

安価に学生・生徒向けPCR実験を行うための情報

Tips for conducting inexpensive PCR experiments for students

三宅 崇

MIYAKE Takashi

[キーワード Keyword] 教材, 高等学校, 電気泳動, 分子生物学実験, DIY
[所属 Institution] 岐阜大学教育学部 (Faculty of Education, Gifu University)

[要旨 Abstract] PCR法やDNAの電気泳動は, 高校生物においても実験方法の詳細な理解が求められるために, 生徒実験の普及が求められる一方で, 教える側が実験経験を持たないことも多く, また, コストと時間の制約もあり実験環境が整っているとは言い難い。そこで, これまでに報告されているコスト削減と簡略化の工夫をまとめ, また筆者が行っている工夫を紹介すると同時に, 試薬や消耗品の入手方法についても解説することで, 安価に実験環境を整えるための材料を提供する。

1. はじめに

ポリメラーゼ連鎖反応, いわゆるPCR法が開発されたのが1985年 (Saiki et al. 1985), さらに耐熱性Taqポリメラーゼの利用が考案されたのが1988年 (Saiki et al. 1988) であり, その後の普及は広く知られているところである。一方で, 高等学校の学習指導要領 (文部科学省 2009) において, 「生物」の学習内容では遺伝子増幅技術を含む遺伝子関連の内容が大幅に増加し, 以前は大学で学んでいた分子生物学の内容が多く取り入れられるようになった。しかしながら, 多くの高校生物教員にとっては, 教えてはいるものの, 自身の実験経験がない分野であろう (熊谷 2019)。大学の学生実験で取り入れられたのは1990年代の中旬以降と思われるため, それ以前に大学を卒業した教員は学生実験では経験できなかった。一方で, 1995年には高校生向けのPCR教材開発が報告されており (斎藤 1995), かなり早い段階で高校での教材としての可能性が検討されていたことがうかがえる。

生物学に限らないが, 自然科学の研究分野では, 実験を行いそれによって得られたデータを分析することで結果を考察し, 様々な事象を明らかにしていくというステップを踏む。しかし, 高校教科書に載っている事象はすでに解明されて広く受け入れられたものであり, 明らかとなった事実だけが述べられている。ここでは, 明らかにする過程で行われた実験方法の原理の理解が問われたり, 得られた実験の生データを解釈し分析する方法が問われることは稀である。それを踏まえると, PCR法や電気泳動法の扱いはかなり特異である。例えば, PCR法の各ステップ (変性やアニーリングなど) やそこで生じている現象についての理解が求

められる。電気泳動でもDNAは正負のどちらに移動するか, 分子サイズと移動距離にはどのような関係があるかなど, おおよそ他の単元では問われない実験方法の詳細な理解が要求されている。

このような状況下で, 実験経験のない高校生物教員が不安を感じたり, 他の単元以上に生徒実験の普及が望まれたりすることは当然である。しかし, それを阻む要因として, コストと時間という2つの大きな問題がある。これについて様々なところで指摘され改善が進められてきたが (笹川・小野 2008; 倉林・武村 2017; 井上・谷口 2018; 園山・渥美 2018; 向陽ほか 2020), いまだ解決には至っていない。教員が実験を行える環境であれば, 各学校の状況に応じた教材を作ったり, さらなる工夫を取り入れたりすることも可能であろう。そのためは, これまでに既に開発されているコストや時間に関する工夫や取り組みを知った上で, それらを取捨選択して環境を整えるのが最も効率的である。

さらに, 向陽ほか (2020) は, 高校教員にアンケートを行い, PCRや電気泳動を困難にする要因として, 実験機器や試薬だけでなく, DNAマーカーやプライマーの入手方法といった情報が十分でないことも報告している。すなわち, コストや時間の問題に加え, 何をどう購入して準備すれば良いのかの情報が不足しているのである。

これらは, 日頃研究を行っている大学教員がアドバイスできる領域である。大学とて研究費が潤沢にあるわけではなく, 日夜儉約を強いられているため, 研究者により様々な儉約法がウェブサイトや本で紹介されている (例えば村田 2016)。また試薬や機器のメーカーや販売会社はほぼ例外なくキャンペーンを行なって

おり（現在ではウェブサイトで確認できる）、それらにも敏感である（少なくとも私は）。

そこで本稿では、これまでに報告されているコスト削減と簡略化の工夫をまとめ、また私が行っている工夫を紹介すると同時に、入手方法についても解説する。まず、機材と消耗品に関して述べ、次に実験方法について述べる中で、時間的な工夫についてもできる限り言及した。なお、高校生物の教科書に出てくる分子生物学実験は、1) DNAを扱って、PCRや制限酵素処理、電気泳動を行う、2) RNAへの転写やタンパク質合成を行う、3) 大腸菌を用いて、遺伝子組換え実験を行う、といったものがあるが、本稿では1)に関連したものに限定した。

2. 必要な機材と代替法

2.1. 遠心分離機：必要ではない

次項の卓上遠心機も合わせて遠心機と言ったりもするが、ここでは回転数がおおよそ >7000 gで設定が可能なものも遠心分離機と呼ぶことにする。遠心分離は、DNA精製の過程で用いることが多く、1) PCR前の生物試料からの精製以外に、大学の実験室では2) PCR後の精製、3) サイクルシーケンス（塩基配列解析で行う）後の精製などで必要とされる。しかし、高校での実験では1)以外に行われまいだろうから、1)において遠心分離を必要としない方法を用いれば、必然的に不要となる。

