょうか？>	6
<DNA はどこにあるのでしょうか？>.....	6
<DNA はどのような形をしているのでしょうか？>	7
<DNA はどのようにすれば目に見えるようになるのですか？>	7
バックグラウンド(発展編).....	8
<DNA 技術の応用>	8
<クローニング>	8
<遺伝子導入：遺伝子組換え体>	8
<DNA プロファイリング>	8
<DNA の抽出および析出：どのようにして行うのでしょうか？>	8
実験開始前の準備.....	10
<試薬の計量>.....	10
<実験準備>	10
<実験直前に準備すべき試薬・器具のチェックリスト>	11
クイックガイド	12

キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧

このキットの構成物と、キット以外に必要な試薬・器具等の一覧表です。1キット=9班×4人分の実験に必要な数になっています。準備の時の確認リストとしてお使いください。

*DNA 抽出モジュール及びネックレスモジュールはそれぞれ別々に購入可能です。

DNA 抽出モジュール(カタログ番号 166-2000JEDU)	量
セルライシスバッファー	110ml
塩入りプロテアーゼ、粉末	1.5g
15ml コニカルチューブ	50
多色のマイクロチューブ(カラー)	60
ディスプレイザブルピペット	60

ネックレスモジュール*1(カタログ番号 166-2250JEDU)	量
Helix ネックレス	36
スクリーキャップ	36
紐	36

*1 2013年よりネックレスモジュールが変更になりました。1箱で36個のペンダントが作製できます。166-2300JEDUの構成はDNA抽出モジュール1箱、ネックレスモジュール1箱になります。

用意する必要のある器具等(本キットに含まれていないもの)	量
精製水(飲料用の水でも可)	約 200ml
91%イソプロパノールまたは 95%エタノール	約 360ml
50℃に設定できる恒温槽*2	1
油性ペン	1-9
使用済みピペット等廃棄用容器	9
15mlコニカルチューブ用ラックまたはビーカー (恒温槽でインキュベーションする時にチューブを立てるために使用)	-
マイクロチューブラック(15mlコニカルチューブも立てられるもの)	1-9
オプション 紙コップ*3	36

*2 温度制御式の恒温槽が入手できない場合には、コニカルチューブを入れることができる大きさの断熱性容器(発泡スチロールが最適です)に 50℃に加温した水を入れて利用してください。

*3 コニカルチューブから精製水を直に口に含む代わりに、紙コップを使用する方法もあります。口をすすいだ後の溶液を紙コップに移して、その後コニカルチューブに戻します。唾液の量が多すぎたりして、コニカルチューブに戻す液量が非常に多くなってしまうことが防げます。

より効果的にキットをご使用いただくために

①なぜ DNA の抽出を教えなければならないのでしょうか？

1) DNA の抽出により、学生は自分自身の遺伝子本体を目にする機会を得ることができます。

自分自身を独特な存在としているまさにその実態を目の当たりにすることで、大きな喜びが得られることと思います。析出した DNA を封入して、小さなボトルに入れておけば、貴重な宝物、思い出の品になることでしょう。(ただし、高濃度のアルコール溶液をボトルに詰めますので、数ヶ月経つと蒸発してしまいます)

2) DNA の抽出により、学生は DNA の性質が理解できるようになります。

染色体を構成する DNA 分子は、きわめて長く、細いものです。学生に、これほど長い分子がどのようにして微細な頬の細胞の中に収納されているのかを尋ねてみてください。DNA が析出して現れたこの細くて白い繊維は、数千本もの DNA 分子が糸束中の繊維と同様互いにより合わさったものです。

3) DNA の抽出は DNA 技術の最初のステップです。

DNA の抽出は、多数のバイオテクノロジー技術の中でも日常的なステップです。遺伝子クローニング、遺伝子マッピング、DNA 配列決定、DNA フィンガープリント法などはいずれも、細胞または組織からの DNA の抽出と分離を必要とします。今回の実習で学生は、最先端の研究で利用する際に DNA がどれほど容易に分離できるのかについての認識を得られます。

DNA は生命をつかさどる情報です。

特にゲノム DNA は個人情報としての性質も有しています。生命倫理や個人情報についても説明し、取扱いには充分留意してください。(付録 C 参照)

②対象

このキットを使った実験は、授業の行い方によっては小学校高学年から大学生までの学生に対して DNA について教える際の導入や、興味深い DNA についての講義を迅速、簡便、印象的かつ実用的に行うのに適しています。すでにブロッコリーやレバーから DNA を抽出したことのある学生でも、自分自身の DNA を抽出することでさらに興味と関心を示すようになるかもしれません。

この指導用マニュアルには、基本編(小学校高学年～中学校、高等学校・理科)と発展編(高等学校・生物～大学)の両方が含まれています。学生や生徒のレベルに合わせて、または先生方の授業の目的に合わせて、実験またはバックグラウンドの資料を選択することができます。

③カリキュラムへの導入

このキットを使用した授業は、通常の生物学を始めとした理科や科学、あるいはその他の教科において動機付けという意味でも、年間授業の中のいずれかの時点で実施することが可能ですが、以下の授業が行われる際にお使いいただくと良いでしょう。

- 遺伝子、DNA
- 細胞構造
- 遺伝学
- 生体高分子
- 有糸分裂および減数分裂
- DNA 技術

④学生の側での望ましいバックグラウンド

高校生であれば、実験を開始する前に DNA の構造および機能についての簡単な知識を有しているかもしれません。中学校またはカリキュラムの関係で DNA の構造および機能について授業を受けてない生徒や学生に関しては、事前にこれらの講義をしておいたほうが、より効果的な授業が行えるでしょう。

⑤時間割例

このキットを使用した実験は 50 分の授業時間内に実施できるものですが、その授業において、先生方が何を生徒や学生に教えたいかによって複数回にすることも可能です。

Lesson 1 導入およびバックグラウンドに関する講義

Lesson 2 DNA 抽出実験

Lesson 3 DNA ペンダントの作製(オプション)

⑥安全に実験を行う為に

特に危険な試薬を用いたりすることはありませんが、実験の基本として、実験室では、飲食・喫煙および化粧直しをしないように、しっかり指導してください。白衣を着用し、実験の前後には、学生に石鹼で手を洗わせるようにしてください。

また、ヒトの体液を用いる実験では、海外では感染症拡大防止策をとっている国もあるそうです。実験実施の状況によっては日本でも配慮を必要とする場面もあるかもしれません。必ず自分自身のサンプルのみを用いる、他人のサンプルには触れないようにする、唾液などのついたチューブ等はブリーチ剤の入った容器に捨てる、などの対応も工夫をしてください。

⑦成功するためのポイント

成功するためには十分な量の細胞を採取することが重要です。口をすすぐ前、細胞がよりたくさん取れるように頬の裏側を噛みますが、出血するほど力強く噛む必要はありませんので、生徒には注意させてください。

⑧試薬の分注

このキットは、特別な器具や装置を必要とせず、教室内で最低限の実験器具と、科学的手法についての最低限の知識とを利用して行うことを目的として開発されました。マイクロピペットは必要ではありませんが、溶液を量り採る等の時にはマイクロピペットを使用することもできます。実習の目的や参加者のレベルによって使い分けてください。

⑨DNA ネックレスを作成する場合のポイント

ネックレスモジュールを使用する場合、析出した DNA をディスポーザブルピペット(スポイト)を用いてガラスの小瓶に入れますが、溶液をガラスの小瓶に移すのが難しいことがあります。

このような場合は、ディスポーザブルピペット(スポイト)の先端をハサミなどで斜めに切ると溶液が入れやすくなります。

バックグラウンド(基本編)

<DNA とは何でしょうか？そしてそれは何をしているのでしょうか？>

デオキシリボ核酸(Deoxyribo nucleic acid, DNA)とは、微生物、昆虫や植物、動物など、あらゆる生物の細胞内に存在する分子です。DNA は、親から子へと伝えられる情報すなわち遺伝情報を運搬しています。DNA は、髪の毛の色、目の色、皮膚の色、身長、容貌、血液型など、個体の数え切れないほどのあらゆる特徴を決定するものであるため(もちろん、それを決定する全てが DNA ではなく、生活環境等の要因も大きく影響されますが)、生物学的「青写真」と呼ばれることもあります。私達の DNA 青写真は、受胎の際に母親の DNA(卵から)と父親の DNA(精子から)が組み合わさったものです。

DNA は 4 種類の化学的単位が含まれており、これらは、A(アデニン)、G(グアニン)、T(チミン)および C(シトシン)というように、その名称の最初の文字で表されます。遺伝情報のコードはこれらの 4 種類の文字から作られています。DNA コードの文字は、私たちのアルファベットの文字のような働きをします。英語では 26 文字のアルファベットで単語をつづり、これが無限に組み合わさって言葉となり、情報を伝えます。同様に、DNA の 4 つの化学的文字は、細胞が理解できるような言葉に組み立てられ、それが並んで情報となりますが、この情報を遺伝子と呼びます。これらの遺伝子には、身体および細胞のほぼすべての構造および機能の元となるタンパク質を作り上げるための情報が含まれています。

あなたの DNA 配列は、完全な DNA 集積物、すなわちゲノムの中でこれらの化学的文字が特定の順番で並んだものです。すでに、ヒト DNA 配列は 99.9%が同一であることが決定されています。個人個人をそれぞれ独特のものとしている配列の変動は、0.1%未満なのです。

<DNA はどこにあるのでしょうか？>

ごく少数の例外を除き、DNA は生体内のほぼすべての細胞内で認められます。ヒトの細胞では、核とよばれる細胞内の一部分に DNA が含まれています。細胞が分裂するたびに(増殖、修復または生殖など)、細胞の核内の DNA が複製され、しっかりと巻き合わさって染色体となるのです。ヒトの遺伝的青写真は 23 対、46 本の染色体からできており、ここには約 25,000 個*の遺伝子が含まれていて、これからヒトの身体を構成するための指示が出されているのです。

