

PCR の教材化の検討と授業マニュアルの作成

PCR optimization and manualization for student experiments

高橋 悠斗¹⁾・小長谷 幸史^{1,2)}

¹⁾新潟薬科大学応用生命科学部, ²⁾新潟県立栃尾高等学校

概要: 高等学校の生徒実験のための手動の PCR 法の条件設定と手順書の作成を行った。多くの場合 PCR 法は高価なサーマルサイクラーを用いる事が多いが、装置内での状態の観察が困難なため、ウォーターバスを用いた安価で理解しやすい教材としての手動の PCR の実験方法を検討した。原核生物の 16S rDNA のほぼ全域である約 1500 bp を標的としたプライマーを用い、*Bacillus subtilis* および *Escherichia coli* から抽出した DNA または菌体を反応液に加えて PCR を行った結果、30 分以内に反応が終了させることができ約 1500 bp の産物が得られた。高等学校での生徒実験では 1 班 5, 6 名の生徒で編成し 7 班で 3 セットのウォーターバスを用いて行った結果、2 班で目的の増幅産物を得ることができた。

キーワード: 高等学校、理科、生物、DNA 複製、生徒実験

1. はじめに

近年科学の発展、特に生物学分野の発展は社会を大きく変え、私たちの生活に貢献し遺伝子に関する知識や技能は日常生活に関連した科学リテラシーであると考えられている。また令和2年度の新型コロナウイルス感染症の検査方法のとして PCR 法が一般に知られるようになり、一般の社会人や多くの学生や生徒が PCR 法について強い興味と関心を持っていると思われる。しかし高等学校で PCR について学ぶ機会があるが、文部科学省の理科に関する資料¹⁾によると理科における履修状況では生物を履修している生徒の数が普通科等、職業を主とする専門学科、総合学科を対象として見ると 20.9%と低いことから約 80%の生徒が学習せず卒業していくことになる。さらに、中・高生が PCR 法について興味を持ったとしても、実際に実験ができる機会は少ない。そのため学習する機会が設けられて PCR の反応装置であるサーマルサイクラーのような専門の機器がないことがほとんどであると考えられるため多くの授業は座学のみであると推察される。

高等学校の生物の教科書²⁾に記載されている PCR 実験では約 44 分要するため、事前説明、PCR、電気泳動と授業時間が 3 コマ必要と考えられた。しかし高等学校の授業の進行などの都合により 2 コマしか実験時間を費やせないと考えられた。しかし試薬の説明書には教科書よりも反応時間が短く記載されていたため実験時間の短縮が期待された。そのため試薬の説明書を基に 2 コマでこれらの手順が完結するよう反応条件の検討が望まれた。

そこで本研究ではサーマルサイクラーを用いずに高等学校で行える PCR を行うことで SDGs のゴール 3 すべての人に健康と福祉をと 4 質の高い教育をみんなにを念頭に入れ、得られた結果と今後の課題を報告する。

2. 材料および方法

原核生物の 16S rDNA のほぼ全域である約 1500 bp を標的としたプライマーを用い、*Bacillus subtilis* および *Escherichia coli* から抽出した DNA または菌体を反応液に加えて PCR を行った。PCR の条件は最初にサーマルサイクラーで検討し、得られた条件をもとにウォーターバスでの PCR を行い、中・高等学校の授業で行える実験手順を検討した。さらに、実際の高等学校での実践を行った。

3. 結果および考察

生徒実験で用いるプライマーのセットの検討を行った結果、原核生物では 6 F と 1492 R³⁾ の組み合わせが最も再現性が良く増幅産物が得られた。このとき *B. subtilis* および、*E. coli* から抽出した DNA を鋳型として用いた条件と同様に菌体を直接の PCR チューブ内の反応液に加えるダイレクト PCR 法でも目的のサイズの約 1500 bp の増幅産物が確認された。

実験時間の短縮のため PCR の反応条件の検討ではアニーリングと伸長反応を同時に行う 2 ステップ法では *B. subtilis* および *E. coli* から抽出した DNA を用いた場合目的の増幅産物が得られた実験時間の短縮が可能であった。他にもいくつかの反応時間を短縮するため検討したが増幅産物は得られなかった (表 1, 図 1)。

表1 ウォーターバスでの PCR の結果

プライマー	試料	初期変性	サイクル	サイクル数	結果	備考
6F・1492R	DNA (<i>E. coli</i>)	94°C 1 分	94°C 20 秒, -58°C 20 秒-72°C 20 秒	25	+	
	DNA (<i>B. subtilis</i>)	94°C 1 分	94°C 20 秒, -58°C 20 秒-72°C 20 秒	25	+	
	菌体 (<i>E. coli</i>)	94°C 1 分	94°C 20 秒, -58°C 20 秒-72°C 20 秒	25	+	
	菌体 (<i>B. subtilis</i>)	94°C 1 分	94°C 20 秒, -58°C 20 秒-72°C 20 秒	25	+	