2.2. 卓上遠心機：あると良いが自作も簡単に可能

ここでは、前項に該当しない小型の遠心機を卓上遠心機と呼ぶことにする。主としてチューブの壁面に飛び散った液体をまとめる（スピンドアウン）ために用いる（図1）。1.5 mLチューブなら、腕を使って振り回すことでも液体を底に集めることが可能であるが、8連のPCRチューブなどではスピンドアウンできる方が安心してタッピングによる攪拌ができるので、卓上遠心機はあった方がよい。様々な販売会社が扱っており、キャンペーン時で2~3万円くらいである。

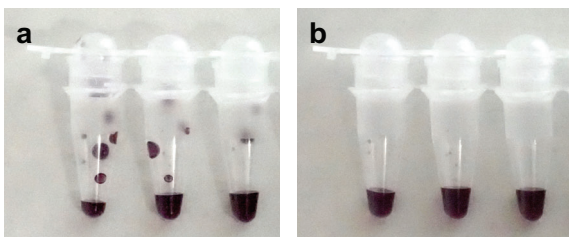


図1 チューブの管壁に液体が飛び散った状態 (a) と卓上遠心機で落とした状態 (b)。

以前から広く知られている代替法は、野菜の回転水切り器を使う方法で、ウェブサイトでも、96穴プレートの水切り内に立てて行う方法が紹介されている（株式会社リーゾ 2009; LATB Staff 2015）。チューブラック等をうまく固定することで、1.5 mLチューブやPCRチューブでも同様に使うことができる。材料は水切り器とチューブラック、輪ゴム等で、費用は2000円以下である。

さらに、プラモデルなどで使うモーターや、USB扇風機（例えばUSB卓上ミニ扇風機（オーム電機））に、3Dプリントで作成したローターを接着することで、簡易卓上遠心機を作成することもできる（図2）。図2の自作品はDMM.makeでのローター製作費が約1200円で、その他の部分が1000円以下である。

2.3. サーマルサイクラー：必須だが代用も可能

OpenPCR (<https://openpcr.org/>) などいくつかのDIY装置も売られているが、ウェル数が16などと少なく、実用性は限られている。市販の装置を購入できれば最も良い解決と言えるが、最も高価な装置でもある。私のラボで使っているサーマルサイクラーは約50万円だったと記憶している。購入機会が少ないために価格を比較したことはないが、安いものとしては日本ジェネティクスから96ウェルで約32万円（キャンペーン時）という製品が販売されているようである。

お金をかけない方法としては、3つの温度帯を設定し、その間をPCRチューブを移動させるという方法が

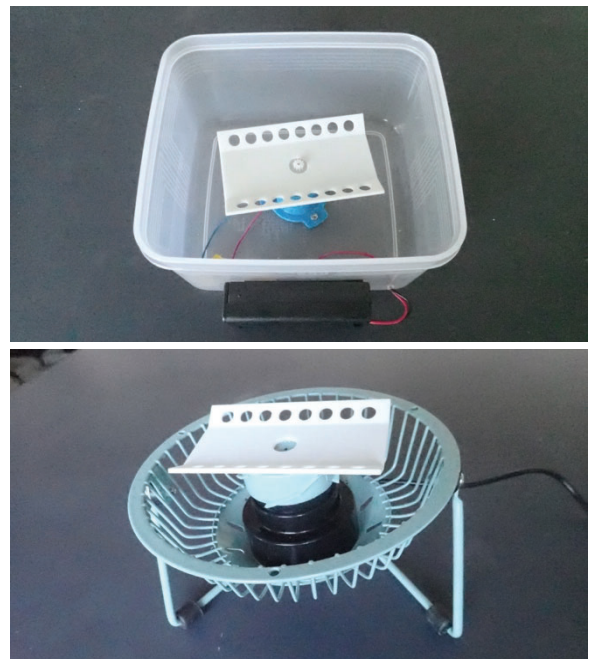


図2 自作した卓上遠心機。(a) プラモデル用モーターを使ったもの。(b) USB卓上扇風機を改造したもの。

あり、高校教科書でも採用されている（嶋田ほか 2020）。この場合は恒温槽あるいは調理器具による温度管理等を行うことが多い（例えば熊谷 2019, 薄井 2015, 杉村ら 2015）。実は時間的にはサーマルサイクラーよりも短時間で行うことが可能である。それは、ブロック温度を短時間で次々に変化させるサーマルサイクラーに対し、温度帯を別々に設定する方では温度間の移行時間が不要であるためである。例えば最初の高温保持時間を1分、その後の各温度帯を10秒とすれば、21分で40サイクルのPCRが完了する（大井ほか 2019）。

大井ほか（2019）は、保温スプージャーを利用することで、温度管理も省略してPCRが行えることを示した。ただし、20分程度でもアニーリング用のスプージャーでの温度低下は大きいため、変性剤を加えるなどの工夫が必要である。