*ヒトの遺伝子の数は近年見直されており、遺伝子の定義によっても諸説あります。

<DNA はどのような形をしているのでしょうか？>

分子レベルでは、DNA は“ねじれた梯子”または“らせん階段”のような形をしています。この梯子は実際には2本のDNAで構成されており、A、G、T、Cという4つの分子側鎖が対になって横木を形成しています。この構造は、2本のDNA鎖により構成された渦巻状またはらせん状の構造から、DNA二重らせん構造と呼ばれています。DNAの各々の鎖はきわめて長く細いもので、しっかりと巻き合わさって、細胞の核内に収納されています。ヒトの細胞から得られた46本の染色体すべてを解きほぐし、端から端まで伸ばすと、DNAの長さは2メートルになりますが、その幅はわずか2ナノメートル(1メートルの10億分の2)にすぎません。

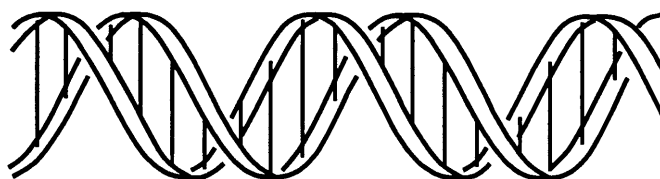


図1. DNA(デオキシリボ核酸)の図 DNAは、遺伝情報の蓄えられた長い鎖状の分子です。

<DNA はどのようにすれば目に見えるようになるのですか？>

細胞を採取し、破壊して開き、核内にあるDNAを放出させます。採取したすべての細胞からのDNAを一緒にして凝集させることで、DNAが目に見えるようになります。長く細いDNA分子は、細くて白い糸とイメージしてください。この糸は、部屋中に伸ばした場合には見えにくくなりますが、一緒にして床の上に丸めておけば見えるようになります。

今回の実習では、界面活性剤(細胞などの膜を壊します)と酵素(不要なタンパク質を壊します)を用いて学生の頬から採取した細胞を破壊し、その中のDNAを放出させます。次に、塩類および冷却したアルコールにより(DNAが溶け難くなります)DNAを溶液から出現、すなわち析出させ、白い塊として目に見えるようにします。

また、溶液を混合する際、丁寧に、ゆっくりとコニカルチューブを上下させる事が重要です。ゆっくりと混合を行わないと、DNAの“糸”が短く切れてしまい、析出させても塊にならなくなってしまいます。

バックグラウンド(発展編)

<DNA 技術の応用>

このキットを使用した実験は、DNA の構造および機能について考察する授業と関連付けることができ、学生に自分の DNA を用いて簡単で実用的な経験をさせることができます。DNA の抽出が以下のような多数のバイオテクノロジー技術の応用の最初のステップであることを学生に理解させるようにすれば、さらに有意義なものとなります。

<クローニング>

クローニングとは、DNA 断片またはゲノムのコピーを多数作成することを意味します。疾患などを引き起こす不完全な遺伝子をクローニングすれば、治療法を見つけるという目標に向かって、その配列を決定し、解析することができるようになります。希望のタンパク質または形質をコードする遺伝子をクローニングして、別の生物に導入することもできます(以下の遺伝子導入の項を参考にしてください)。

<遺伝子導入: 遺伝子組換え体>

ヒトの血液凝固タンパク質など、有用なタンパク質を大量に産生するために、目的とするタンパク質をコードした遺伝子を単離し、速やかに、かつ大量に増殖させることのできる細胞内に移します。これらの細胞「工場」となりえるものは、細菌、酵母、などの微生物や植物または動物細胞などです。

現在、他の生物に由来する遺伝子を含む農産物があります。それが GMO (Genetically Modified Organism) 作物です。例えば、ある種のトウモロコシは、イモムシだけに効く殺虫作用タンパク質(イモムシの腸で作用して栄養素を吸収できなくしてしまう)をコードした、微生物由来遺伝子を含んでいます。ある種の米は、 β -カロチンを作るスイセン由来の遺伝子を含んでいます。 β -カロチン不足が問題となっている開発途上国において、このお米を食べることで β -カロチン不足解消の一つの手段になると考えられています。

<DNA プロファイリング>

ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction、PCR)という技術を用いれば、たくさん欲しい DNA 部分だけを増やすことができます。例えば、個人個人で DNA 配列の異なる染色体の特定の領域を増殖させます。電気泳動を用いて、増やした DNA について調べると、個人間の相違をバーコードに似たバンドパターンとして示すことができます。この手法は、犯罪捜査や親子鑑定、さらに、生物の進化による類縁関係を決定するために利用することができます。

<DNA の抽出および析出: どのようにして行うのでしょうか? >

このキットを使用した実験では、口内を精製水ですすぐことで細胞を採取し、セルライシスバッファーを加えることから開始します。セルライシスバッファーには、リン脂質とタンパク質からなる細胞膜および核膜を破壊して DNA を放出させるための界面活性剤が含まれています。さらに、DNA を安定化させるために溶液の pH を維持することを目的とした緩衝剤(バッファー)が含まれています。

この段階で、溶液には DNA ならびに、脂質、糖類およびタンパク質などのその他の細胞成分が溶けて

います。

次にプロテアーゼと塩を加えます。タンパク質を分解する酵素であるプロテアーゼはDNAに結合したタンパク質を除去したり、DNAを分解する酵素を壊したりします。これにより、抽出される無傷なDNAの量が最大限になります。プロテアーゼを加えた細胞抽出物は、プロテアーゼ活性の至適温度である 50℃でインキュベートします。

DNA は、DNA 骨格上のリン酸基によりマイナスチャージ(負電荷)を持ち、こうした電荷により可溶性となっています。サンプルに塩類を加えると、プラスチャージ(正電荷)を持つ塩中のナトリウムイオンがDNAの負電荷に引き寄せられ、DNAの電荷を中和します。

これにより、DNA分子は互いに反発し合わずに、凝集できるようになります。

DNAは高塩濃度ではアルコールに不溶であるため、冷アルコールを加えるとDNAが析出します。DNAは析出すると、アルコール層の境界面に白い繊維状物質として目に見えるようになってきますが、その他の細胞成分は溶液中に溶けたままになります。

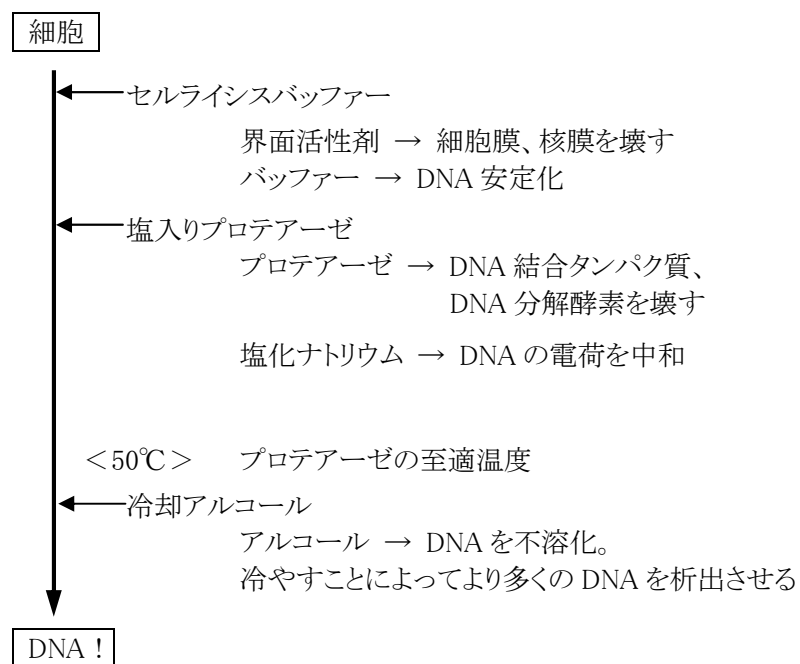
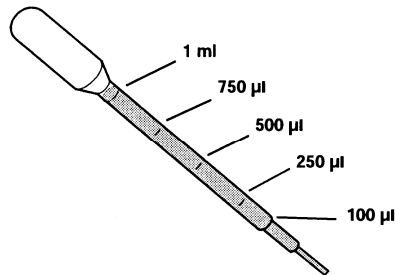


図2. 細胞からDNAを抽出する時の手順、使用する試薬とその作用

実験開始前の準備

＜試薬の計量＞

このキットには目盛り付きのディスプレイブルピペットが入っており、試薬の計量ではいずれもこれを使用します。下図に、計量することになる容量に対応するピペットの印の位置は下記の通りです。マイクロピペットを用いても構いません。



＜実験準備＞

1. アルコール(イソプロパノールまたはエタノール)を冷やしておく。

実習を開始する最低 1 時間前に、アルコール(91% イソプロパノールまたは 95% エタノール)をフリーザーに入れて、十分に冷やしておきます。

2. 塩入りプロテアーゼ溶液の調製、分注

*実験を数回に分けて使用する場合、溶解した状態で冷蔵保存すれば1週間程度は使用できますが、可能な限りその都度 100mg/mlになるように必要量を溶解させて使用してください。開封後の粉末は密閉して保管してください。

2-1. 15ml コニカルチューブ 1 本に「プロテアーゼ」、班数分のピンクマイクロチューブに「P」とそれぞれ記号をつけます。

2-2. プロテアーゼと塩の粉末を「プロテアーゼ」と記した 15ml コニカルチューブに入れます。

2-3. 「プロテアーゼ」チューブに精製水 15ml(チューブ目盛で構いません)を加え、ゆっくりとチューブを上下させて(振ってはいけません)粉末を溶解します。

2-4. 溶解したら、班数分の「P」マイクロチューブに 1.25mlずつ分注します。

**この溶液は以前のキットのプロテアーゼ溶液と塩化ナトリウム溶液とを合わせたものですので、分注作業は一度で済みます。

3. 精製水の分注

生徒の数だけ 15mlコニカルチューブを用意し、チューブ 1 本あたり 3mlの精製水を分注します。

4. ライシスバッファーの分注

班数分の 15ml コニカルチューブに「ライシスバッファー」と記し、ライシスバッファーを 10ml ずつ(チューブ目盛で構いません)分注します。

<実験直前に準備すべき試薬・器具のチェックリスト>

◆各生徒に準備する実験試薬・器具

実験を始める前に、実験を行う生徒や学生達のために、次のリストにあるものをすべて用意します。リストは1班あたりに必要なものです。このキットには最高、9班×4人=36人の生徒が実験できる分量が揃っています。あらかじめ1つの班の実験スペースに置いておくと良いでしょう。また、マイクロチューブには、間違いのないようにマーキングをしっかりとしておくことをお勧めします。

