

高校生物教科書にみられる簡易DNA抽出法に市販中性洗剤と塩が与える影響

Effects of commercial detergents and salts on a simple DNA extraction method in high school biology textbooks.

本田 薫・三宅 崇・吉松三博・古屋康則

Kaoru Honda, Takashi Miyake, Mitsuhiro Yoshimatsu and Yasunori Koya

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 岐阜大学教育学部 理科教育

TEL:058-293-2255 (email: koya@gifu-u.ac.jp)

要 約

学習指導要領改訂により、中学校で遺伝子について学習するようになり、DNAについても言及することとなった。そのため、高等学校と同様に中学校においても、発展学習としてDNA抽出実験を行う機会が増えていくかも知れない。高等学校の生物では簡易DNA抽出実験が用いられており、多くの先行研究もある。今回我々が予備的に先行研究に示された方法でDNA抽出実験を行ったところ、期待される結果が得られなかった。本研究では、簡易DNA抽出実験において塩と中性洗剤が実験結果にどのような影響を与えるのかを検証した。

【キーワード】簡易DNA抽出実験、中性洗剤、食塩、除菌

1. はじめに

近年、「遺伝子組み換え食品」や「DNA鑑定」、「ゲノム解読」等の言葉が広く認知されるようになり、今や遺伝子やDNAに関する理解は科学リテラシーの一要素と言える。さらに、学習指導要領の改訂により、遺伝子に関する項目が「遺伝の規則性と遺伝子」として中学校理科第2分野に盛り込まれ、遺伝子の本体がDNAであることも扱うようになった。これまで、高等学校の生物教科書では、遺伝子を学習する分野の発展学習として、DNAを抽出する実験が紹介されていた。今後、中学校理科においても、発展学習としてDNA抽出を扱うようになるかも知れない。

大学を含む研究機関では、DNA抽出は分子遺伝学や集団遺伝学、分子進化学などの研究を行う上で日常的に行われる作業であるが、効率や精製の点から、多くの場合遠心分離作業を伴う。中学校や高等学校では、遠心分離機は一般的ではないため、DNA抽出実験を行う際には、「簡易DNA抽出法」が用いられる場合が多いであろう。この方法は、遠心分離作業を伴わず、析出したDNAを容易に目視でき、ガラス棒などで回

収することで抽出を実感することができる点で優れている。研究機関では、DNA抽出はその後の実験のために行う最初のステップに過ぎないが、中学校や高等学校の場合は抽出したDNAを目視することで完結することが多く、その目的であれば簡易DNA抽出法は十分であると言える。また、簡易DNA抽出法に必要な材料が、多くの家庭に備わっているものだけでできることも利点であり、ウェブサイト上でも「家庭でできるDNA抽出」としていくつものサイトで紹介されている(たとえば「くらしとバイオプラザ21」[<http://www.life-bio.or.jp/>])内の「バイオ基礎教室」)。

簡易DNA抽出法に必要な“試薬”は、中性洗剤、食塩、およびアルコール(エタノールまたはイソプロパノール)である。中性洗剤は、細胞の細胞膜や核膜の脂質を破壊する作用がある。食塩は、DNAとタンパク質の結合を切る作用がある。また、DNAはエタノール(あるいはイソプロパノール)には溶解せず、とりわけ高塩濃度下では析出しやすい。細胞の破壊、タンパク質の分離、そしてDNAの析出というステップは、

基本的には研究機関で行うDNA抽出法と同じである。

今回の研究に先立ち、2つの簡易DNA抽出法(中村, 2005; 矢野, 2005)を参考に抽出を試みたところ、予想外にいずれも失敗した。手順には誤りがなかったため、用いた“試薬”に問題があると考えられた。この時用いたものは、中性洗剤としては除菌効果のある食器用洗剤、塩としてはうま味成分の入った塩であった。そこで、これらが実験にどのように影響しているのかを調べるために、いくつかの中性洗剤(除菌効果をうたっているものを複数含む)と、うまみ成分を含む塩と含まない塩を用いて実験結果を比較した。以下に示す実験Ⅰと実験Ⅱでは、異なる抽出方法を参考とした。これは、当初方法Ⅰで抽出を試みていたところ、抽出がうまくいかなかったために、途中から方法Ⅱを採用したためである。用いる“試薬”を再検討した後、安定してDNA抽出が行えるようになったため、方法Ⅱにより実験Ⅱを行った。その後、うま味成分を含む塩が抽出に影響を与えていたかどうかを確認するために、方法Ⅰを用いて実験Ⅰを行った。