2.4. 電気泳動槽：必須だが自作も可能

大学の研究室ではMupid社の電気泳動装置あるいはそれに類似したものがよく使われている。Mupid-2plusという製品が約4万円である。高額になる要因の一つは電極に白金が用いられているためである。自作する場合には逆にそれがネックでもあり、代替物として鉛筆芯やステンレスの針金、アルミホイルを電極に用いた方法が報告されている（Ens et al. 2012; 倉林・武村 2017; 熊谷 2019）。1台4万円程度とはいえ、班の数（5~6台）必要であれば高額になるため、自作できればコスト節約にはなるが、自作の場合は感電対策が問題となる。また、自作の多くの例では電圧が50V程度と弱いために、既製品と同じサイズであれば泳動に要する時間（一般に20~30分）は長くなると思われる。

2.5. イルミネーター：ほぼ必須だが自作も簡単に可能

染色試薬の項で後述するように、現在ではラボでも生徒実験でも青緑色で励起する染色試薬の利用が一般的である。泳動終了後に分離を観察・撮影するだけであれば、イルミネーターは1台で十分であるが、それでも5~10万円程度はかかる。

自作するのであれば、最も安価な方法は倉林・武村（2017）にあるように青色LEDライトを局所的に照射し、オレンジアクリル板越しに見る方法である。

筆者はさらにゲル全体を照らすために、以下の2つのイルミネーターを自作した（図3）。1つ目は電子部品のパーツショップ（例えば秋月電子通商）で高輝度青色LED（例えば5 mm青色LED 470 nm 9cd60度）

を購入して自作する方法である。これを100円ショップの容器に入れてアルミの反射シートをいれると簡単にイルミネーターができる。オレンジアクリル板としてはアクリサンデー板（色番252, 厚み2 mm）を用いた。総費用約2000円である。2つ目は自動車用品店で売っている青色LED電飾（例えばUSBフリースタイルイルミ4 BL（セイワ））を購入して作成する方法である。これはUSBで電源が取れるため、大変便利である。これをホームセンターに売っている使い捨て弁当容器（アルミ蒸着セット7号, 208 x 130 x 34 mm, 中部流通；内側が銀色になっている）の内側の長辺に付属のテープで接着固定し、底面部分に窓を開けて前述のアクリル板を接着すると完成である。総費用は約2500円である。なお、撮影はスマホやiPadで十分である。暗い部屋があればベストだが、そうでなければ周囲をダンボールで覆うなどする必要があるかもしれない。

2.6. マイクロピペット：必須だが代用も可能

マイクロピペットは微量の溶液を正確に測り取るためのもので、さらにPCRではコンタミネーション（実験に影響しうる物質の混入）を防ぐために滅菌した使い捨てのチップを使う必要があることから、必須のアイテムである。大学のラボで用いるものよりも正確度や精密度が若干劣る実習用のものですら約1万円はする（Monotaroでは約7000円というものも見受け

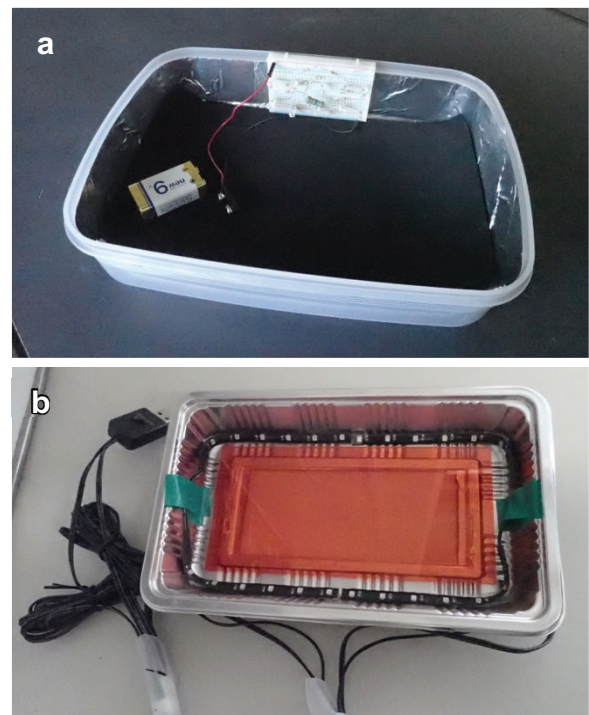


図3 自作したイルミネーター。(a) パーツショップで部品を購入して作ったもの。容器の蓋の上にゲルを乗せる。(b) 車用品を流用したもの。ひっくり返して、ゲルを覆うようにして使う。

られる)。さらに一般的には容量レンジの異なる2~3種類を使うため、これを生徒・学生実験の班の数だけ揃えると結構な額になる。

これに関するコスト削減方法としては、1つは特定の1種類のみで済ませられるようにすることである。実験で用いる溶液の体積を調節し、すべてが2~20 μL の範囲内に収まれば1種類のマイクロピペットで事足りる。

さらに容量可変式のマイクロピペットの代替物として、2つ紹介する。1つ目は、容量の小さいシリンジで代用する方法である(図4a-d)。倉林・武村(2017)でも同様の方法は紹介されているが、私はさらに簡便なアイテムを見つけた。ディスボシリンジ FGF-0.5(フチガミ器械, monotarоで購入;20本入で約4000円)を用いると、本体にそのままチップが装着できる。また、シリンジの範囲が< 500 μL なので、微量の吸引が行いやすい。これに目盛が入っているチップを用いることで定量を可能にする。小さくて煩雑に扱われやすいので、できればフィルター付きのチップを用いる。いくつかの製品を確認したところ、CLP Bt100 100 μL バリアピペットチップ(フナコシで購入)が良くフィットした。これで目盛に合わせて10, 50, 100 μL が計り取れる。また、このチップの上から目盛付き0.1-10 μL 用チップを装着することで、2および5 μL も計量できる。スタンダードチップ -10 μL (102-Q, サーマサイエンティフィック)がうまくフィットすることを確認している(図4b, d)。