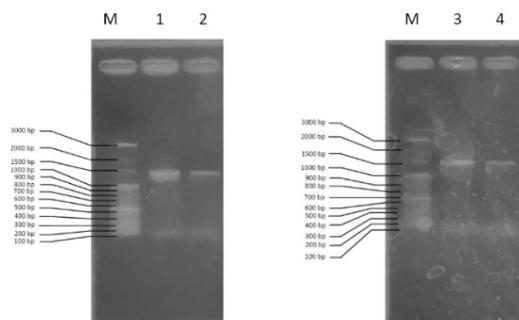


図1 1. *E. coli* から抽出した DNA; 2. *B. subtilis* から抽出した DNA.
3. *E. coli* から抽出した DNA; 4. *B. subtilis* から抽出した DNA.

今回の検討した条件の中でプライマーの組み合わせが 6 F・1492 R, 初期変性 94°C2 分, 変性 94°C20 秒, アニーリング 56°C20 秒, 伸長 72°C20 秒, 25 サイクル, 3 ステップ法が高等学校で行う実験に最も適していると考えられた。

実践を行った高等学校の要望により使用した菌は *B. subtilis* から抽出した DNA, 菌体および納豆の粘りを用いた。高等学校での実地での予備試験により, 実験台の電源の数と教室の定格電流の問題が見出された。そのため, 他教室からの電源の確保や, 2 教室に分かれて実験を行う事などが提案され, 隣接する 2 教室を使用した。これにより電源の確保の問題も解決され大人数での実験も可能であった。さらに本実践では, 班の構成人数を 5, 6 人に調節したことでウォーターバスのセット数を減らすことができた。さらに班全員が実験での操作に関わるように 5 サイクルごとに実験をする生徒が交代する“リレー方式”を行った。

予備実験で最も再現性の高かった条件を基に, 高校生を対象にした PCR 実験では 3 班ずつ *B. subtilis* から抽出した DNA, *B. subtilis* の菌体直接, 納豆の粘りを合計 9 班で行った。納豆の粘りを用いた 3 班中 2 班のみが目的のサイズの増幅産物を得ることができた (図 2)。

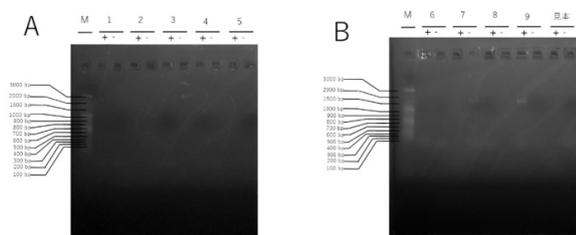


図2 生徒実験での PCR で得られた増幅産物の電気泳動の結果
1, 4. 見本, *B. subtilis* から抽出した DNA; 2, 5, 6. *B. subtilis* 菌体直接;
7, 8, 9. 納豆の粘り; M. DNA サイズマーカー。

生徒には当日に, リレー方式を説明したがすぐに対応できていて, 特に戸惑った様子が見られなかった。PCR チューブの受け渡しは概ね円滑であったもののグループ毎に渡すタイミングに多少の違いが見られた。また, 表情も明るく, 積極的に実験に臨んでいたことが見



図3 生徒実験の様子. リレー方式で PCR を行っている。

取ることができた (図 3)。

課題として 2 教室で実験を行ったため実験終了に 2 分程度の誤差を生じ一方の教室では 1 分程度の授業時間を超過したそのため授業時間と生徒実験の再現性を向上させるためには授業中の説明や反応条件をみなおす必要があると考えられた。

共同研究者の作製した質問紙では「実験を通して PCR の原理を知れてよかったです。」と書かれていることから実験を行った高等学校の生徒が十分に理解して行える有用なものであったと考えられた。このような取り組みが知識, 判断力などを身につけていくための契機となり, 一般化していくバイオテクノロジーなどの技術に対して根拠をもって説明や判断ができるなどの本来の学力に即した「生きる力」が身につけていくことが望まれた。

4. 謝辞

本研究に多大なる協力を賜った, 新潟県立栃尾高等学校小田島 大氏ならびに山家 真奈美氏の両教諭に心から感謝いたします。実験ならび生徒の意識調査に協力を賜った新潟薬科大学応用生命科学部古俣真夕 氏に心から感謝いたします。

5. 引用文献

- 1) 独立行政法人 科学技術振興機構 理科教育支援センター (2010) 平成 20 年度高等学校理科教員実態調査報告書。
http://www.mext.jp/b_menu/shingi/chuky
- 2) 嶋田 正和 他 21 名 2018 生物 pp.132-134. 数研出版社. 平成 24 年検定。
- 3) 吉永 郁生, 内田 有恆, 片野坂 徳章, 芝恒 男 2006 増改訂版海洋環境アセスメントのための微生物実験法. 石田祐三郎および杉田治男編. pp. 142-144. 恒星社 厚生閣(東京)。