また、衛生面での配慮が必要な場合には、必ず自分自身のサンプルを扱うこと、使用済みのチューブやピペットなどを次亜塩素酸溶液(ブリーチ剤等)の入った容器に廃棄する等、対処をしてください。

◆共有で使用する実験試薬・器具

生徒達が共有して使用する試薬や器具を準備します。これらのものは、先生が使用する実験スペースに置くと良いでしょう。ウォーターバスやインキュベーターは前もって温度調節しておく必要があります。

共有実験台	必要数
50°Cの恒温槽	1
15mlコニカルチューブ用ラックまたはビーカー (恒温槽でインキュベーションする時にチューブを立てるために使用)	-
冷却した 91%イソプロパノールまたは 95%エタノール(水中)	実験班分

学生用実験台(4名/実験台)	必要数
3mlの精製水の入ったコニカルチューブ	4
1.25mlの塩入りプロテアーゼの入ったピンク色マイクロチューブ(「P」と表示)	1
10mlのセルライシスバッファーの入ったコニカルチューブ	1
マイクロチューブラック(コニカルチューブも立てられるもの)	1
ディスプレイザブルピペット	6
油性ペン	1
使用済みピペット等廃棄用容器	1
ネックレスモジュール または 透明なマイクロチューブ	4
オプション 紙コップ	4

*コニカルチューブの蓋は、しっかり密閉できるように固めになっています。蓋を開け閉めする際、溶液をこぼさないよう、充分ご注意ください。

クイックガイド

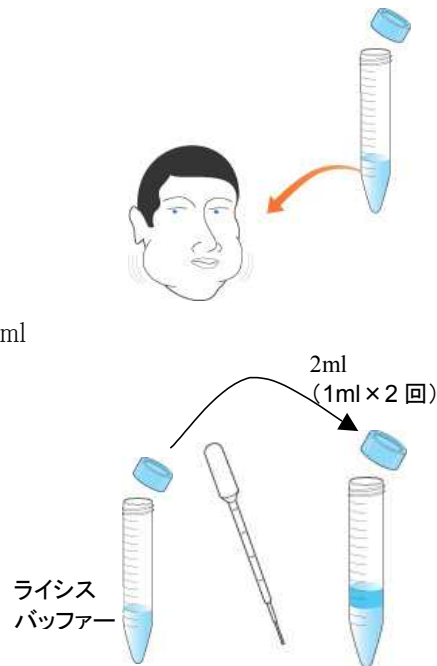
1. 実験台のマイクロチューブラックから、3ml の水の入った 15mlコニカルチューブを取り、油性ペンでチューブのフタと側面に自分の名前を記入してください。
2. 頬の内側を軽く、ほぐすように30秒間、噛みます。ストローを吸うようにすると噛み易くなります。

注意!この時、噛みすぎて出血しないように注意してください。

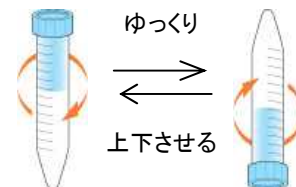
3. コニカルチューブの水を口に含み、激しくブクブクと口内をすすぎます。

4. 注意深くコニカルチューブ(または紙コップ)にすすいだ溶液を戻し、しっかり蓋をします。
紙コップに戻した場合は、紙コップから溶液を約 3ml コニカルチューブに移します。

5. ディスポーザブルピペットを用いて、ライシスバッファーを 2ml 加えます。



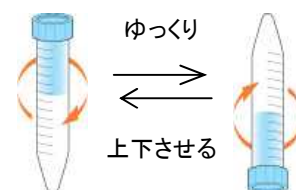
6. コニカルチューブの蓋がしっかり閉まっていることを確認したら、穏やかにチューブを5回ほど上下させます。ここで、絶対に振ってはいけません。
この時、チューブ内の溶液の様子をよく観察し、変化があれば記録しておきましょう。



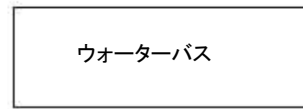
7. ディスポーザブルピペットで塩入りのプロテアーゼ溶液(「P」チューブ)を 250μl 取り、コニカルチューブに 5 滴加えます。



8. コニカルチューブの蓋がしっかり閉まっていることを確認したら、チューブを5回ほど穏やかに上下させます。ここで、絶対に振ってはいけません。
この時、チューブ内の溶液の様子をよく観察し、変化があれば記録しておきましょう。



9. 50°Cのウォーターバスで 10 分間インキュベート
 します。
 チューブの溶液部分が湯浴に充分浸っ
 ているか、確認しましょう。



50°C、10 分間

10. コニカルチューブを 45 度に傾け、
 よく冷やしたアルコール 10mlを穏やかに流れ込むように
 注意しながらゆっくりと加えます。

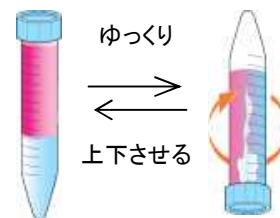


11. コニカルチューブをまっすぐに立て、そのまま
 静かに 5 分間放置します。
 この時、チューブ内の溶液の様子をよく観察し、
 変化があれば記録しておきましょう。



溶液と
 アルコールの
 界面に注目！

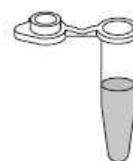
12. コニカルチューブを非常にゆっくりと 5 回
 上下させて、析出し始めた DNA が凝集しやす
 くなるようにします。



13. ディスポーザブルピペットを用いて、750 μ l~1ml のアルコールと共に析出した DNA を吸い取り、
 ネックレスモジュールの小さなネックレスに慎重に移すか、透明のマイクロチューブに自分の DNA を保
 管します。



or



学生・生徒用テキスト:基本編

Gene in a Bottle

自分の DNA を見てみよう！

学生・生徒用テキスト:基本編.....	14
はじめに.....	15
＜DNA とは何でしょうか、そしてそれは何をしているのでしょうか？＞	15
＜DNA はどこにあるのでしょうか？＞	15
＜DNA はどのような形をしているのでしょうか？＞	16
＜DNA はどのようにすれば目に見えるようになるのですか？＞	16
＜析出した DNA はどのように見えるのでしょうか？＞	18
実験 - 自分のゲノム DNA を抽出してみよう！	19
＜実験準備＞	19
＜試薬の計量＞	19
＜操作＞	20
学生・生徒用テキスト:発展編.....	23
はじめに.....	24
＜DNA の構造＞	24
＜ゲノム、染色体、遺伝子、DNA、RNA およびタンパク質…… どのような関係があるのでしょうか？＞	25
＜DNA はどのようにして細胞から単離できるのでしょうか？＞	27
実験 - 自分のゲノム DNA を抽出してみよう！	32
＜実験準備＞	32
＜試薬の計量＞	32
＜操作＞	33

自分の DNA を見てみよう！

はじめに

<DNA とは何でしょうか、そしてそれは何をしているのでしょうか？>

デオキシリボ核酸(Deoxyribo nucleic acid, DNA)とは、微生物、昆虫や植物、動物などのあらゆる生物に存在する分子です。DNA は、親から子へと伝えられる情報すなわち遺伝情報を運んでいます。DNA は、個人の髪の毛の色、目の色、皮膚の色、容貌、外観、身長、血液型や、一人一人を独特なものにしている、まさにありとあらゆる特徴を決定する因子を持っています(ただし、それを決定する全てが DNA ではなく、生活環境等の要因も大きく影響されることを忘れてはいけません)。しかし、DNA には、あなたの身体を他の人類と同様なものにするためのあらゆる情報も含まれているのです。言い換えれば、DNA はあらゆる肉体的成長および発達のための青写真のようなものです。あなたの DNA 青写真は、母親の DNA と父親の DNA が半分ずつ組み合わさったもので、そのためにそれぞれの両親からある種の特徴を受け継いでいるのです。

DNA は 4 種類の化学的単位が含まれており、これらは、**A(アデニン)**、**G(グアニン)**、**T(チミン)** および **C(シトシン)** というように、その名称の最初の文字であらわされます。遺伝情報のコードはこれらの 4 種類の DNA の「文字」から作られています。DNA コードの文字は、私たちのアルファベット文字に似ています。英語では 26 文字のアルファベットで単語をつづり、これが無限に組み合わせられて言葉となり情報を伝えます。同様に、DNA の 4 つの化学的文字は、細胞が理解できるような言葉に組み立てられ、それが並んで情報となりますが、この情報を**遺伝子**と呼びます。これらの遺伝子には、身体のおぼすすべての構造および機能を司るタンパク質を作り上げるための情報が含まれています。DNA にはタンパク質を作り上げるために必要な情報がすべて含まれている、設計図のようなものです。

あなたの DNA 配列は、完全な DNA の集まり、すなわち**ゲノム**の中で、これらの化学的文字が特定の順番で並んだものです。すでに、ヒト DNA 配列は 99.9%が同じものであることがわかってきます。個人個人をそれぞれ独特のものとしている配列の変動は、0.1%未満なのです。言い換えれば、あなたと同級生とが違っているのは、あなたの遺伝子内で塩基配列が 0.1%未満で違っているからなのです。

<DNA はどこにあるのでしょうか？>

生体の基本的な単位は**細胞**です。細胞は組織や臓器(筋肉や脳、消化器、皮膚、腺など)を作り上げています。細胞はタンパク質と脂質(脂肪)からできた**膜**を持つ区画で、この膜によって細胞は互いに仕切られています。細胞の中にはさらに、特別な機能を持つ区画があります。こうした区画の 1 つに**核**と呼ばれるものがあり、これは、細胞の司令室のようなもので、細胞機能の主要な指令となる DNA 分子を含んでいます。DNA はしっかりと巻き合わさって 23 対、46 個の構造物を構成しており、これは**染色体**と呼ばれます。細胞は、増殖、修復または生殖などで同一の 2 個の細胞に分裂するたびに、染色体をコピーし、新しい細胞がその生物の遺伝的**青写真**の完全なコピーを受け取るようになっています。