2つ目の方法は、プチペット10/15/25 μL (ワトソン; 10本入で15000円)という三容量可変簡易ピペットを用いる方法である(図4e)。製品名通り10, 15, 25 μL

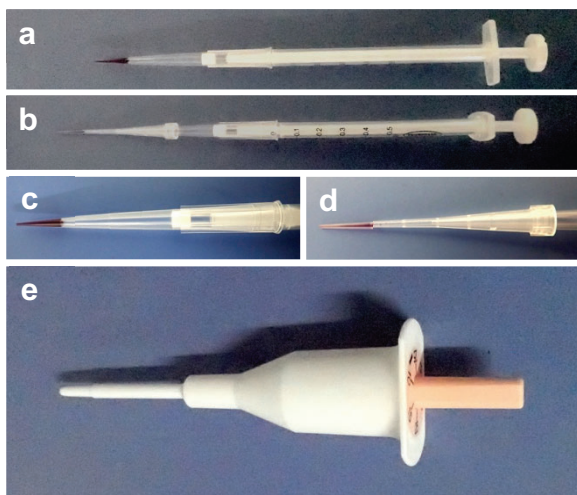


図4 マイクロピペットの代替物.シリンジピペットで10 μL 量り取ったもの(a)とチップの拡大(b),及び2 μL 量り取ったもの(c)とチップの拡大(d). (e) プチペット.

を量り取ることができる。

この2つの方法を比較した場合、それぞれ若干の欠点はある。シリンジでの方法(以下シリンジピペット)は、第一に、吸引時に常にチップ先端を目視する必要があり、それを行っていても吸引しすぎることがある(特に微量の場合)。第二に、最初に少しピストンを引いた状態で吸い始めないと、吐出する際にチップに結構な量が残ってしまう。さらに、ゆっくりと吐出するのが難しいため、電気泳動を行う際のウェルへの注入が難しい。一方で、50, 100 μL を量り取る場合は、プチペットでは複数回繰り返す必要がある。

3. 消耗品・試薬

3.1. チューブ・チップ:メーカーのキャンペーンを利用しよう

これらは、コンタミネーションを防ぐ目的から、使い捨てが基本である。従って、いかに安く入手するかが最も重要である。安く入手する方法は期間限定のキャンペーンを利用するのが手取り早い。チップはバルクで売られているものと、ボックス内に詰められた状態で売られているものがあり、前者の方がずっと安い。大学のラボではバルクで購入したものを空ボックスに詰め、その後オートクレーブ滅菌して使用するというところが多い。ただし、前述のシリンジピペットを用いる場合は特にそうであるが、不慣れた生徒が扱うために汚れやすいし、本体内まで吸い込んだりする恐れもあるため、フィルター付きチップを用いることを勧める。フィルター付きチップはほとんどの場合ボックスに詰められ、既に滅菌された状態で販売される。

3.2. プライマー:ウェブサイトで注文する

プライマーは、配列と名前だけ入力すればメーカーのウェブサイトで注文できる。支払いについては、初回登録時に普段利用している出入り業者を指定し、業者に支払う場合がほとんどである。国内メーカーでは夕方までに注文すればその日に発送されるというシステムが採られていることが多い。翌日~翌々日配送で20~30ヌクレオチド程度のもので約1000円である(ファスマックの定額オリゴ, サーマフィッシャーのバリュエーオリゴ, ユーロフィンジェノミクスのPCReadyなど)。これで100 μM なら100 μL , つまり10 μM なら1 mLくらいの量が購入できる。後述する調製方法であれば、100班分くらいになる。それほど急がないのであれば、さらに安く入手可能である。例えばIntegrated DNA Technologies (IDT)などは国外で作製しており、

ヌクレオチドあたり30円弱、すなわち20ヌクレオチドで約600円で購入でき、1週間程度で届く。また、発注時に指定すれば、多くのメーカーが100 μ M (in TEバッファー) に調製した状態で発送してくれる。実験では水 (あるいはTE) で希釈して10 μ Mにしたものを使う。ファスマックのように実際にPCR反応液調製時に用いるような10 μ Mに調製してくれるところもある。

3.3. 水：精製水でも大丈夫で、色をつけたら視認性がよい

大学のラボでは、PCRに用いる水はイオン交換した上で蒸留したものや、限外ろ過膜を通した水などを用いることが多い。しかし実際には、薬局で売られている精製水 (500 mLで約100円) でも十分にPCR増幅がみられる (少なくとも後述するKOD OneやKapaでは)。生徒・学生実験ではこれで十分だろう。

さらに、私は、シリンジピペットを用いた学生実験においては、ブロモフェノールブルー溶液 (キシダ化学) を水に15%加えている。ブロモフェノールブルーは電気泳動のローディングバッファーにも含まれる色素である。PCR増幅への影響を見たところ、後述するKOD OneやKAPAでは問題なく増幅する。これを加えることにより、シリンジピペットなどで微量を操作する際の視認性が格段によくなる。

