



### 教員向け理科自主研修会 「人カサーマルサイクラー」

講師 静岡大学工学部 大橋 和義 先生

令和7年8月8日(金)9:00~12:00、トップガン教員向け理科自主研修会「人カサーマルサイクラー—手動式PCRでDNAを増幅してみよう—」講座が、静岡大学浜松キャンパス生物実験室にて行われました。受講者は、高校の先生2名、中学の先生3名、その他1名、計6名でした。講師の先生は、静岡大学工学部 大橋 和義 先生でした。

#### 講座

#### 概要

PCR法(ポリメラーゼ連鎖反応: Polymerase Chain Reaction)は自然界のDNA複製を実験室で特定の遺伝子配列を人工的に増幅させたもので、わずか2時間程度で目的とするDNA断片の数を数百万倍に増幅する技術です。開発者のキャリー・マリス(米国)は1993年にノーベル化学賞を受賞しました。この技術は昨今のバイオサイエンス研究において不可欠な技術となっています。

「遺伝子」の分野は生命科学の急速な発展に対応し、新課程の教科の中にも組み入れられているが、実験実習となると装置等種々の問題があり組み込めないのが現実です。

PCRは新型コロナウイルスの影響で言葉だけが先に社会的に認知されてしまい「PCR=新型コロナウイルスの検査」という間違った認識も多くあります。

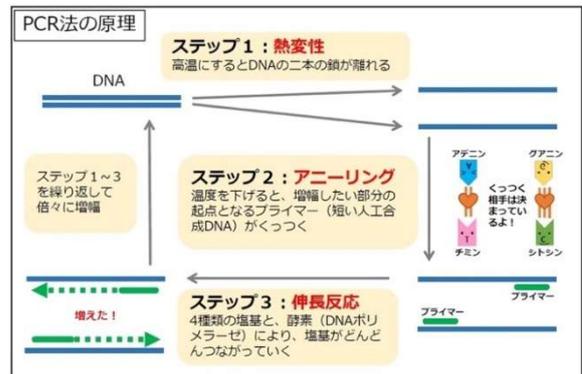
そこで、試料として納豆から直接サンプルを得、専用の装置であるサーマルサイクラーを使用しない手動でPCRを体験することで簡便かつ高価な装置が無くてもPCR法の原理を実感を持って理解できる機会となることが期待できます。

#### PCR ( Polymerase Chain Reaction )

PCR法では、はじめに熱を加えて増幅したいDNAを1重鎖にします。いったん温度を下げ、2本の1重鎖に人工的に作ったプライマー(対)を結合させます。その後再び温度を上げて、DNAポリメラーゼ酵素によってプライマーの部分からDNA塩基配列を構築していきます。DNA鎖の熱変性、プライマーのアニーリング、ポリメラーゼによる相補鎖の合成これを繰り返す。

返すことでプライマー対間の DNA 塩基配列が大量に得られます。サイクルごとに DNA が2倍、4倍、8倍・・・と指数関数的に増幅します。この方法を用いると、DNA を数時間で100万倍に増幅できます。

通常の DNA ポリメラーゼは熱に弱く、2重鎖を1重鎖にする温度（約90℃）では変性してしまいますが、温泉に生息する細菌から採られた DNA ポリメラーゼを基にして耐熱性 DNA ポリメラーゼ酵素が開発され、これを用いることにより、温度を繰り返し上昇させながら DNA の増幅が可能になりました。