<DNA はどのような形をしているのでしょうか？>

分子レベルでは、DNA は“ねじれた梯子”または“らせん階段”のような形をしています。この梯子には実際に2本のDNAが含まれており、A、G、T、Cという4つの化学的字母が対になって横木を形成しています。この構造は、2本のDNA鎖により構成された渦巻状またはらせん状の構造から、DNA **二重らせん構造**と呼ばれています。DNAの各々の鎖はきわめて長く細いもので、しっかりと巻き合わさって、細胞の核内に収納されています。ヒトの細胞から得られた46本の染色体すべてを解きほぐし、端から端まで伸ばすと、DNAの長さは2メートルになりますが、その幅はたった2ナノメートル(1メートルの10億分の2)にすぎません。

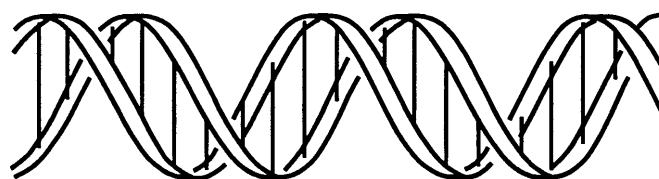


図1. DNA(デオキシリボ核酸)の図 DNAは、遺伝情報の蓄えられた長い鎖状の分子です。

<DNA はどのようにすれば目に見えるようになるのですか？>

実験では、次のような流れで自分のDNAを見えるようにします。

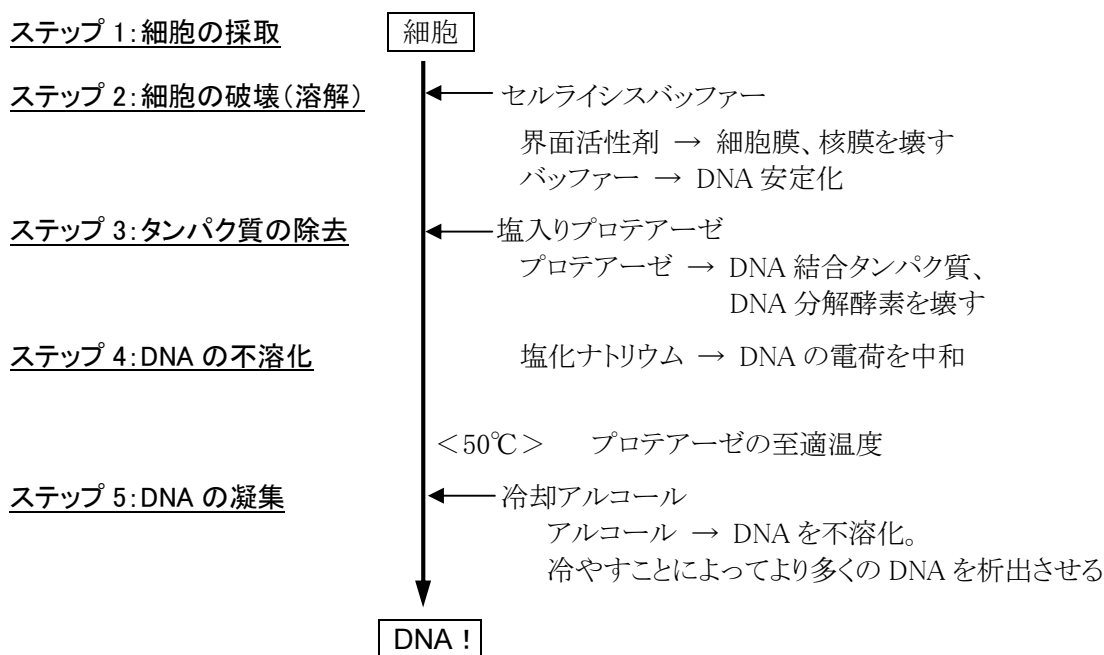


図2. 細胞からDNAを抽出する時の手順、使用する試薬とその作用

ステップ 1:細胞の採取

DNAを目に見えるようにするためには、細胞を採取し、それを破壊して開き、すべての細胞からのDNAを一緒にして集めます。精製水で口内をすすぐことで、数千～数万の細胞を採取することができます。口の中の細胞はきわめて頻繁に分裂しており、新しい細胞が常に古い細胞と入れ替わっているため、容易に剥がれてきます。実際、これらの細胞は、ものを噛んだり、食事をしたりするたびに剥がれ落ち、入れ替わっているのです。

質問：

頬から実際に細胞が採取されているかどうかは、どのようにすれば確認できますか？目でみて確認するためにはどのような実験器具や機械が必要になるでしょう？

ステップ 2:細胞の破壊(溶解)

細胞を採取したら、それをその細胞を破壊して開き、DNAを放出させる必要があります。細胞膜および核膜は脂質(脂肪)とタンパク質からできています。これを破るために、**界面活性剤**を用いて細胞膜を溶かします。これは皿洗い用の洗剤(界面活性剤)が油の付いたフライパンから脂肪やタンパク質を溶かすのと同じことです。

膜を溶かすと、DNAが放出します。細胞を破壊するこの手順を細胞の溶解と言い、界面活性剤の入った溶液をセルライシスバッファーと呼びます。

質問：

皿を洗うときに効率がよいのは、温水と冷水のどちらでしょうか？

界面活性剤が細胞を破壊しやすくするためには、温かい温度と冷たい温度のどちらで使用する方がいいと思いますか？

細胞を破壊すればDNAが見えるようになると思いますか？

どうしてそう思うのか、その理由も書いてください。

ステップ 3: タンパク質の除去

DNA はタンパク質の周りにしっかりとまきついて格納されています。縫い糸が巻き糸となっているように、これらのタンパク質は DNA をしっかりと巻きつけており、核の内部で DNA がもつれないようにしています。DNA を見えるようにするためには、こうしたタンパク質を取り除き、最初に DNA がほぐれて広がるようにしてから、他の細胞からの DNA とあわせて塊にします。タンパク質を分解するプロテアーゼと共に溶解した類の細胞を温めます。プロテアーゼは**酵素**(これもタンパク質なのです)の 1 つで、やや熱めのお湯の温度である 50℃で働きが一番強くなります。プロテアーゼは DNA に結合したタンパク質を分解し、さらに、残っている細胞膜や核膜のタンパク質を破壊するのに役立ちます。

質問：

プロテアーゼは体内ではどこにあると思いますか。

(ヒント:あなたが食べたタンパク質はどこで分解されますか?)

ステップ 4: DNA の不溶化

ステップ 5: DNA の凝集

DNA の繊維はきわめて細いため、溶液中に溶解した状態では見ることはできません。長く細い DNA は細くて白い糸をイメージしてください。糸を部屋中に伸ばした場合には見えにくくなりますが、この糸を一緒にまとめて、床の上に丸めておくと、見えやすくなります。今回の実習では、塩と冷たいアルコールを用いて DNA を溶液から取り出す、すなわち**析出**させます。塩と冷たいアルコールで、DNA が溶液中に溶けていられない状況を作り出すことができるため、DNA は凝集して固体の固まりとなり、目にみえるようになるのです。

質問：

アイスティーに砂糖を入れたら、砂糖は簡単に溶けるでしょうか？ 同じ量の砂糖を熱い紅茶に入れて溶かした場合はどうでしょう？

<析出した DNA はどのように見えるのでしょうか？>

塩または砂糖と同様、DNA は液体に溶けている状態では無色ですが、十分な量が析出したときには白く見えます。DNA は析出するにつれて、液体の中にきわめて細かい白い繊維のように見えます。この繊維は、極細の麺と同じようにややもろく、手荒に取り扱うと簡単に壊れてしまいます。析出した DNA の塊は、ゆっくりと丁寧に取り扱い、液体の中から取り出すことができます。

実験 - 自分のゲノム DNA を抽出してみよう！

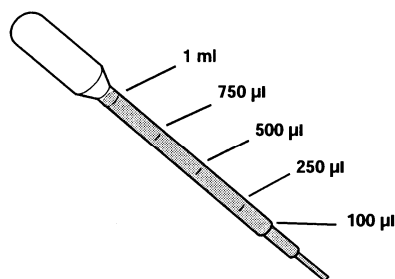
<実験準備>

共有実験台	必要数
50℃の恒温槽	1
15mlコニカルチューブ用ラックまたはビーカー (恒温槽でインキュベーションする時にチューブを立てるために使用)	-
冷却した 91%イソプロパノールまたは 95%エタノール(氷中)	実験班分

学生用実験台(4名/実験台)	必要数
3mlの精製水の入ったコニカルチューブ	4
1.25ml のプロテアーゼの入ったピンク色マイクロチューブ(「P」と表示)	1
10mlのライシスバッファーの入ったコニカルチューブ	1
マイクロチューブラック(コニカルチューブ等が立ててある)	1
スポイト	6
油性ペン	1
使用済みスポイト等 廃棄用容器	1
ネックレスモジュール または 透明のマイクロチューブ	4
オプション 紙コップ	4

<試薬の計量>

実験には目盛り付きのスポイト(ディスポーザブルピペットとも言います)を用いて、試薬を量り取ります。下図に、計量することになる容量に対応するピペットの印の位置は下記の通りです。



<操作>

ステップ 1・2:細胞の採取と破壊

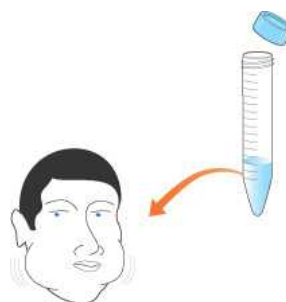
できる限りたくさんの細胞を採取するために、精製水で口内をすすぐ前に、頬の裏側をほぐすイメージで軽く噛みます。ストローを吸うように口をすぼめるとうまくかむことができます。出血するほど強く噛むことは決してしないでください。