3.4. ラダーマーカー：メーカーのキャンペーンを利用するのがよく、自作も可能

プラスミドや入フェージのDNAと適当なプライマー、制限酵素があれば、決まったサイズのラダーマーカーを大量に自作することは可能である。そのためだけに別途制限酵素を購入するとかえって初期投資が高くなることになるが、それ自体を生徒・学生実験としてしまうのも方法の1つかもしれない。そうでなければ、なるべく安い既製品を買う方が良いと思われる。ウェブ上でも、各社の価格を比較したサイトがある (<https://kanenashikenkyu.hatenablog.com/entry/cost-effective-DNA-ladder>)。私はそこでも紹介されているExcelBand 100 bp DNA Ladder (SMOBIO, コスモ・バイオで購入) を使っている。電気泳動のゲル1枚に5 μ Lくらい泳動する場合、100枚分くらいで約2500円 (キャンペーン時) である。

3.5. アガロース：メーカーのキャンペーンを利用するのがよいが、代用もできるかもしれない

アガロースの主成分は寒天であるが、分子の均質性

などが泳動パターンに大きく影響するため、市販の寒天とアガロースでは解像度が大きく異なる。市販の寒天を用いることも可能であり (倉林・武村 2017)、状況に応じて検討するのもよい。ラダーマーカー同様各社の価格を比較したサイトがある (<https://kanenashikenkyu.hatenablog.com/entry/cost-effective-agarose>)。私はアガロースS (ニッポンジーン; 100 gでキャンペーン時で約1万円) を使っている。30 mLの2%アガロースゲルであれば、150枚分程度になる。

3.6. 泳動バッファー：購入が基本

泳動バッファーは、ラボではTAEあるいはTBEを濃縮状態で調製してストックし、希釈して使っているが、それと同じもの (50×TAEなど) が売られているため、ラボほど高頻度に使うのでなければその方が楽であろう。安く自作する方法としては、重曹を緩衝液として用いる方法が報告されている (Ens et al. 2012) が、私は試したことはない。

3.7. 染色試薬：青緑色で励起するものが安全で普及している

アガロースゲル内でサイズにより分離されたDNA断片は、肉眼で見られるものではなく、何らかの染色による可視化が必要である。選択肢としては、CLEAR STAIN Blue (ニッポンジーン) やViewaBlue Stain KANTO (関東化学) のような非蛍光染色液もある。これらはイルミネーターのような検出装置を必要としない利点がある。つまり染色して脱色すればそのまま観察できる。ただし一般的には感度が低く、染色・脱色に時間がかかるので、増幅量が少ない場合でもなんとか成功裏に収めたい生徒・学生実験では不向きだと思われる。蛍光染色液としては、従来はエチジウムブロマイド (EtBr) が用いられていたが、発がん性もあり、またDNAに損傷を与える (ゲルを切り出してDNAを回収して用いる際に問題となる) ために大学のラボでも近年ではあまり使われなくなった。代わりに広く使われるようになったのが、SYBR Greenなどの青緑色で励起する試薬である。私は比較的安価なAtlas ClearSight (BIOATLAS, フナコシで購入) を用いている。1 mL約1万円で、30 mLゲルに2 μ L程度用いるので、ゲル500枚分程度に相当する。この染色液も自作イルミネーターで観察可能だが、励起波長のスペクトルが青色領域を広くカバーしている FluoroVue (SMOBIO, コスモ・バイオで購入) でも非常によい結果が得られる。また、GRG-100 (バイオクラフト) で

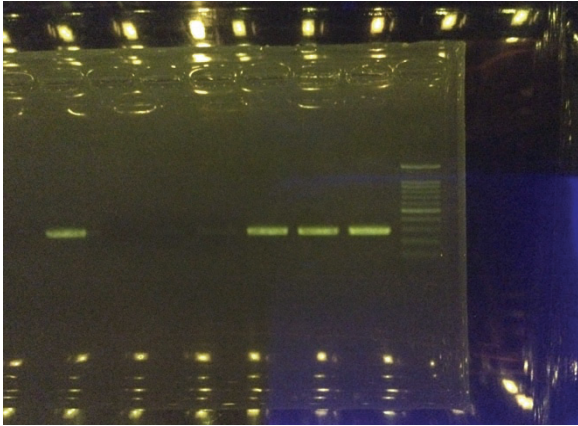


図5 自作イルミネーター(図3b)を用いて撮影した電気泳動像。ゲルの一部にLEDが写り込んでいるが、ゲルとイルミネーターの距離を離すことで改善できると思われる。

もよい結果が得られた(図5)。

3.8. PCRキット：何を重視するかを考えて検討すべき

各社からそれぞれ複数のキットが売られており、選択に困るのがPCRキットではないだろうか？メーカーのHPにも、何が重要視されるかで異なるキットを勧めているため、経験が少ないとかえってわかりにくい。価格はもちろんであるが、生徒実験を考えた場合の優先順位を考えると、以下のように提案できる。

