

## 1 はじめに

新教育課程で導入された生物基礎の「生物と遺伝子」の「DNAの抽出実験」では、ブロッコリーやタラの白子を用いている。遺伝子（DNA）抽出実験は、手にとって観察できるので生徒にとって興味関心を大いに高めることができる。しかし、ブロッコリーはDNAの抽出量は少量で、実験の成功率も低い。また、白子は、入手時期が限られている。

遺伝子の本体—DNAの構造を生徒にイメージさせる手段として市販の構造モデルを見せたり、紙等を用いて生徒自身に工作させるなどの方法がある。これらの道具を用いて、遺伝子暗号が塩基配列によることを理解させることは可能であるが、細胞の核内に存在する糸状のDNAを想像させることは至難の業である。

時期を選ばずに安価に大量に入手できる豚睾丸を用い、DNA抽出実験を簡易的に生徒が可能な範囲で行えるようにするため本研究を進めることにした。

## 2 研究方法

- (1) 材料・実験方法の開発
- (2) 授業の実践
- (3) 授業実践後の注意点, 改善点
- (4) 実験の改善研究

## 3 研究内容

### (1) 材料・実験方法の開発

#### ア 材料の選択

本研究では豚の睾丸を用いることを以下の3点から決定した。

(ア) 生物の体全体で、生殖細胞には特にDNAの割合が高い。そのため、動物、植物両者において実験材料として生殖細胞の存在する部位を用いる実験が主流である。動物細胞では細胞質の多い卵より頭部の大半をDNAがしめる精子を用いる方が効率的である。

(イ) これまでの授業実践で用いられたことのない材料である。

(ウ) 安価に入手できる。(近隣の千葉県食肉公社より無料で入手)

#### イ 実験方法の開発

(ア) 鮭やタラの精巣からのDNA抽出方法を参考にした。

##### a 核タンパク質の抽出

薄い塩化ナトリウム水溶液 (0.18mol/L) 中における精子頭部及び他の細胞からの核タンパク質の抽出

##### b DNAとヒストンタンパク質の解離

濃い塩化ナトリウム (1.5mol/L) 水溶液中におけるDNAとヒストンタンパク質の解離

- c DNAの塩析による沈殿  
50%のエタノール溶液中でDNAのみ析出させる。

(イ) 予備実験

a 豚睾丸の下処理

- (a) 精巣を包み込んでいる脂肪層などを除去する (図1, 2)。  
(b) 精巣と精巣上体を分離する (図3, 4)。



図1 下処理前の睾丸

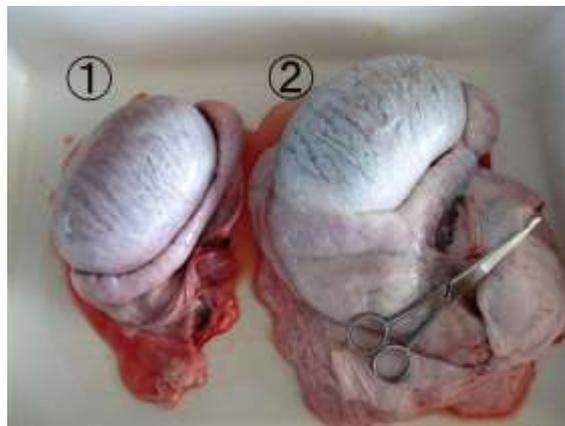


図2 皮をむいた状態



図3 ①の精巣と精巣上体



図4 ②の精巣と精巣上体

図3, 4の①精巣 475g, 精巣上体 110g, ②精巣 558g, 精巣上体 114gであった。重量には個体差が見られる。

b DNAを抽出

精巣で精子は作られ, 成熟した精子は精巣上体に蓄えられる。精巣と精巣上体を切り離し, 別々にDNAを抽出し, DNA回収量の違いをしてみる。

- (a) ①の精巣と精巣上体、各20gに0.18mol/Lの食塩水(10倍量)200mLを添加し、ジューサーで攪拌した(図6)。



図5 精巣断面



図6 使用したジューサー

- (b) 10分間静置後、上澄みを捨て、沈殿した固形分を取り出した。
- (c) 沈殿物に2.0mol/Lの食塩水200mLを添加し、ガラス棒で攪拌した。さらに60℃の湯浴で温めながら5分間、攪拌する。粘性が落ちたところでガーゼで濾過する(図7)。
- (d) ろ液と等量のエタノールを加え、DNAを析出させた(図8)。