1. 実験台のマイクロチューブラックから、3ml の水の入った 15mlコニカルチューブを取り、油性ペンでチューブのフタと側面に自分の名前を記入してください。

2. 頬の内側を軽く、ほぐすように30秒間、噛みます。ストローを吸うようにすると噛み易くなります。

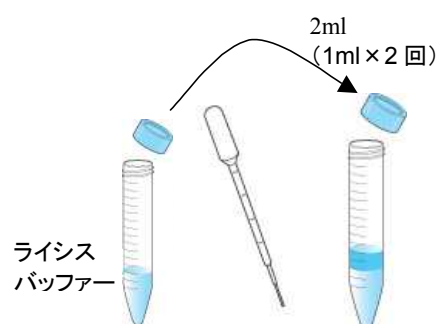
注意!この時、噛みすぎて出血しないように注意してください。

3. コニカルチューブの水を口に含み、激しくブクブクと口内をすすぎます。



4. 注意深くコニカルチューブ(または紙コップ)にすすいだ溶液を戻し、しっかり蓋をします。紙コップに戻した場合は、紙コップの溶液から約 3ml コニカルチューブに移します。

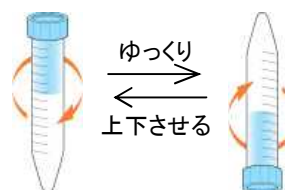
5. スポイトを用いて、ライシスバッファを 2ml 加えます。



6. コニカルチューブの蓋がしっかり閉まっていることを確認したら、穏やかにチューブを5回ほど上下させます。

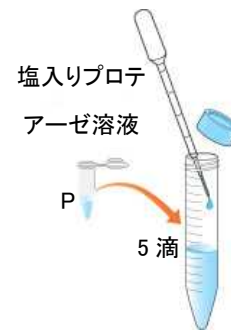
ここで、絶対に振ってはいけません。

この時、チューブ内の溶液の様子をよく観察し、変化があれば記録しておきましょう。



ステップ3：タンパク質の除去

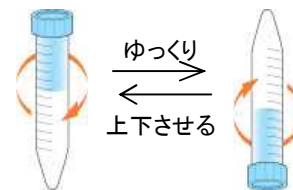
1. スポイトで塩入りのプロテアーゼ溶液（「P」チューブ）を 250 μ l 取り、コニカルチューブに 5 滴加えます。



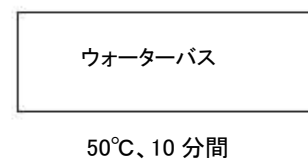
2. コニカルチューブの蓋がしっかり閉まっていることを確認したら、穏やかにチューブを5回ほど上下させます。

ここで、絶対に振ってはいけません。

この時、チューブ内の溶液の様子をよく観察し、変化があれば記録しておきましょう。



3. 50 $^{\circ}$ Cのウォーターバスで 10 分間インキュベートします
チューブの溶液部分が湯浴に充分浸っているか、確認しましょう。

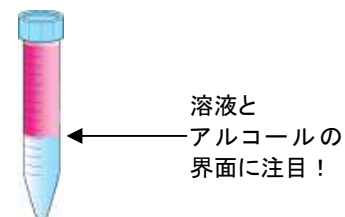


ステップ4・5：DNAの視覚化

1. コニカルチューブを45度に傾け、よく冷やしたアルコール10mlをスポイトで穏やかに流れ込むように注意しながらゆっくりと加えます。

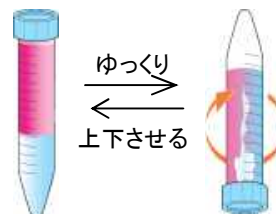


2. コニカルチューブをまっすぐに立て、そのまま静かに5分間放置します。
この時、チューブ内の溶液の様子をよく観察し、変化があれば記録しておきましょう。

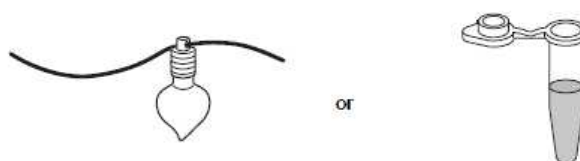


何か見えますか？観察結果を記録してください。
グループの他の人のコニカルチューブはどのような様子でしょう？

3. コニカルチューブを非常にゆっくりと5回上下させます。
糸のような白または透明な物質を観察しましょう。
これがあなたのDNAです。



4. [DNA ネックレスを作る場合] 先生からペンダントのパーツが配られます。スポイトを用いて、約 750 μ l ~1ml のアルコール溶液と共に、析出した DNA をネックレスに移します。グループの人たちと協力してもらい、ネックレスに封をし、ひもを通せば DNA ネックレスの完成です。
[マイクロチューブに保存する場合] 透明のマイクロチューブに 750 μ l~1ml のアルコール溶液と共に析出した DNA を慎重に移し、しっかり蓋を閉めます。



Gene in a Bottle

自分の DNA を見てみよう！

学生・生徒用テキスト: 発展編.....エラー! ブック
マークが定義されていません。

はじめに.....エラー! ブック
マークが定義されていません。

<DNA の構造>エラー! ブック
マークが定義されていません。

<ゲノム、染色体、遺伝子、DNA、RNA およびタンパク質…… どのような関係があるの
でしょうか?>エラー! ブック
マークが定義されていません。

<DNA はどのようにして細胞から単離できるのでしょうか?>エラー! ブック
マークが定義されていません。

実験 - 自分のゲノム DNA を抽出してみよう!エラー! ブック
マークが定義されていません。

<実験準備>エラー! ブック
マークが定義されていません。

<試薬の計量>エラー! ブック
マークが定義されていません。

<操作>エラー! ブック
マークが定義されていません。

頬の細胞からの DNA の抽出

はじめに

デオキシリボ核酸(Deoxyribo nucleic acid、DNA)とは、微生物や昆虫、植物や動物などのあらゆる生物のほぼすべての細胞に存在する分子です。DNA は遺伝情報を運搬しており、髪の毛の色、皮膚の色、目の色、容貌、外観、身長、血液型など、個人のあらゆる特徴を決定するものでもあります(ただし、それを決定する全てが DNA なのではなく、生活環境等の要因も大きく影響されることを忘れてはいけません)。さらに DNA は、ある生物種または全生物の全個体に共通するすべての機能を細胞が行うために必要な情報を運搬しているため、生物学的「青写真」と呼ばれることもあります。個人の青写真は、母親からの DNA(卵から)と父親からの DNA(精子から)が半分ずつ組み合わせられたものです。体内の細胞はすべて、こうした完全な遺伝情報を含んでいるのです。

DNA は、抽出した場合にはいずれも同一の外観をしています。自分自身の DNA を目の当たりにし、それが実際に自分自身を独特なものとして生かしているのだということを知ることは、興味深いことだと思いますか? 今回の実習では、頬細胞から自分の DNA—自分自身の「青写真」を保管している物質—を抽出します。研究者が日常で種々の生物から DNA を抽出する際に利用している、迅速かつ簡便な手法を用います。

DNA にコードされている情報の研究が進むにつれて、連日のように新しい発見が行われるようになっていきます。DNA を理解すれば、疾患を治癒させ、種々の遺伝疾患または症候群に悩まされている何百万人もの人々に希望が与えられる可能性が得られます。生物を原料として優れた製品が作られるようになり、さらに、長寿の鍵が得られるかも知れません。

<DNA の構造>

分子レベルでは、DNA は“ねじれた梯子”または“らせん階段”のような形態をしています。この長い梯子は両手部分に2つの長い分子が互いに並んでおり、塩基と呼ばれる化学的単位の対により、横木が形成されています。この構造は、2本の DNA 鎖により構成されたらせん状の構造をしていることから、DNA 二重らせん構造と呼ばれています。塩基はアデニン、グアニン、チミン、シトシン(それぞれ、A、G、T、Cと略されます)として知られ、コードとして文字のような機能を果たしています。各々の塩基は糖およびリン酸基と結合しており、この糖およびリン酸基が梯子様構造の「骨格」を形成しています。(ヌクレオチドは、塩基、糖およびリン酸からなる1つの単位です。)二本鎖 DNA では、常に A は T と、G は C と対を成すことがわかっています。これを相補的な結合、と言います。

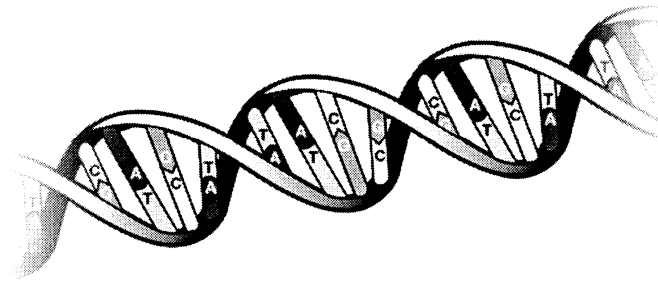


図 1. DNA(デオキシリボ核酸)の模式図 DNA は、遺伝情報を蓄えられた長い鎖状の分子です。

このDNAの4つの文字は、細胞が理解できるような言葉に組み立てられ、情報が伝えられますが、この情報を**遺伝子**と呼びます。これらの遺伝子には、身体のおぼすすべての構造および機能の元となる**タンパク質**を作り上げるための情報が含まれています。各々の細胞には、DNA文字による「テキスト」が含まれているのです。

DNA配列は、DNA分子に沿って塩基が特定の順番で並んだものです。ヒトのDNA配列は99.9%が互いに同一となっています。個人個人をそれぞれ独特のものとしているのは、0.1%未満の配列の変動にすぎないのです。言い換えれば、あなたと同級生とが違っているのは、あなたの遺伝子内で塩基配列が0.1%未満で違っているからなのです。

<ゲノム、染色体、遺伝子、DNA、RNA およびタンパク質…… どのような関係があるのでしょうか？>

DNAは、成熟赤血球などの例外を除き、ヒト体内のあらゆる細胞の核内で認められます。DNAは**染色体**と呼ばれる構造物を構成しており、この染色体は細く長いDNA鎖が**ヒストン**というタンパク質の周辺にしっかりと巻き付き、折りたたまれたものです。増殖、修復または生殖などで細胞が分裂するたびに、染色体は、体細胞分裂あるいは減数分裂と呼ばれる極めて高度に組み立てられた過程により複製されます。ヒトの細胞内で認められる23対、46本の染色体は、DNAにすべての情報を集積した46巻の百科事典にたとえられます。この百科事典を**ゲノム**といいます。