1. **Ready Mix タイプ**：PCR 調製のステップが少ない。ただし教員が PCR 反応液を調製するならあまり関係ないかもしれない。
2. **着色あり**：ローディングバッファーが反応液にあらかじめ入っているかどうかで、入っていれば電気泳動時にバッファーを加える手間と時間が省ける。また、視認性が高いので、シリンジピペットでは調製量を確認する上でも都合がよい。
3. **クルードサンプル(粗精製のサンプル) 対応**：鋳型 DNA を精製しない場合は必須であるし、そうでなくても生徒実験では鋳型 DNA の状態はまちまちであるため、阻害因子に強いものがよいと思われる。
4. **ホットスタート対応**：これは高温を経験するまで DNA ポリメラーゼ活性が生じないもので、目的以外の領域の増幅が抑えられる。
5. **増幅効率**：経験的には学生実験では(理由は不明であるが)増幅量が少ないことがしばしばあるので、増幅効率が高いことを謳ったキットの方が望ましいと思われる。
6. **伸長時間**：最近は増幅速度が速いキットもみられる。20年ほど前は1 kb 伸長させるのに1分と

というのが目安であったが、最近は1秒というものもある。連続のコマで実験を続ける場合や、あるいはサーマルサイクラーを用いないPCRを行う場合には、伸長時間(あるいはアニーリング時間も含め)が短くてもよいことを謳ったものがよい。

上記をすべて満たすものとして、筆者は普段のラボ実験では東洋紡のKOD One PCR Master Mix / Blue (KOD Oneと略す；キャンペーン時で約23000円)を用いている。後述する調製で50班分である。また、学生実習ではKAPA2G Fast HS ReadyMix with dye (KAPAと略す、日本ジェネティクスで購入)を用いている。後者はクルードサンプル用とは明記されていないが、粗抽出でも問題なく増幅がみられ、かつ安価である(キャンペーン時で6600円；25班分)。ただし、私も多くを比較したわけではなく、さらに新商品も次々出てくるので、今後も比較検討の余地はあるだろう。

3.9. 制限酵素：反応速度が速くそのまま電気泳動できるものがよい

最近販売されるようになった制限酵素には、基本的にこれまで1時間以上の時間をかけていた反応を15分程度で行うことを謳ったものが複数の会社から販売されている。反応後に電気泳動を行うことを考慮すると、反応液にローディングバッファーが含まれている(着色あり)のものが便利である。その観点からは、理科研から販売されているSpeedCut Enzymeシリーズが比較的安価で良いと思われる。他にはサーモフィッシュャーサイエンティフィック社のFastDigestシリーズも、同様にローディングバッファーを含む短時間タイプである。ただし、必要とする制限酵素がどのシリーズにも含まれているというわけではない。

4. 実験のステップ

4.1. DNA精製：なるべく簡略化する

夾雑物やタンパク質、脂質、多糖類等を除去するDNA精製は、以前はPCR前に行うことが必須とされていたため、必ず行うものと思っている人は多い。研究業界では、QiagenのDNeasy Blood & Tissue Kitを用いて純度の高いDNAを得る方法をよくみかける。

しかし、近年はバッファー等の改良により、阻害因子があってもDNAポリメラーゼ活性が保持されるキットが発売されている。従って以下のような選択肢を採ることができる。

表1 マイクロピペットの代替物を利用する際の反応液調製.

組成および手順	案1：シリンジピペット利用		案2：プチペット利用	
	調製法	1 反応液 あたりの量	調製法	1 反応液 あたりの量
水 (精製水等)	60 (= 50 + 10) μ L	6.7 μ L	—	—
10 μ M プライマー 1	10 μ L	1.1 μ L	10 μ L	1.25 μ L
10 μ M プライマー 2	10 μ L	1.1 μ L	10 μ L	1.25 μ L
ReadyMix (MasterMix)	100 μ L	11.1 μ L	100 (25を4回) μ L	12.5 μ L
手順	上記を順に1.5 mLチューブに加え て混ぜ、8連チューブに20 (= 10 + 10) μ Lずつとりわけた後、各チュー ブに鑄型DNAを2 μ L入れる。		上記を順に1.5 mLチューブに加え て混ぜ、8連チューブに15 μ Lずつ とりわけた後、各チューブに鑄型 DNAを10 μ L入れる。	

4. 1. 1. 試料をそのまま反応液に入れる

「クルードサンプル対応」のPCRキットが各社から販売されており、生物試料（例えば毛根や植物葉片）をそのまま入れて鑄型DNAとすることが可能である。例えば、イネの場合は米粒をやすりで削ったものを鑄型として使う方法が高校教科書でも紹介されている（吉里ほか 2020）。また、学生実験の経験でも、小麦粉や片栗粉を爪楊枝の先につけ、先を洗うようにPCR反応液に入れて少し振ったところ、KOD Oneでは問題なく増幅された。また東洋紡から販売されているKOD FX (KOD Oneでも確認済み) を用いて髪の毛の毛根をPCR反応液に入れたままでPCR増幅が可能である（林田ほか 2010）。一方で、多くの針葉樹などは、夾雑物の除去なしでは増幅は困難らしく（花岡・福田 2020）、材料に依りけりである。この方法の欠点があるとすれば、PCRキットの中では比較的高価なクルードサンプル対応のものを使う必要があることと、同一の鑄型DNAから複数のPCR反応が行えないことである。ただし、DNA精製ステップの省略は、時間の短縮だけでなく、失敗しうるステップを減らすことにもなる。