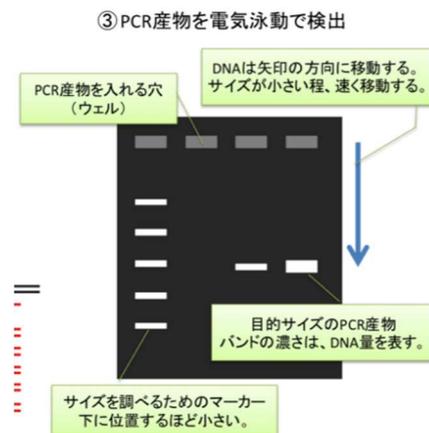


### 電気泳動法による DNA の解析

DNA 断片は、リン酸が負(-)の電荷を持つため、陽極(+)と陰極(-)のある装置内に置くと陽極(+)側に引かれて移動していきます。これを電気泳動と言います。

DNA 断片はゲル内に置かれ、移動の際、アガロースゲルは細かい網目状の構造となっているのでゲルと DNA の間の抵抗力が働きます。抵抗力は DNA が大きくなるほど大きくなるため、移動速度（ある時間内の移動距離）は DNA の大きくなるほど小さくなります。その結果、ある時間後には DNA サイズに応じた移動距離に DNA の帯が観察されます。

電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色すると、紫外線照射により DNA をバンドとして可視化することができる。今実験では、発ガン性のあるエチジウムブロマイドは使用せず青色 LED で反応する色素を使用します。



### 実験方法

1. ウォーターバスを 98℃、55℃、68℃で準備しておく。
2. 市販納豆の表面の粘物質（糸）を爪楊枝で少量採取する。（右下図参照）
3. 100 μl の滅菌水の入ったマイクロチューブに懸濁する。（ボルテックスミキサー）
4. 3 で懸濁した溶液2 μl と調整済みの PCR 試薬を PCR チューブに加える。

サーマルサイクラー用と手動の 2 本に分注（手動の方は割り箸で挟み込む右図参照）



チューブの固定

(PreMix の組成は以下の表)

PCR Pre Mix の組成 (1 反応分)	
滅菌水	20 $\mu$ l
Primer F、R	3 $\mu$ l
Buffer+酵素	25 $\mu$ l
Template	2 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l / 反応

調整済

5. PCR チューブに試薬を分注する
  - a) サーマルサイクラーにセット
  - b) 各温度で指定時間反応させる
6. 5-a)をサーマルサイクラーにセットする

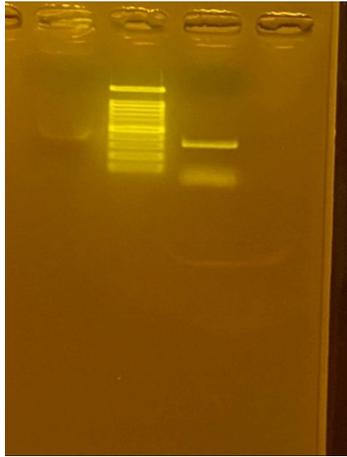
PCR 条件	
98°C	30 秒
98°C	10 秒
55°C	5 秒
68°C	1 秒
72°C	3 分

25 サイクル

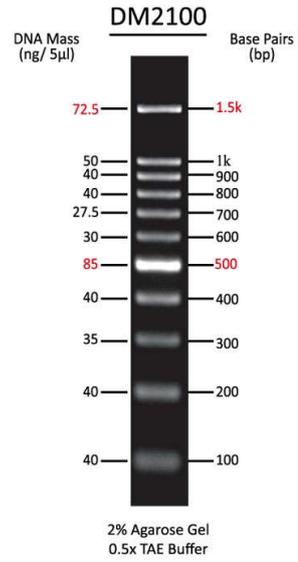
7. 5-b)を異なる温度のウォーターバスで温度変化を与える (PCR 条件)  
25 サイクル程度反応させる (増減可)
  - ・98°Cのウォーターバスは、火傷に注意しながらなるべくヒーター部近傍で
  - ・チューブの蓋部から水が入らないように注意
  - ・反応時間の多少のずれはあまり問題ない
8. 反応後、PCR 産物 (5-a, 5-b) 3.の PCR 前の溶液 3 本それぞれ 10  $\mu$ l を新しいチューブに分注し 4  $\mu$ l の Loading Buffer を加えピペッティングで混合する。スピンドウンして、3 分静置する。
9. 2%アガロースゲルを電気泳動槽にセットする (-極側にウェルが来るように)
10. ゲルが浸る程度に TAE バッファーを満たす
11. ウェルに 10  $\mu$ l アプライする。(サイズマーカーも同量アプライする)
12. 電気泳動する。(約 30 分間、増幅確認だけであれば 15 分でも可)
13. 泳動終了後、ゲルを取り出し LED イルミネーターで観察する。