遺伝子とは、タンパク質を作り上げるための情報を含んだDNAの一部です。これは、タンパク質分子の組成および組み立て順序を指定した文書によるレシピのようなものです。ヒトゲノムには約25,000個*の遺伝子が含まれています。ゲノムは(膨大な量の)クッキングブックを集めたものに類似しています(全部集めると46「巻」になることを思い出してください)。1つの料理を作るためにクッキングブックのすべてのレシピを一度に用意するのではないのと同様、ゲノム内のすべての遺伝子があらゆる細胞によって利用されるわけではありません。細胞のタイプによる選択的な遺伝子の発現により、体内の異なるタイプの細胞でその特徴が生み出されるのです。基本的には、体内のすべての細胞が同一のクッキングブック(染色体)を有していますが、細胞ごとにこの本から読み出すレシピ(遺伝子)が異なるのです。(これを**発現調節**、と言います)皮膚では皮膚を作るためのレシピ、心臓では心臓を作るためのレシピが読み出されて、それぞれの器官ができています。

*ヒトの遺伝子の数は近年見直されており、遺伝子の定義によっても諸説あります。

遺伝子は、細胞によって作り出されるタンパク質を指定しますが、DNA はタンパク質合成の直接的なテンプレート(鋳型)となるわけではありません。タンパク質合成のテンプレートは、**メッセンジャーRNA (mRNA)**と呼ばれる RNA(リボ核酸)分子です。各々の mRNA 分子は 1 つの遺伝子から必要な部分だけをコピーしたものです。(コピーすることを**転写**と言います)mRNA は、核内の DNA から、細胞質内の**リボソーム**、タンパク質合成工場へと情報を伝達します。リボソームでは遺伝情報を解読し、適切なアミノ酸をつなぎ合わせて、遺伝子によりコードされたタンパク質を作り出します。(翻訳)ある細胞内で作り出されたタンパク質はいずれも、その細胞に特定の特質を与えるために機能しています。

質問：

•DNA、ゲノム、遺伝子の違いを自分よりも 2 つ年下の弟や妹に、簡単に、分かりやすく説明しようとしています。あなたならどのように説明しますか？

•肝臓の細胞は頬の細胞と同じゲノムを含んでいますか？

•胃の中に存在するタンパク質をコードしている遺伝子を単離したい場合、その遺伝子を頬の細胞の中から見つけることができますか？

また、その mRNA を見つけることができるでしょうか？その理由も説明してください。

<DNA はどのようにして細胞から単離できるのでしょうか？>

実験では、次のような流れで自分の DNA を見えるようにします。

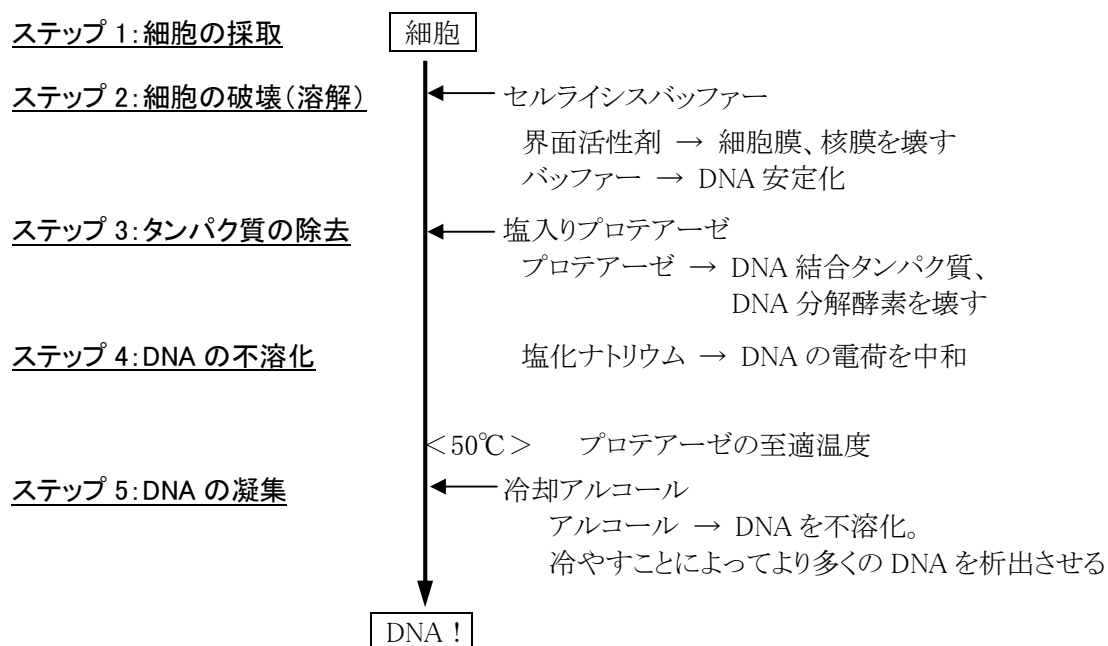


図 2. 細胞から DNA を抽出する時の手順、使用する試薬とその作用

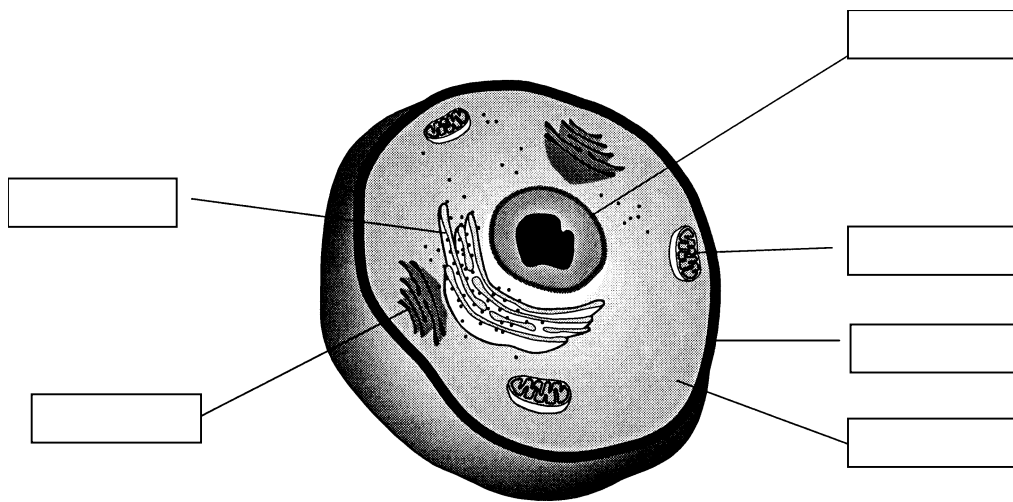
ステップ 1: 細胞の採取

DNA を単離するための最初のステップは、細胞の採取です。口の内側は良好な細胞採取場所です。これらの細胞はきわめて頻繁に分裂しており、絶えず剥がれ落ちているため、簡単に細胞を採ることができます。この実験では精製水で口内をすすぐことで、大量の細胞を採取することができ、そこから自分の DNA を単離することができます。

質問：

以下の図は頬の細胞の模式図です。

- 図の の中に、細胞小器官の各名称を記入しましょう。



- ゲノム DNA はこれらの細胞小器官のうちのどこにあると思いますか？

- ゲノム DNA から情報をコピーしてそれをタンパク質に翻訳できるようにするために mRNA のような中間体が必要なのはなぜですか？ (ヒント; ゲノム DNA のある場所とタンパク質が作られる場所は同じでしょうか?)

- 自分の細胞から DNA を単離するためには、まず始めに何をする必要がありますか？

ステップ 2: 細胞膜や核膜の溶解

DNA を抽出するための最初のステップは、細胞を破壊して膜を開き、DNA を取り出せるようにすることです。界面活性剤は脂質(脂肪)とタンパク質でできている細胞膜や核膜を溶解します。頬から細胞をかきとった後、界面活性剤を含む溶液に細胞を入れます。

質問：

- ・ 膜が溶解すると DNA が溶液中に放出されますが、細胞に含まれる、たくさんのその他の物質も放出されます。DNA 以外に細胞内にあると考えられる物質を列挙してください。

- ・ これらの不要な物質を分解するにはどのような物質が必要でしょうか？

ステップ 3: 細胞性タンパク質の分解のためのプロテアーゼの利用

すでに推測したように、純粋な DNA の析出を妨害すると予想される分子のうち、最も関係してくるものは、タンパク質です。タンパク質を分解する特殊な酵素を用いることにより、DNA には損傷を与えずにタンパク質を容易に分解・除去することができますが、こうした酵素はプロテアーゼと呼ばれます。プロテアーゼはタンパク質のアミノ酸間のペプチド結合を切断します。すべてのタンパク質を破壊すれば、DNA を分解する酵素(タンパク質の一種であることを思い出しましょう)も除去することにもなります。

質問：

- 細胞内ではどのようなタンパク質が DNA に結合していると思われますか？
(ヒント;染色体の構造、DNA の複製や転写などの時、どのようなタンパク質が作用するでしょう?)

