

スーパーサイエンス部学習会(バイオテクノロジー & 生物情報分野)実施要項

主 催: 愛知県立岡崎高等学校

共 催: 国際生物学オリンピック日本委員会

内 容: 生物学オリンピックを体験してみよう～バイオテクノロジー実験【基礎】～

実施日: 5月 24 日(土) 9:00～17:00

場 所: 愛知県立岡崎高等学校 生物室

講 師: 岩間 亮

東京大学大学院農学生命科学研究科 助教

国際生物学オリンピック日本委員会 運営委員

補 助: 水池 彩

国立健康機器管理研究機構 国立感染症研究所 主任研究員

目 的

国際生物学オリンピック・日本生物学オリンピックにおいて、実験として頻繁に取り上げられてきた「バイオテクノロジー」に関する基本実験技術や、近年取り上げられることが増えてきた「生物情報」分野に関する基本的 PC 操作(データベース等の演習)を題材に、講義や実験実習を行う。また、他校生徒との交流を通して、岡高キー・コンピテンシーのうち、知識を統合する力、課題発見力、仮説設定能力、文章表現力、コミュニケーション力を育成する。

内 容

「標的遺伝子のクローニング」を題材として、

- アミノ酸／核酸の配列情報の取扱いと検索の基礎
- PCR(コロニーPCR)
- 大腸菌からのプラスミド抽出
- アガロースゲル電気泳動

を行った。

参加者

生徒 36 名、教員 9 名

岡崎高校(生徒 25 名、教員 5 名)

半田農業高校(生徒 1 名、教員 1 名)

岡崎北高校(生徒 5 名)

豊田西高校(生徒 3 名、教員 1 名)

一宮高校(生徒 3 名、教員 1 名)

当日使用した実験プロトコル

バイオテクノロジー&生物情報分野

生物学オリンピックを体験してみよう～バイオテクノロジー実験【基礎】～

近年、医療・食品・環境などさまざまな分野で活用が広がっている「バイオテクノロジー」。それを支える基本技術の多くは、大腸菌などの微生物を使った遺伝子操作に基づいています。本講座では、生物学オリンピックでも出題されるような基礎的な分子生物学実験を実際に体験しながら、DNA の操作や可視化の技術に触れていきます。

今回のテーマは「大腸菌のコロニーPCR」「プラスミド抽出」「アガロースゲル電気泳動」の 3 つです。まず、大腸菌のコロニーをそのまま鋳型にして PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を行い、目的の DNA 配列が含まれているかを判定します。続いて、大腸菌に導入されたプラスミド DNA を抽出する操作を行い、実際に DNA を取り出す工程を体験します。そして、増幅または抽出された DNA をアガロースゲル電気泳動で可視化し、大きさごとの分離を観察します。これらの手法は、大学や研究現場で日常的に使われている技術です。身近な材料の中にある“見えない情報(遺伝子)”を、実験の手を通じて“見える化”することが、生命科学の魅力の一つです。

実験台の上に用意されている器具(1班あたり)

● マイクロピペット(P1000、P200、P20)	各 2 本
● チップ(P1000 用、P200/P20 用)	各 2 ケース
● マイクロチューブ	30 本
● コレクションチューブ+カラム	4 セット
● マイクロチューブラック	2 個
● PCR チューブ【8 連チューブ】	1 本
● 15 mL チューブ(水が入っている)	2 本
● キムワイプ	1 箱
● キムタオル	1 束
● 爪楊枝	10 本
● ラボグローブ	1 箱
● アガロースゲル電気泳動槽	1 台
● マジック	2 本
● チップ廃棄用ボックス	2 個
● 菌体廃液用容器	1 個

実験室内で共通に用意されている器具・試薬

- TAE Buffer(実験室前方)

- ボルテックス(実験室前方)
- サーマルサイクラー(実験室後方)
- 遠心分離機(実験室後方)
- 撮影装置(実験室前方)

実験 1 大腸菌のコロニーPCR

コロニーPCR は、寒天培地上に現れた微生物(今回は大腸菌)のコロニーをそのまま鋳型 DNA として利用し、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を行う方法です。プラスミド DNA が大腸菌に導入されたかどうかを簡便かつ迅速に確認できるため、遺伝子組換え実験で広く用いられています。従来の方法では、一度培養して DNA を精製する必要がありましたが、コロニーPCR ではその手間を省けるのが大きな利点です。本実験では、あらかじめ組換え操作が行われた大腸菌コロニーを用いて、目的の DNA 断片が増幅されるかを確認し、正しい組換えが行われたかを判断します。バイオテクノロジーにおいて重要な“確認”のステップを、実際の手技を通じて体験してもらいます。

配布する試料(1班あたり)

- 大腸菌プレート 1 枚
- プライマー溶液(Pri-Fw, Pri-Rv と記載) 各 2 本ずつ
- ポリメラーゼ溶液(KAPA2G と記載) 2 本

実験手順

1. 以下の組成で溶液をマイクロチューブ内で混合する。

2x KAPA2G Fast HostStart ReadyMix with dye (KAPA2G)	12.5 μ L
10 μ M Forward primer (Pri-Fw)	1.25 μ L
10 μ M Reverse primer (Pri-Rv)	1.25 μ L
水	10 μ L

2. 10 μ L ずつ PCR チューブに分注する(2 つつ)。
*自分の名前(イニシャルなど)をチューブに書いておきましょう。
3. 大腸菌プレート上のコロニーを爪楊枝で触れる。
4. 爪楊枝についた大腸菌を PCR チューブ内の溶液に一回だけつける。
5. PCR チューブの蓋を閉める。
6. 実験室後方のサーマルサイクラーまで持ってくる。