2. 材料および方法

○方法Ⅰ：中村(2005)を改良した方法

- ①タマネギ(50 g)を小さくみじん切りし、どんぶり茶碗に入れた。
- ②三角フラスコの中に大さじ1/2杯(7.5 ml)の食器用洗剤を入れた。
- ③②に小さじ1/2杯(2.5 ml)の食塩を入れた。
- ④③に水道水100 mlを加えてよく混ぜ、抽出液とした。
- ⑤みじん切りしたタマネギの入ったどんぶり茶碗に④の抽出液を入れ、よく混合した。
- ⑥500 Wの電子レンジを用い、1分間加熱した。
- ⑦スプーンを用いてタマネギをどんぶり茶碗の側壁に押さえつけるようにしてすりつぶした。30分間入念につぶした。
- ⑧⑦のタマネギ抽出液を茶こしあみで濾し、濾液10 mlをスクリュウ瓶に入れた。
- ⑨⑧に20 mlのイソプロパノールを静かに注ぎ込んだ。

⑩しばらくそのまま放置した後に、蓋をして傾けることによって抽出液とイソプロパノールをゆっくり混ぜた。

○方法Ⅱ：矢野(2005)を改良した方法

- ①三角フラスコに食塩15 g、蒸留水140 mlを加えよく混ぜた。そこへ、中性洗剤を10 ml加えてよく混ぜ、抽出液とした。
- ②冷凍ブロッコリー花芽約10 gを乳鉢でよくすりつぶした。
- ③②に①の抽出液を20 ml注ぎ、10分間放置した。
- ④③をろ過し、スクリュウ瓶に入れた。
- ⑤あらかじめ冷蔵庫で冷やしておいたエタノールを、ガラス棒を使って④にゆっくり20 ml入れた。
- ⑥10分間静置した。

いずれの方法でも、白い固形物が現れた場合にDNAが析出されたと判断した。白い固形物がDNAであることを確認するために、これをガラス棒で回収してシャーレに入れ、酢酸オルセインで染色して実体顕微鏡下で観察した。

3. 実験

○実験Ⅰ

“食塩”として食塩(財団法人塩事業センター、原料は海水、塩化ナトリウムは99%以上)、またはアジシオ(味の素、原料は海水とグルタミン酸ナトリウム、塩化ナトリウムは92%)のいずれか一方を用いて、方法Ⅰに従いDNA抽出を行った。中性洗剤としては、除菌効果をうたっていないKソフト(コープクリーン)を用いた。

○実験Ⅱ

“中性洗剤”として、除菌効果をうたっている食器用洗剤3種[キュキュット(花王)、ジョイW除菌(P&G)、チャーミーVクイック(ライオン)]と除菌効果をうたっていない食器用洗剤3種[Kソフト(コープクリーン)、チャーミーグリーン(ライオン)、ジョイ(P&G)]のいずれか1つを用いて、方法Ⅱに従いDNA抽出を行った。食塩には財団法人塩事業センターのものを

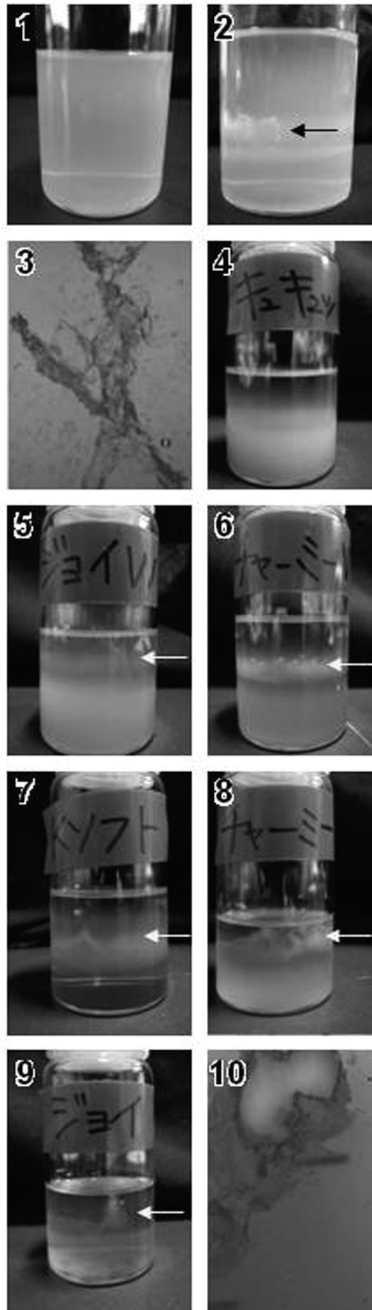


図 1-10. DNA抽出実験におけるアルコール添加後の様子 (1, 2, 4-9) と酢酸オルセインによる析出DNAの染色像 (3, 10). 黒矢印および白矢印は析出したDNAを示す. アジシオを用いたDNA抽出 (実験 I) ではDNAの析出はみられなかった (1). 食塩を用いたDNA抽出 (実験 I) で析出したDNA (2) は酢酸オルセインで染色された (3). 除菌効果をうたった食器用洗剤を用いたDNA抽出では、キュキュットを用いた場合はDNA析出がみられなかった (4) が、チャーミーV (5)、ジョイW除菌 (6) ではDNA析出がみられた. 除菌効果をうたっていない食器用洗剤を用いた場合、すべてでDNA析出がみられた [Kソフト; (7), チャーミーV; (8), ジョイ; (9)]. 析出したDNAは酢酸オルセインで染色された [(10), チャーミーVを用いたDNA抽出での析出物].