- 今回の手順で使用するプロテアーゼは 50℃で作用が最大となります。この酵素はどのような環境で生育する生物に由来するものだと思いますか？

- ステーキのような硬い肉片を柔らかくするためにしばしばパパイイン(プロテアーゼの一種、パパイヤに含まれています)などを含む食肉軟化剤が利用されることがあります。ステーキの肉はタンパク質の豊富なウシの筋組織から作られていることを考えると、この食肉軟化剤がどのように作用していると思いますか？

ステップ 4: DNA の不溶化

サンプルに塩を加えると、溶液中の DNA の溶解度が低下します。DNA は、DNA 骨格上のリン酸基によりマイナスチャージ(負電荷)を有しています。塩を加えると、塩中のプラスチャージ(正電荷)を持つナトリウムイオンが DNA の負電荷に引き寄せられ、DNA の電荷を中和します。これにより、DNA 分子は互いに反発しあわなくなって、凝集するようになります。

ステップ 5: 冷アルコールによる DNA の析出

細胞抽出物中の他の分子から DNA を分離するために、サンプルに冷アルコールを加えます。DNA はアルコールでの溶解度が水に比べて低いため、冷アルコールを加えると DNA が析出します。エタノールの温度が低いほど、その中での DNA の溶解度が低下します。

これは紅茶での砂糖の溶解度に似ています。砂糖は、アイスティーよりも熱い紅茶のほうがよく溶けます。

高濃度の塩とアルコールが存在すると、細胞から放出された DNA が析出して凝集し、肉眼で見えるようになります。アミノ酸や炭水化物など、細胞抽出物中の他の分子は溶解したまま残り、肉眼では認められません。肉眼で見えるような大きな繊維を形成するためには、何千本もの DNA 鎖を要します。各々の DNA 鎖は数千個もの遺伝子を有しているため、肉眼では何百万個もの遺伝子を含む、繊維を一度に見ることになるのです。

ただし、何千個もの細胞から得られた DNA が合わさったものを見ているのだということを思い出すようにしてください。

質問:

・左にある目的を達成するために何をすれば良いのか、右から選んで線で結びましょう。

- | | | |
|-------------------|---|--------------------------|
| 細胞の採取 | ・ | ・ 界面活性剤溶液中で混和。 |
| 細胞膜の溶解 | ・ | ・ プロテアーゼを加え、50℃でインキュベート。 |
| DNA の析出 | ・ | ・ 精製水で口内をすすぐ |
| タンパク質の分解 | ・ | ・ 細胞抽出物の上に冷アルコールを流し込む。 |
| 水溶液中での DNA 溶解度の低下 | ・ | ・ 塩の添加 |

実験 - 自分のゲノム DNA を抽出してみよう！

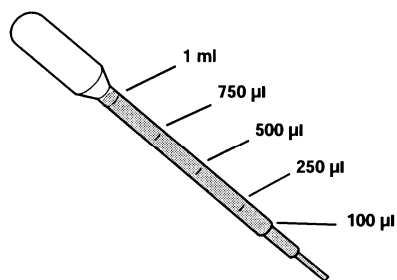
<実験準備>

共有実験台	個数
50°Cの恒温槽	1
15mlコニカルチューブ用ラックまたはビーカー (恒温槽でインキュベーションする時にチューブを立てるために使用)	-
冷却した 91%イソプロパノールまたは 95%エタノール (氷中)	実験班分

学生用実験台(4名/実験台)	個数
3mlの精製水の入ったコニカルチューブ	4
1.25ml のプロテアーゼの入ったピンク色マイクロチューブ(「P」と表示)	1
10mlのライシスバッファーの入ったコニカルチューブ	1
マイクロチューブラック(コニカルチューブ等が立ててある)	1
デイスポーザブルピペット	6
油性ペン	1
使用済みピペット等廃棄用容器	1
ネックレスモジュール または 透明のマイクロチューブ	4
オプション 紙コップ	4

<試薬の計量>

実験には目盛り付きのデイスポーザブルピペットを用いて、試薬を量り取ります。下図に、計量することになる容量に対応するピペットの印の位置は下記の通りです。



<操作>

ステップ1・2：細胞の採取と破壊

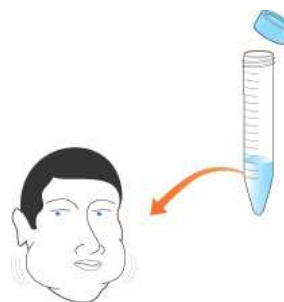
できるだけ多くの頬細胞を採取するために、精製水で口内をすすぐ前に、頬の裏側をほぐすイメージで軽く噛みます。ストローを吸うように口をすぼめるとうまくかむことができます。出血するほど強く噛むことは決してしないでください。

1. 実験台のマイクロチューブラックから、3ml の水の入った 15mlコニカルチューブを取り、油性ペンでチューブのフタと側面に自分の名前を記入してください。

2. 頬の内側を軽く、ほぐすように 30 秒間、噛みます。ストローを吸うようにすると噛み易くなります。

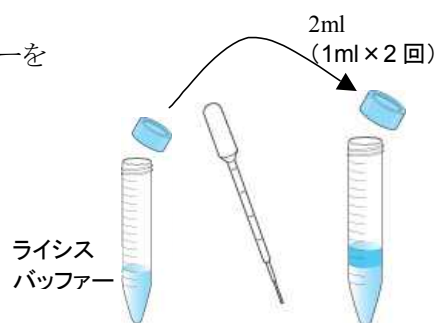
注意! この時、噛みすぎて出血しないように注意してください。

3. コニカルチューブの水を口に含み、激しくブクブクと口内をすすぎます。



4. 注意深くコニカルチューブ(または紙コップ)にすすいだ溶液を戻し、しっかり蓋をします。紙コップに戻した場合は、紙コップの溶液からコニカルチューブに約 3ml 移します。

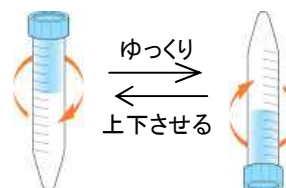
5. ディスポーザブルピペットを用いて、ライシスバッファーを 2ml 加えます。



6. コニカルチューブの蓋がしっかり閉まっていることを確認したら、穏やかにチューブを5回ほど上下させます。

ここで、絶対に振ってはいけません。

この時、チューブ内の溶液の様子をよく観察し、変化があれば記録しておきましょう。

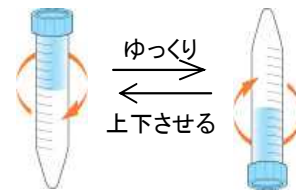


ステップ 3: タンパク質の除去

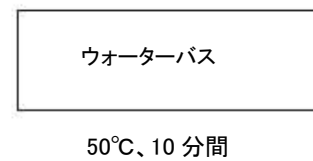
1. ディスポーザブルピペットで塩入りのプロテアーゼ溶液
（「P」チューブ）を 250 μ l とり、5 滴コニカルチューブに加えます。



2. コニカルチューブの蓋がしっかり閉まっていることを確認したら、穏やかにチューブを5回ほど上下させます。
ここで、絶対に振ってはいけません。
この時、チューブ内の溶液の様子をよく観察し、
変化があれば記録しておきましょう。



3. 50°Cのウォーターバスで 10 分間インキュベートします
チューブの溶液部分が湯浴に充分浸っているか、確認しましょう。



ステップ4・5：DNAの視覚化

1. コニカルチューブを45度に傾け、よく冷やしたアルコール10mlをディスポーザブルピペットで穏やかに流れ込むように注意しながらゆっくりと加えます。



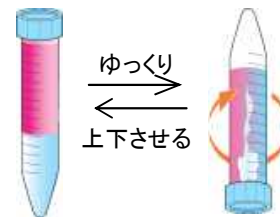
2. コニカルチューブをまっすぐに立て、そのまま静かに5分間放置します。
この時、チューブ内の溶液の様子をよく観察し、変化があれば記録しておきましょう。



溶液とアルコールの界面に注目！

何か見えますか？観察結果を記録してください。
グループの他の人のコニカルチューブはどのような様子でしょう？

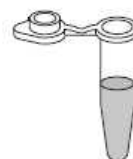
3. コニカルチューブを非常にゆっくりと5回上下させます。
糸のような白または透明な物質を観察しましょう。
これがあなたのDNAです。



4. [DNA ネックレスを作る場合] 先生からペンダントのパーツが配られます。ディスポーザブルピペットを用いて、約750 μ l～1mlのアルコール溶液と共に、析出したDNAをネックレスに移します。グループの人たちと協力してもらい、ネックレスに封をし、ひもを通せばDNAネックレスの完成です。
[マイクロチューブに保存する場合] 透明のマイクロチューブに750 μ l～1mlのアルコール溶液と共に析出したDNAを慎重に移し、しっかり蓋を閉めます。



or



付録 A オプション実験

< 模型を利用したデモンストレーション >

小学校高学年から中学生対象の授業では、各ステップの間、その操作によって細胞がどのように変化しているか、分子レベルでどのようなことが生じているのかを生徒に示すため、もし、余裕があれば、DNA 抽出手順を模型のようなものを使用して、細胞に何が起きているのかをデモンストレーションしてみるのはいかがでしょうか？このような視覚的で楽しい実習を行うことで、今回の実験の意義を高めるために必要な概念を教師の側から提示しやすくなります。頬細胞からの DNA の単離過程をデモンストレーションする方法ですが、透明なラテックス製の風船の中に、膜、細胞小器官および DNA の代用として種々の小さなアイテムや紐を入れて、細胞のモデルを作成します。界面活性剤が膜を溶解すると(風船を割ります)、プロテアーゼがタンパク質を消化し(小さなアイテムを押しつぶします)、塩およびアルコールが DNA を析出させて凝集させる(紐をひとまとめにします)ということをはっきりと示すのも 1 つの例かもしれません。

< 頬細胞の顕微鏡観察と核の染色 >

口をすすいで頬の細胞を回収した後、その精製水を遠心処理して細胞を沈殿させます。沈殿物を少し取り、1 滴の水をたらしておいた顕微鏡用スライドグラスの上に乗せます。核染色液をスライドグラスに 1 滴加え、低倍率および中倍率で細胞を観察します。

観察してスケッチを行い、目に見えた細胞構造物の名称を記入させます。

付録 B 質問に対する回答

(基本編)

頬から実際に細胞が採取されているかどうかは、どのようにすれば確認できますか？目で見て確認するためにはどのような実験器具や機械が必要になるでしょう？

口をすすぎ、頬細胞を回収した後の精製水を遠心処理し、その沈殿物を顕微鏡用スライドグラスに乗せて顕微鏡で観察します。

皿を洗うときに効率がよいのは、温水と冷水のどちらでしょうか？

界面活性剤が細胞を破壊しやすくするためには、温かい温度と冷たい温度のどちらで使用する方がよいと思いますか？

皿洗い洗剤では温水のほうが脂肪やタンパク質を溶けやすくするので、皿を洗うときに効率がよいのは温水です。セルライシスバッファーで細胞を破壊するときにも温かい温度の方が界面活性剤は有利に働きます。