図7 湯浴している様子



図8 析出したDNA

少量ではあるが、白いDNAを得ることができた。精巣を材料にする方が収量は多かった。

今回は、新鮮な睾丸を用いたが、冷凍保存後の睾丸を用いた場合との違い、DNAの収量増加、実験の簡易化、精子の状態観察等の改善・改良をする必要があると考えられる。

#### ウ 実験方法の改善

##### (ア) 豚睾丸の冷凍保存

###### a 目的

授業に合わせて、新鮮な豚睾丸を入手するのは困難である。豚睾丸を冷凍保存し必要に応じて解凍し、使用することを検討した。

###### b 方法

冷凍保存した睾丸を解凍後、実験操作を同様にし、DNA抽出を試みた。

c 結果

解凍後の豚睾丸からは赤い血液が大量に出た。薄い食塩水に攪拌した液は、赤く濁った。抽出したDNAは、赤褐色であった（図9）。新鮮な豚睾丸を用いた場合は濁りは薄い（図10）。



図9 濁った冷凍睾丸溶液



図10 上澄みが澄んでいる  
新鮮な睾丸の懸濁液

d 改善点

可能な限り冷凍せず、新鮮な豚睾丸を用いて実験した方が良い。使用する場合は、解凍した際に、できうる限り血抜きをする。薄い食塩水に懸濁、静置後、上澄みを完全に捨てる。濃い食塩水に再度、DNAを溶解し、再度沈殿させる等の改善が考えられる。

(イ) 核タンパク質の回収率の向上

a 目的

できうる限り、少量の豚睾丸サンプルから効率よくDNAを採取する。

b 方法

薄い食塩水に攪拌後、冷蔵庫内で冷蔵しながらの静置時間を一晩以上長くとり、沈殿量をできうる限り多くする。

c 結果

静置時間を十分にとることにより、肉眼でも沈殿層が厚くなるので、余裕がある限り、実験の授業を2時間展開として2日間に分け、沈殿量をできうる限り多く回収した方が良い。



図11 攪拌直後の薄い沈殿層



図12 48時間静置後の厚い沈殿層

(ウ) 抽出したDNAを同定する

a 目的

フォイルゲン反応というシッフ試薬でDNAを特異的に染色する方法を用いた。この方法は希塩酸によりDNAのプリン塩基を除去し、現れた遊離アルデヒド基に亜硫酸フクシン（シッフ試薬）を結合させ、赤紫色の化合物を形成させるものである。比較対照として毛糸、木綿糸、絹糸を染色してみる。

b 方法

(a) 抽出したDNAを染色

DNAが白い糸状であることが確認できる。さらにDNAであることを同定するためにシッフ液で染色した。塩酸処理無しで、きれいな赤色に染色できた（図13, 14）。



図13 白い糸状のDNA

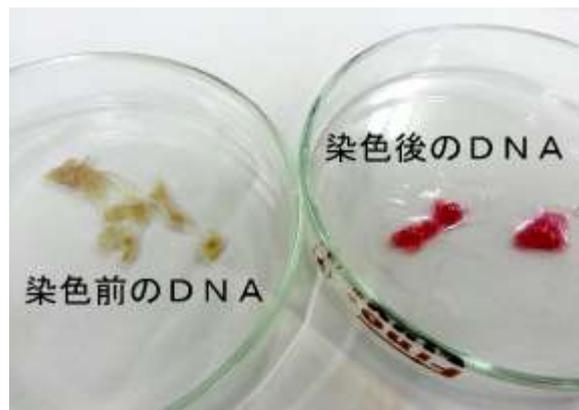


図14 シッフ液によるDNAの染色の様子

(b) DNA, 毛糸, 木綿糸, 絹糸（左から）のシッフ染色液で染色を比較

サンプルを並べ、横一直線上にシッフ液を滴下した。抽出したDNAのみ染色された。毛糸, 木綿糸, 絹糸は染色されなかった。



図15 染色前の様子



図16 染色5分後の様子

## (エ) DNAの純度を向上する

濃い食塩水に溶解し、50%濃度になるようにエタノールを添加し、DNAを析出する操作を2回行い、できる限りヒストンなどのタンパク質を除去し、DNAの純度を向上させる。