用いた.

4. 結果

○実験 I

アジシオを用いた場合には、析出物は確認できなかった (図 1). 一方で食塩 (塩化ナトリウム 99%以上) を用いた場合には、DNAの析出がみられた (図 2). この析出物を酢酸オルセインで染色したところ、明瞭に染色された (図 3).

○実験 II

キュキュットを用いた場合には、DNAの析出が確認できなかったが、キュキュット以外の除菌効果をうたっている食器用洗剤を用いた場合には、DNAが析出した (図 4-6). 除菌効果をうたっていない食器用洗剤を用いた場合には、すべてにおいてDNAが析出した (図 7-9).

抽出物を酢酸オルセインで染色したところ、抽出物が染色されていることを確認することができた (図10).

5. 考察

実験 I では、食塩の代わりにアジシオを用いた場合にはDNAの析出がみられなくなることを明瞭に示すことができた. アジシオに含まれるグルタミン酸ナトリウムが影響しているかどうかは、食塩として用いる塩化ナトリウムに、実験的にグルタミン酸ナトリウムを添加することで調べることができるであろう. このように、家庭にあるものを使ってDNA抽出実験が行えるとはいえ、様々な製品が複数の物質の混合物として売られており、含まれる微量成分が結果に影響を与える可能性があることに注意する必要がある.

このことは、家庭用洗剤でも同様であった. 実験 II の結果では、除菌効果をうたっている一部の家庭用洗剤でDNA析出がみられなかった. ただし、除菌効果をうたっている家庭用洗剤でも多くの場合DNA析出を確認することができたため、除菌効果の有無そのものが原因とは言えない.

以下に、本研究に用いた除菌効果をうたった食器用洗剤の成分表示を示す.

・キュキュット (花王)

界面活性剤 [45%高級アルコール系 (陰イオン), アルキルヒドロキシスルホベタイン, アルキルアミノキシド, アルキルグリコシド, アルキルグリセリエーテル], 安定化剤, 除菌剤

・チャーミーVクイック (ライオン)

界面活性剤 (30%アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム, アルキルスルホン酸ナトリウム, アルキルアミノキシド, ポリオキシエチレン脂肪酸アルカノールアミド), 安定化剤

・ジョイW除菌 (P&G)

界面活性剤 (35%アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム, アルキルアミノキシド, ポリオキシエチレンアルキルエーテル), 安定化剤

これらを比較すると, DNA抽出を阻害したキュキュットに特異的な表示成分は, アルキルヒドロキシスルホベタインと除菌剤である。アルキルヒドロキシスルホベタインは, アルキルアミノキシドと同様の両性界面活性剤である。「除菌剤」は, 花王に問い合わせても具体的な成分については知ることができなかった。東京都消費生活総合センターの調査 (「くらしの安全情報サイト」内「商品テスト」の「『スポンジ除菌』のできる台所用洗剤」, [http://www.anzen.](http://www.anzen.metro.tokyo.jp/tocho/s_test/pdf/jyokin/jyokin.pdf)

metro.tokyo.jp/tocho/s_test/pdf/jyokin/jyokin.pdf) によると, 食器用洗剤の除菌成分としてはエタノール, 安息香酸ナトリウム, ヒノキチオールなど, メーカーにより様々であった。

本研究では, 仕組みは明らかにできなかったが, 市販されているものにはなんらかのDNA抽出阻害成分が含まれることがあり, 中学校・高等学校などでの実験に先立ち留意する必要があることを示すことができた。また, 簡易的なDNA抽出法を報告・普及する際にも, 用いた“試薬”の製品名や規格などを明記する必要がある。日常生活では, うまみや除菌効果といった付加的要素が商品価値を高め, 消費者としてありがたいことも多いが, 本研究のように思わぬ落とし穴につながることもあるので十分な注意が必要である。

6. 参考文献

- 中村宗一郎. 2005. タマネギからDNAを抽出して食べてみよう. 遺伝, 別冊18: 149-150.
- 矢野幸洋. 2005. 中等教育学校におけるバイオ実験についての一考察. 奈良女子大学附属中等教育学校研究紀要, 46: 87-94.