余裕があれば・・・

14. バンドと移動距離の関係から、検量線を作成し (片対数グラフ) 実際に増幅した DNA サイズを調べてみましょう

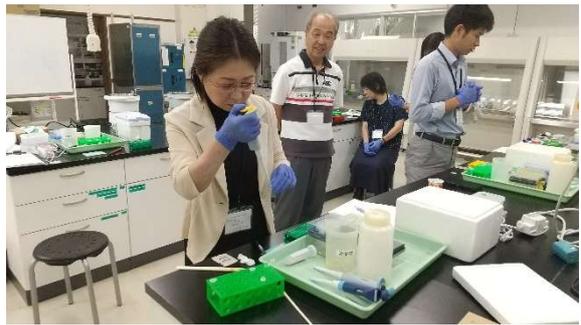
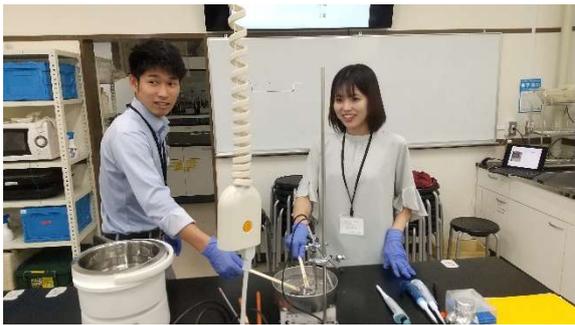
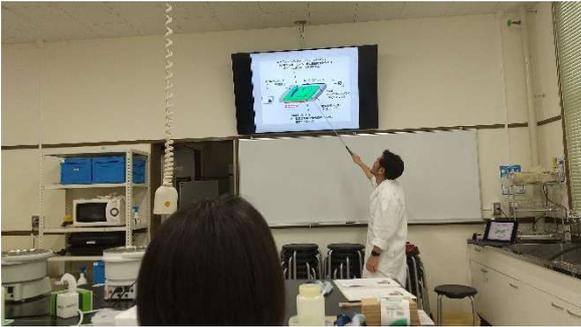


結果の一例



今回使用したサイズマーカー

講座の様子



## 受講生の感想

先日はありがとうございました。

PCR サーマルサイクラーを用いずに、DNAの増幅を行う実験を通して、その原理などをアナログ的に知ることができ、貴重な体験をすることができました。研究機関や大学などでは、最新の設備・機器を用いて実験を行うことが多いと思います。

しかしながら、高校の教育現場では、そのようなものは予算的に手に入りません。また、それらの機器の原理も分からずに、結果だけを求めてしまうのが現状です。化学や生物など理科教育においては、アナログ的な実験を通して理解したうえで、大学等にある機器を用いて研究することが大切だと感じました。

今回の実験を通して感じたことを、科学系の進学を目指す生徒たちに伝えていきたいと思います。

P S. 河川水中の DNA の増幅による生物調査、およびヒトのアルコール分解酵素に関する遺伝子の相違などの実験を通して、生徒に生物学の面白さ、生物の多様性などを教えたいと思います。機会がありましたら、ご協力をお願いできればうれしく思います。

(静岡県立浜松湖東高等学校 伊藤 誠二)

今回の手動 PCR はマシンを必要とせず授業で扱いやすいというえ、サイクルを体現することができ、導入のハードルを下げることができると感じました。電気泳動の結果はマシンを使用した方が精度が高いと感じましたが、高校の実験では体験することが優先するので、手動 PCR はよろしいと思いました。

大橋先生には、毎回大変参考になる実験をご教授していただき、感謝申し上げます

(静岡県立浜名高等学校 岩本 直子)

中学校で実施するには難しいかと思いましたが、授業で話ができることが増えればと思い参加しました。また機会があればお願いしたいと思っています。

ありがとうございました。

(浜松市立高台中学校 豊田 のり子)