### a 抽出1回目のDNA

収量は多く、糸状であることは確認できるが、赤みを帯びている。血液等の不純物を多く含んでいると考えられる (図 17, 18)。



図 17 抽出1回目のDNA



図 18 抽出1回目のシャーレ上のDNA

### b 抽出操作を2回行ったDNA

収量は減ったが、DNAの色は白くなり、糸状であることもはっきりと確認できるようになった (図 19, 20)。



図 19 抽出2回目のDNA



図 20 抽出2回目のシャーレ上のDNA

## (2) 授業の実践

### ア 目的

DNAの抽出と同定を行うことが確認できたので、授業で実践することにより、改善点等を見つけ出し、さらに確実なものとする。

### イ 方法

授業は、2時間構成で実施する。1時間目は核タンパク質の抽出とDNAの実験説明で50分、2時間目はDNAの抽出、染色およびレポート作成の50分で構成する。

(ア) 1時間目

- a 精巢上体から精液を取り出して 0.18mol/L と 2.0mol/L の食塩水に溶解し、顕微鏡観察する (図 21, 22)。



図 21 0.18mol/L 食塩水での精子の様子



図 22 2.0mol/L 食塩水での精子の様子

- b サランラップ等にしっかりと密閉した状態で、豚睾丸を生徒に観察させ、大きさ・機能について確認する (図 23)。

- c 50g ずつ切り分けた睾丸を乳鉢に入れて配布し、はさみでミンチ状に細かく切った後、乳棒でペースト状になりまですりつぶさせる (図 24~26)。



図 23 睾丸の観察



図 24 100g ずつ切り分けた睾丸



図 25 解剖ばさみでの切り刻み



図 26 乳棒でのすりつぶし

- d 5倍量の薄い食塩水に溶解し，冷蔵庫内で静置し，1～3日間沈殿させる（図27，28）。



図27 0.18mol/Lの薄い食塩水への溶解



図28 冷蔵庫内での静置

- e 上澄みを静かに捨て，DNAを沈殿を取り出す。（図29，30）



図29 沈殿した様子



図30 上澄みの廃棄

- f 沈殿を濃い食塩水に混ぜて攪拌する。粘性が高く，濾過ができないので溶液を50℃まで湯浴で加熱する。この操作でDNAとヒストンなどのタンパク質とを解離する（図31，32）。



図31 沈殿の濃い食塩水への溶解



図32 加熱溶解

g 粘性が低い冷めないうちにガーゼで濾過し、濾液を流水で冷やし、室温にする（図 33, 34）。



図 33 ガーゼを用いての濾過



図 34 濾液を流水で冷却

h 50%エタノール濃度になるよう、冷却したエタノールを静かに濾液に注ぎ、エタノールを析出させる（図 35, 36）。



図 35 エタノール添加によるDNA抽出



図 36 DNAのシャーレへの取り出し

i DNAをシャーレに取り出し、無色透明のシッフ液を滴下して染色し、DNAであることを同定した（図 37, 38）。



図 37 シッフ液の滴下



図 38 赤色に染色されたDNA

### (3) 授業実践後の注意点, 改善点

#### ア 精子の状態

0.18mol/Lの食塩水中の方が、精子は元気に泳ぎ回っていた。これはほぼ生理食塩水中に近い濃度の中にあるためと考えられ、精子の頭部は破裂してなかった。しかし、0.18mol/Lの薄い食塩水に攪拌し、上澄みを捨てることは不純物である血液の除去には不可欠なので、省くわけにはいかない段階である。

#### イ 衛生面・危機管理等

豚のレンサ球菌症は人に皮膚の外傷を介して感染し、化膿性髄膜炎を発症する可能性がある。衛生面に十分注意するために、実験時防水性のある手袋を着用しなければならない。従って、試料は必ず教員がさばくこと。生徒には決して直接睾丸にメスを入れさせないように留意する。

#### ウ 事故の防止

この実験では、ガスバーナーや有機溶媒のエタノールを使用するために、授業中の生徒の離席しての移動を極力少なくする必要がある。事前に机上に材料、器具等を配置することが重要である。

#### エ DNA分解酵素を阻害する必要性

冷蔵庫での沈殿時間を一晩(24時間)以内にすべきと考えられる。授業での実践結果で、沈殿を一晩で終了させ、翌日にDNAを回収したクラスは11班中11班、全ての班でDNAが大量に回収でき、染色して観察することができた。これに対して沈殿時間を冷蔵庫で3~4日経過したクラスではDNAが回収できたのは11班中2~3班にとどまった。

長時間の静置の間にDNA分解酵素が働き、DNAが分解されてしまったと考えられる。薄い食塩水内で核タンパク質を沈殿させる際は、DNA分解酵素の阻害剤であるエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムマグネシウム四水和物(以下、EDTA)を添加し、DNA分解酵素の働きを抑える必要があると考えられる。なお、EDTAはキレート剤としてマグネシウムと結合し、DNA分解酵素を阻害する物質である。