細胞を破壊すれば DNA が見えるようになると思いますか？

どうしてそう思うのか、その理由も書いてください。

細胞を破壊しただけでは DNA が目に見えるようにはなりません。DNA はセルライシスバッファーに溶け込んでいます。

プロテアーゼは体内ではどこにあると思いますか？

(ヒント:あなたが食べたタンパク質はどこで分解されますか？)

例えば、プロテアーゼは胃の中にあり、摂取したタンパク質はここで消化されます。

アイ스티ーに砂糖を入れたら、砂糖は簡単に溶けるでしょうか？同じ量の砂糖を熱い紅茶に入れて溶かした場合はどうでしょう？

アイ스티ーでは熱い紅茶に比べて砂糖があまりよく溶けません。アイ스티ーの温度は低いため、砂糖の溶解度、すなわち溶けやすさが低下するのです。一般的に、液体中では温度が高いほうが物質の溶解度は上昇します。

(発展編)

・DNA、ゲノム、遺伝子の違いを自分よりも2つ年下の弟や妹に、簡単に、分かりやすく説明しようとしています。あなたならどのように説明しますか？

DNAとは、生き物の体の中にある化学物質で、私たちのDNAはお父さんとお母さんから引き継いでいます。DNAは、一人一人をその存在として作り上げるために必要な情報を運搬しています。

ゲノムとは、染色体というDNAの塊にあるすべてのDNAのことをいいます。

遺伝子とは、DNAのうちタンパク質を作り上げるために必要な情報を含む部分で、生体細胞内で重要な働きを行っています。

・肝臓の細胞は頬の細胞と同じゲノムを含んでいますか？

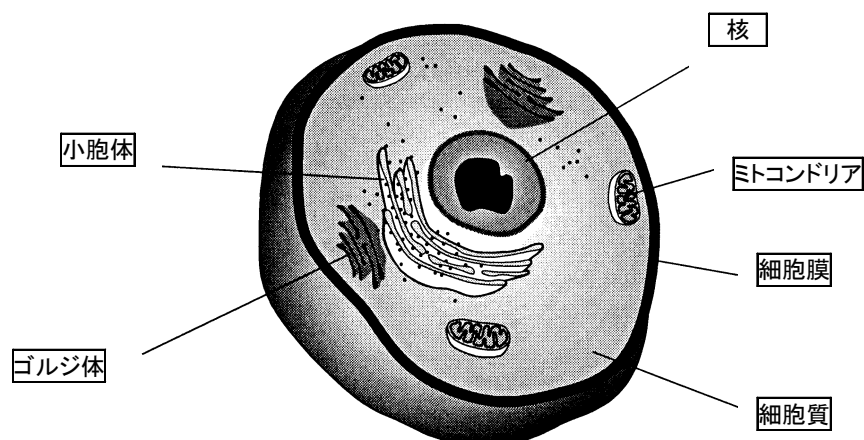
含んでいます。生殖細胞以外のすべての細胞が持つゲノムDNAは、細胞がどの組織に由来したかにかかわらず、同一のものです。

・胃の中に存在するタンパク質をコードしている遺伝子を単離したい場合、その遺伝子を頬の細胞の中から見つけることができますか。また、その mRNA を見つけることができるでしょうか？その理由を説明してください。

胃のタンパク質をコードしている遺伝子は、頬細胞内のゲノムDNAにも含まれます。しかし頬細胞では、胃のタンパク質に対する遺伝子のコピー、すなわち mRNA は作られていません。胃のタンパク質の遺伝子は、胃でしか発現しないからです。

以下の図は頬の細胞の模式図です。

・前ページの図の□の中に、細胞小器官の各名称を記入しましょう。



・ゲノム DNA はこれらの細胞小器官のうちどこにあると思いますか。

ゲノム DNA は核内に存在します。

・ゲノム DNA から情報をコピーしてそれをタンパク質に翻訳できるようにするために mRNA のような中間体が必要なのはなぜですか？（ヒント；ゲノム DNA のある場所とタンパク質が作られる場所は同じでしょうか？）

ゲノム DNA は核内に存在し、常にそこにとどまります（図書館外に持ち出すことのできない書架の書籍のようなもの）が、タンパク質を作り出すリボソームは細胞質に存在しています。遺伝情報を核から細胞質に持ち出すためには、可動性の中間体が必要なのです。

・自分の細胞から DNA を単離するためには、まず始めに何をする必要がありますか？

細胞膜および核膜を破壊して、DNA を放出させなければなりません。

・膜が溶解すると DNA が溶液中に放出されますが、細胞に含まれる、たくさんのその他物質も放出されます。DNA 以外に細胞内にあると考えられる物質を列挙してください。

一般的な細胞成分は、タンパク質、脂質、糖類および無機質（塩類）です。

・これらの不要な物質を分解するにはどのような物質が必要でしょうか？

すべての生物学的分子について、それぞれを特異的に消化する酵素が存在します。プロテアーゼはタンパク質を分解し、界面活性剤は脂質を溶解し、 β -ガラクトシダーゼのような酵素は糖類を分解します。こうした消化過程は、加熱および攪拌により速度を上げることが可能です。

・細胞内ではどのようなタンパク質が DNA に結合していると思われますか？

（ヒント；染色体の構造、DNA の複製や転写などの時、どのようなタンパク質が作用するでしょう？）

染色体 DNA はヒストンと結合しています。その他の関連核タンパクには、DNA ポリメラーゼまたは転写因子などがあると思われます。

・今回の手順で使用するプロテアーゼは 50°C で作用が最大となります。この酵素はどのような環境で生育する生物に由来するものだと思いますか？

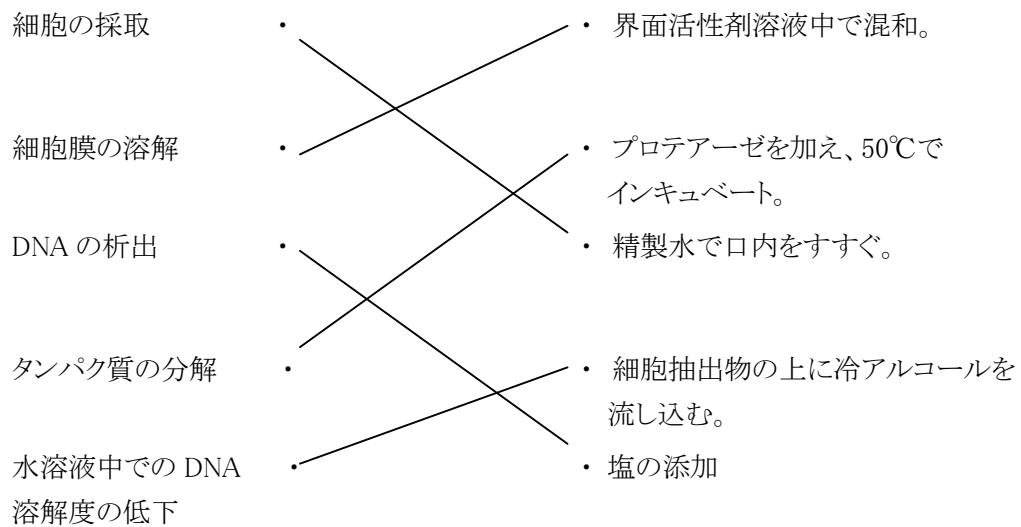
至適温度が 50°C となる酵素は、こうした温度付近で生息する生物から単離されたと思われます。

・ステーキのような硬い肉片を柔らかくするためにしばしばパパイン（プロテアーゼの一種、パパイヤに含まれています）などを含む食肉軟化剤が利用されることがあります。ステーキの肉はタンパク質の豊富なウ

シの筋組織から作られていることを考えると、食肉軟化剤がどのように作用しているでしょう？

多くの食肉軟化剤にはパパインが含まれており、これはプロテアーゼです。プロテアーゼはタンパク質分子を分解します。タンパク質の一部を分解することで、硬い筋肉/肉片は柔らかく、口当たりのよいものになります。

•左にある目的を達成するために何をすれば良いのか、右から選んで線で結びましょう。



付録 C ヒトゲノムを取扱う実験について

このキットを使用した授業では、参加する生徒自身のゲノムDNAを粗抽出・可視化します。ヒトのゲノムを利用して解析することには変わりなく、たとえ教育目的で、厳密に精製することはないとしても自身のゲノムを使うことから、最低限でも実験の指導にあたる先生方には生命倫理や個人情報保護について、念頭において授業を実施していただきますよう、お願いいたします。

ブロッコリーや鶏レバー等から、家庭の台所にあるようなものを利用してゲノム DNA を抽出する実験を中心に、自分の DNA を見てみよう、という実験も近年大変多く実施されるようになりました。

このような抽出実験の場合、それ以上遺伝子等の解析はしませんので、「Kit 8 PV92 PCR/Informatics キット」で PV92 遺伝子座を解析する、あるいは ALDH2(アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2)の解析実験のような、個人情報と生命倫理についての配慮までは必要ないかもしれません。

また、状況に応じて授業の中でこれらについて触れておく、発展的内容として関連した問題について考えさせるように展開する授業も可能と思われます。

必要な場合には、実験内容の告知、実験に参加する生徒やその保護者の同意書、残ったDNAサンプルの廃棄、実験結果＝個人情報の取扱いについての案内等々を事前に行なっておくことなど、状況にあった対応をしてください。詳しい内容は、「Kit 8 PV92 PCR/Informatics キット」日本語マニュアル・付録 E をご覧ください。



バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

本社 〒116-0014 東京都品川区東品川 2-2-24

Tel : 03-6361-7000 Fax : 03-5463-8480

大阪 〒532-0025 大阪市淀川区新北野 1-14-11

Tel : 06-6308-6568 Fax : 06-6308-3064

福岡 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 2-5-28

Tel : 092-475-4856 Fax : 092-475-4858

製品の学術的なお問い合わせ

修理・メンテナンスに関するお問い合わせは

Tel : 03-6404-0331 Fax : 03-6404-0334

Mail : life_ps_jp@bio-rad.com

<http://explorer.bio-rad.co.jp>