4. 1. 2. 粗抽出を行う

HotSHOT法（アルカリ法）やキレックス法（三浦 2010）、ワンステップ法（植物の場合）などが知られている（https://lifescience.toyobo.co.jp/embodiment/detail.php?embodiment_id=141）。この中ではキレックス法以外は20分程度の作業である。これらの場合は、溶液の一部を鑄型として用いるため、複数のPCR反応に同一の鑄型を用いることが可能である。私のラボの場合は、ラボ実験ではHotSHOT法やワンステップ法を多用している。学生実験では葉を潰した汁をチップの先に付着させる、ということも行っており、これだと1分もかからない（三宅・大井 2020）。ただし、これらの粗抽出法はクルードサンプル対応キット（例えばKOD One）ではあまり問題ないと思われるが、他

のキットでは予備的に確かめる必要があるだろう。

4. 1. 3. 教科書にある方法で行う

生物基礎などの教科書に載っている洗剤や食塩を用いるDNA精製法は割と純度の高いDNAが得られ、一般的なPCRの鑄型としては十分機能する（伊左治・松本 2005）。学生実験では、教科書に掲載されている実験を経験する必要もあることから、この方法でのDNA精製を行った後にPCRの鑄型として用いている。ただし、析出させたDNAを吸い出した後に液体を極力取り除いてエタノールを揮発させ（約20分）、その後水に溶解させている（約1時間）ため、時間の節約にはならない。

4. 2. シリンジピペットやプチペットを用いたPCR反応液調製

前述したシリンジピペットでは、目盛のついたチップを用いる。その際、一般的には2, 5, 10, 50, 100 μ Lあたりに目盛が振られていることが多いので、それに合わせて定量が可能である。またプチペットでは10, 15, 25 μ Lで定量できる。そこで、表1のような調製が提案できる。これは前述のKOD OneでもKapaでも同様である。シリンジピペットでは、反応液が余ることになるが、実際には定量が厳密でないこともあり、これくらいがちょうどよい。陽性コントロールと陰性コントロールで各1反応行うとして、6人班に向いている。反応液の混合量比はメーカーのプロトコルとは若干異なるが、毎年学部1年生向けの学生実験で行っており、問題なく増幅する。学生が失敗する要因として大きいのは、むしろ微量の鑄型DNAを加えるステップだと思われる。研究室レベルでは鑄型DNAは0.5~1.0 μ Lという微量で操作するが、やはり不慣れな学生にはここが難しいと思われる。まとめて反応液を作って分注しているにも関わらず、チューブによっては増幅がみられなかったりするのはそのためであろう（鑄型

表2 PCRのプログラムの例.

ステップ	温度	時間	回数
(1) 最初の変性	①95°C	②3分	1
(2) 変性	③95°C	④10秒	⑨35
アニーリング	⑤60°C	⑥10秒	
伸長	⑦72°C	⑧15秒	
(3) 最終の伸長	72°C	1分	1

DNAの調製も別々に行っているため、調製時の問題の可能性も否定できない)。そのためもあり、プチベットを用いた方法では、まとめて作る反応液に水を加えず、代わりに鋳型DNAを10 μ L加えている。これは加える鋳型DNAをあらかじめ5倍希釈していれば、加えるDNA量は変わらない。実際には許容される鋳型DNA量の範囲はかなり広いので、5倍というも目分量で全く問題ない。

なお、ReadyMix (あるいはMasterMix) はピペット操作によるロスを避けるためにも、あらかじめ教員が班ごとに分注しておくのが無難であり、その場合は生徒・学生が量り取る必要はないかもしれない。

4.3. PCRの設定方法

サーマルサイクラーでPCRを行う場合は、サイクル前およびサイクル中の高温保持の設定(表2①~④)はメーカー推奨の通り行うのがよい。酵素の高温耐性や特性(一定時間の高温下で活性を持つようなホットスタートタイプ)などに依存するからである。アニーリングの温度と時間(表2⑤と⑥)は、先行報告での条件を参考にすれば良いが、メーカーが短時間(例えば5秒)を推奨しているなら試す価値はある。また、伸長温度(表2⑦)は酵素に依存するのでメーカーの推奨通りが良い。伸長時間(表2⑧)もメーカーの推奨時間通りで十分であることが多く、最近では1 kb以下は1秒とか5秒といった伸長速度の速いものが多い。例えば、植物の葉の汁を鋳型DNAとしてKOD OneでrbcLの300 bp弱を増幅させた学生実験では、94°C1分→[98°C10秒→58°C5秒→68°C1秒]×35というプログラムで行い、所要時間は1時間かからなかった(三宅・大井 2020)。生徒実験では結果が明瞭である方が望ましいため、サイクル数(表2⑨)は35~40回くらいに設定した方がよい。最終の伸長反応は、キットによってはそもそも省略されているが、この後の作業が制限酵素処理や電気泳動という場合は省略しても問題はない。

なお、大学のラボではPCRを2ステップ(アニーリングと伸長反応を同時に行う)という手法で時間短縮を図ることも多いが、生物教科書でのPCRの原理の説

明は一般的に3ステップであることもあり、混乱をまねく恐れがあるためここでは紹介しない。

4.4. 電気泳動での簡略化

先に「着色あり」と表現したローディングバッファの入っているPCRキットや制限酵素を用いることで、バッファを混ぜる時間が短縮される。また、先染めを行うことで、染色および脱色の時間が短縮される。ただし、マイクロピペット操作で最も失敗しがちなのは、このウェルに注入するステップではないかと思われる。ここに関しては、練習用のゲルを用意するなどして、あらかじめ注入の練習をするなどの工夫が必要だと思われる。