#### オ 時間の短縮

DNA分解酵素による収量の激減、生物基礎の2単位という標準単位数等を考慮に入ると1時間で実験を完結させる工夫が必要である。

### (4) 実験の改善研究

#### ア EDTA添加によるDNA分解酵素の働きの阻害の検証

##### (ア) 目的

授業実施の都合上、2日以上静置、沈殿させる際にDNAの回収率が低下する。EDTAを添加し、マグネシウムとキレート化することにより、DNA分解酵素を阻害し、DNAの収量を増加させる。

##### (イ) 方法

- a 1つの睾丸を半分に輪切りにし、5倍量の薄い食塩水に0.1%量のEDTAを添加したものと5倍量の薄い食塩水のみでEDTAを添加しない溶液を作り、5℃の冷蔵庫内に静置した。



図 39 薄い食塩水に静置後の様子



図 40 上澄みを捨てた後の沈殿の様子

- b 3日後、冷蔵庫内から取り出し、上澄みを捨て、沈殿を得る（図 39, 40）。
- c 沈殿をやくさじで掬い、粘性を確かめる（図 41, 42）。



図 41 EDTA添加  
(粘性高い)



図 42 EDTA添加無し  
(粘性無し)

- d 50%量のエタノールを添加し、DNAを析出させ、薬さじで掬い取り、状態を観察する（図 43）。



図 43 DNAの長さの比較



図 44 DNAの収量の比較

- e DNAをシャーレに回収し、収量を比較する（図 44）。

#### (ウ) まとめと考察

図 41, 42 の比較より EDTA を添加することにより、薄い食塩水に溶解後の沈殿の粘性は非常に高かった。これは薄い食塩水に溶解後、静置している期間、DNA 分解酵素が阻害され、DNA の分子が長いままの状態と保存されたためと考えられる。図 43, 44 より EDTA を添加することにより、DNA の長さは長いまま保存され、収量は多くなったと考えられる。

以上の結果より、DNA 抽出実験をする際は、EDTA を添加し、DNA 分解酵素の働きを阻害することが必須であると考えられる。

#### イ 実験時間の短縮化

##### (ア) 目的

DNA を観察させるこの実験は、標準単位数 2 単位の生物基礎で行われる事が多いと考えられる。実験を 1 時間で完結させる工夫をしなければならない。

##### (イ) 方法

- a 薄い食塩水に睾丸を溶解する際に、生徒に乳鉢で擦る操作を実施せず、演示実験で授業担当者がジューサーミキサー等の機具を用いる。
- b 濃い食塩水に溶解した液の粘性を低くするため湯浴で温める際に 50℃ に達した時点で、すぐに濾過をする。
- c 濃い食塩水からの濾液を冷やす際に氷水を準備しておき、短時間で冷やす。

#### ウ 実験費用の節約

エタノール (3,500 円/500mL) をイソプロピルアルコールやポリエチレングリコールに変更し、塩析して DNA を得る方法もある。しかし、イソプロピルアルコールは揮発性が悪く、DNA が乾きにくい。またポリエチレングリコールは粘性が高く、もう一度エタノールで洗う作業が必要で、取り扱いにくい。

濃い食塩水に核タンパク質を溶解する際に、5 倍量以上の濃い食塩水で薄めれば操作性は向上する。反面、濾過性は悪くなるが、睾丸の 3 倍量の食塩水の量でも実験可能である。また、エタノールの混ぜる濾液量を、DNA が最低限析出・観察できる量まで少なくし、等量加えるエタノール量を節約する方法も考えられる。濾液量は 50mL あれば、十分に最小限の DNA は観察できる。

## 4 おわりに

DNA 抽出実験中、生徒は生き生きとした顔をしています。DNA の塩基配列、2 重らせん構造を板書で教えるだけでなく、実際に遺伝子である DNA を見せてあげられるこの実験を通じ、理科への興味関心が深まることは、確実です。是非、豚睾丸からの DNA 抽出実験を授業で実践してみてください。

最後に、本研究を進めるにあたり、御指導、御助言をいただいた教育庁教育振興部指導課の豊城勲主席指導主事、前指導課の尾竹良一先生、高梨祐介先生、教科指導員の秋本行治先生、太田和広先生ならびに教科研究員の諸先生方に心よりお礼申し上げます。また、豚睾丸を無償で提供してくださった千葉県食肉公社に御礼を申し上げさせていただきます。