実験 2 大腸菌からのプラスミド抽出

プラスミドは、大腸菌などの細菌が持つ小さな環状 DNA 分子で、遺伝子組換えに用いる「運び手(ベクター)」として広く利用されています。大腸菌に導入したプラスミドを回収することで、目的の DNA 配列が正しく導入されているか調べたり、次の実験に使ったりすることができます。本実験では、アルカリ変性法と呼ばれる基本的な方法を用いて、大腸菌からプラスミド DNA を抽出します。この方法では、細胞膜を壊して中身を取り出し、プラスミドと染色体 DNA を区別して回収します。抽出したプラスミドは、後の制限酵素処理や電気泳動による確認、また別の細胞への導入(形質転換)などに利用できます。遺伝子操作の中核を担う重要なステップを、実際に体験してもらいます。

配布する試料(1班あたり)

- 5 mL 大腸菌の培養液(15 mL チューブ内) 1 本
- 1 mL mP1 (マイクロチューブ内) 1 本
- 1 mL mP2 (マイクロチューブ内) 1 本
- 1.5 mL mP3(マイクロチューブ内) 1 本
- 1 mL mP4 (マイクロチューブ内) 2 本
- 1.5 mL mP5 (マイクロチューブ内) 2 本
- 300 μ L mP6 (マイクロチューブ内) 1 本

実験手順

1. 大腸菌の培養液を 1 mL (1000 μ L)分、マイクロチューブに移す。
2. 実験室後方の遠心分離機まで持ってくる(10,000 rpm で 1 分間、遠心分離する)。
3. 上清(大腸菌が沈んだ後の透き通った培地)をマイクロピペットで吸って、吸った上清を菌体廃液用容器に捨てる。
4. 200 μ L の mP1 をマイクロチューブに移す。
5. マイクロピペットを使って、ペレット(遠心分離後にチューブの底に集まった菌体)を懸濁する。
6. 200 μ L の mP2 をマイクロチューブに加えて、転倒混和する。
7. 室温で 2 分間静置する。
8. 300 μ L の mP3 をマイクロチューブに加えて、転倒混和する。
9. 実験室後方の遠心分離機まで持ってくる(15,000 rpm で 2 分間、遠心分離する)。
10. 600 μ L の上清をカラムに移す。
11. 実験室後方の遠心分離機まで持ってくる(15,000 rpm で 30 秒間、遠心分離する)。
12. 液体回収用チューブ内に集まった液体を、菌体廃液用容器に捨てる。
13. 液体回収用チューブにカラムを設置する。
14. 400 μ L の mP4 をカラムに入れる。
15. 実験室後方の遠心分離機まで持ってくる(15,000 rpm で 30 秒間、遠心分離する)。

16. 液体回収用チューブ内に集まった液体を、菌体廃液用容器に捨てる。
17. 液体回収用チューブにカラムを設置する。
18. 600 μ L の mP5 をカラムに入れる。
19. 実験室後方の遠心分離機まで持ってくる(15,000 rpm で 30 秒間、遠心分離する)。
20. 液体回収用チューブ内に集まった液体を、菌体廃液用容器に捨てる。
21. 液体回収用チューブにカラムを設置する。
22. 実験室後方の遠心分離機まで持ってくる(15,000 rpm で 1 分間、遠心分離する)。
23. カラムを新しいマイクロチューブに入れる。
24. 50 μ L の mP6 をカラムに入れる。*カラムの中央部にチップの先端をつけて入れる。
25. 室温で 2 分間静置する。
26. 実験室後方の遠心分離機まで持ってくる(15,000 rpm で 1 分間、遠心分離する)。
27. マイクロチューブ内にプラスミド溶液があるので、マイクロチューブの蓋を閉める。

実験 3 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は、DNA の大きさ(塩基数)によって分離する方法です。DNA はリン酸基を持つため、全体として負の電荷を帯びています。これを電気を流したゲル(寒天のような固まり)の中で移動させると、小さな DNA 断片はゲルの隙間をすり抜けて早く進み、大きな DNA 断片は遅く進むため、大きさごとに分かれていきます。この方法を使えば、PCR で増幅した DNA が本当に目的のサイズかどうかを視覚的に確認できます。実験では、DNA をアガロースゲルに入れて電圧をかけた後、DNA を可視化するための染料を使って、青色光などでバンドとして観察します。バンドの位置を、あらかじめ用意した「サイズマーカー」と比較することで、DNA の大きさを推定することができます。

配布する試料(1班あたり)

● 17 ウェルのアガロースゲル	1 枚
● 50 μ L Loading Dye (LD と記載)	1 本
● 50 μ L 制限酵素処理プラスミド溶液(RP1 と記載)	1 本
● 20 μ L 1 kb Ladder (Ladder と記載)	1 本

* アガロースゲルは 17 ウェルある。1 人 4 ウェル使う。

2 ウェル — コロニーPCR の 2 サンプル

1 ウェル — 抽出したプラスミド溶液

1 ウェル — 配布するプラスミド溶液

実験手順

1. (コロニーPCR を行った)PCR チューブの蓋を開けて、5 μ L の反応液をアガロースゲルのウェルにロードする。
2. マイクロチューブに 9 μ L の Loading Dye を入れたのち、1 μ L の抽出したプラスミドを混合する。全量 (10 μ L)をウェルにロードする。
3. 配布されたプラスミド溶液を 10 μ L ロードする。
4. 【班で一人】最後のウェルに 10 μ L の 1 kb DNA ladder をロードする。
5. 100 V で 40 分程度、電気泳動する。
6. 泳動後のゲルを撮影する(撮影装置に持ってくる)。