5. おわりに

本稿では、免許状更新講習などの経験や高校教員へのアンケート(向陽ほか 2020)から、PCR実験を行う上で高校教員が必要としていると思われる情報を挙げてみた。本稿の最後に、本稿で取り上げた販売会社のウェブサイト情報を挙げたので参照していただきたい。

6. 引用文献

- Ens, S., Olson, A. B., Dudley, C., Ross, N. D., Siddiqi, A. A., Umoh, K. M., & Schneegurt, M. A. (2012) Laboratory exercises inexpensive and safe DNA gel electrophoresis using household materials. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 40: 198-203.
- 花岡創・福田陽子(2020)カラマツ類の葉から簡便かつ迅速にDNAを抽出する手法. *北方森林研究* 68: 39-41.
- 林田真梨子・小泉(岩尾)恭子・村田成範・木下健司(2010)遺伝子診断教育のための簡便な耳垢型遺伝子多型解析法. *分析化学* 59: 613-617.
- 向陽康人・山本将也・笠原恵(2020)兵庫県高等学校における分子生物学実験の実態に関する一考察: アンケート結果から見たこと. *兵庫教育大学学校教育学研究* 33: 121-128.
- 井上陽子・谷口泰史(2018)遺伝子を活用する能力を向上させるための高等学校「生物基礎」における遺伝子実験の試み. *兵庫教育大学教育実践学論集* 19: 197-209.
- 伊左治錦司・松本省吾(2005)高等学校におけるDNA簡易抽出実験に関する教材開発. *岐阜大学教育学部研究報告教育実践研究* 7: 69-78.

- 株式会社リーゾ (2009) 手作りの「プレート遠心機」.
<http://rizo-inc.cocolog-nifty.com/blog/2009/08/post-a66f.html> (2022.1.3 確認)
- 熊谷篤 (2019) 高等学校生物「遺伝子とその働き」における観察・実験に関する研究—遺伝子を扱う教材・教具の開発と活用方法の構築を通して—. 岩手県立総合教育センター教育研究 174: 15–16.
- 倉林正・武村政春 (2017) 簡単に安価な電気泳動装置の開発による実践的な電気泳動実験. 生物教育 58: 114–121.
- LATB Staff (2015) プレート用遠心機がなくても大丈夫! 96穴プレートをスピンドウンできる意外なアイテム. <https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/salad-spinner-centrifuge/> (2022.1.3 確認)
- 大井真菜・水口智人・夏厩悠斗・小川唯菜・三宅崇 (2019) 高等学校生物における安価かつ簡易的なPCR実験法の開発. 生物教育 61: 23–30.
- 三浦一芸 (2010) 昆虫類やダニ類からのDNA抽出とPCRの実践. 植物防疫 64: 620–625.
- 三宅崇・大井真菜 (2020) 受講者が立案するPCR-RFLP実験教材の開発. 生物教育 61: 96–104.
- 文部科学省 (2009) 高等学校学習指導要領解説 理科編. https://www.mext.go.jp/component/a_menu/education/micro_detail/_icsFiles/afieldfile/2010/01/29/1282000_6.pdf (2022.1.3 確認)
- 村田茂穂 (2016) 時間と研究費にやさしいエコ実験. 羊土社.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
- 斎藤淳一 (1995) PCR法をとりいれた教材開発—遺伝子語を体験的に解決する方法の試み—. 生物教育 35: 61–62.
- 笹川由紀・小野道之 (2008) 遺伝子リテラシー教育における高等学校等での教育目的遺伝子組換え実験の普及と教材キットの有効性について. 科学教育研究 32: 216–229.
- 嶋田正和 他22名 (2020) 改訂版生物. 数研出版. 平成29年検定.
- 園山博・渥美茂明 (2018) ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法におけるプライマーの働きの理解を目的とした生物授業の実践. 生物教育 59: 158–166.
- 杉村順夫・尾山廣・森本弘一 (2015) 手動ポリメラーゼ連鎖反応法によるカイコの雌雄判別. 生物教育 56: 29–35.
- 薄井芳奈 (2013) 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. サイエンスネット 46: 6–9.
- 吉里勝利 他20名 (2020) 高等学校改訂生物. 第一学習社. 平成29年検定.

7. 付録：入手先に関するウェブページ

7.1. 試薬・消耗品

- 東洋紡：<https://www.toyobo.co.jp/>
- ニッポンジーン：<https://www.nippongene.com/>
- 日本ジェネティクス：<https://www.n-genetics.com/>
- ワトソン：<https://www.watson.co.jp/>
- コスモ・バイオ：<https://www.cosmobio.co.jp/>
- フナコシ：<https://www.funakoshi.co.jp/>
- サーモフィッシャーサイエンティフィック：<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home.html>
- バイオクラフト：<http://www.bio-craft.co.jp/>
- 理科研：<https://www.rikaken.co.jp/>

7.2. プライマー合成委託

- Integrated DNA Technologies (IDT)：<https://sg.idtdna.com/pages>
- ファスマック：<http://fasmac.co.jp/>
- ユーロフィンジェノミクス：<https://eurofinsgenomics.jp/>
- サーモフィッシャーサイエンティフィック (前掲)

