



第14回 科学の甲子園 全国大会

実技競技②

直前学習用資料

明日の競技には，この資料と貸与するマイクロピペッターを
忘れずに持参してください。

実技競技②では、競技時に配付する「実験の手引き」記載の操作手順により、実験を行うとともに、実験内容や結果についての考察問題に解答します。

実験では、採取した DNA を現代のバイオテクノロジーを支える基本的な技術の一つである「アガロースゲル^{注1)}電気泳動」によって分離し、DNA の確認をします。

以下の説明をよく読んで、アガロースゲル電気泳動の原理や手順等について十分理解するとともに、貸与するマイクロピペッター（チップ付）を使って、操作方法を確認しながら練習を重ね、明日の競技に臨んでください。

注 1) アガロースは多糖類の一種で、寒天の主成分である。ゲルは網目状の分子構造を持つ。

●電気泳動の基礎知識と手順

1. DNA の電氣的性質

DNA は 2 本の鎖からなり、それぞれの鎖は、塩基、デオキシリボース（糖）、リン酸からなるヌクレオチドが直鎖状につながっている。DNA は、水溶液中ではリン酸基が負の電荷を持つため、DNA 分子全体ではヌクレオチドの数、すなわち分子量（分子の長さ）に比例した負の電荷を持つことになる（図 1）。

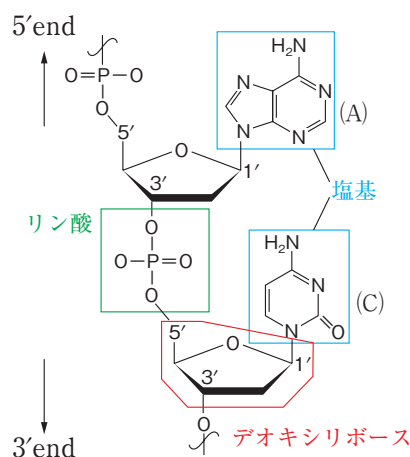


図 1 ヌクレオチドの構造

2. アガロースゲル電気泳動の原理

アガロースゲルの端につくったウェル（穴）に DNA サンプルをアプライ（注入）し、ゲルの両端に直流電圧をかけて電場を生じさせると、負の電荷を持つ DNA は網目状の分子構造を持つアガロースゲル内を陽極に向かって移動していく。このとき、DNA 分子の長さ（単位は塩基対数 base pair を意味する bp）が短いほど、アガロースゲルの網目状構造を通り抜けやすくなるため、DNA の移動距離は大きくなる。また、異なる塩基対数（分子量）の DNA が混在している場合には、移動距離の長短によって、それらを分離することができる（図 2）。

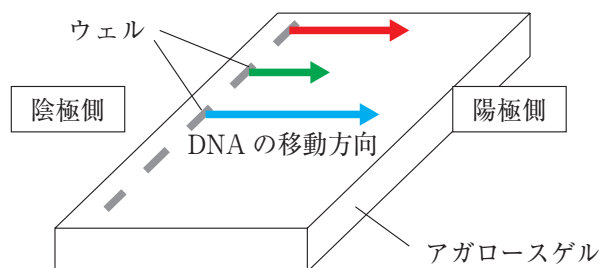


図 2 アガロースゲル電気泳動の原理

3. 実技競技②におけるアガロースゲル電気泳動の手順（概要）

- (1) 電気泳動装置の電気泳動槽にアガロースゲルの入ったゲルトレイ（図3）を静置し、導電性を持ち、かつ DNA の分解が起こりにくい電気泳動 buffer^{注2)}をアガロースゲル全体が浸るように、注ぐ。
- (2) DNA を含む溶液に、蛍光色素が入ったローディング buffer^{注3)}を加えて DNA サンプルを調製する。
- (3) アガロースゲルにつくられているウェルと呼ばれるくし状の穴に、(2)で調製した DNA サンプルをマイクロピペッターを使ってアプライする（図4）。

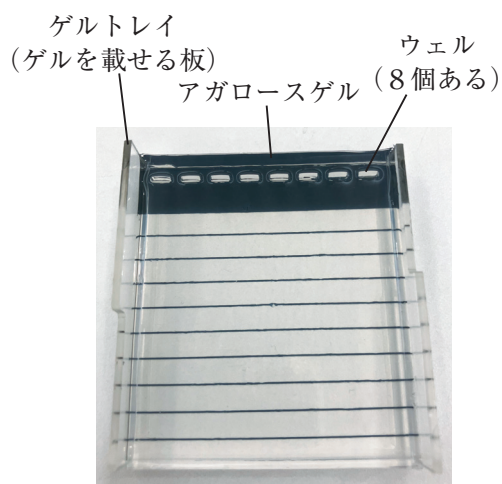


図3 上から見たアガロースゲル

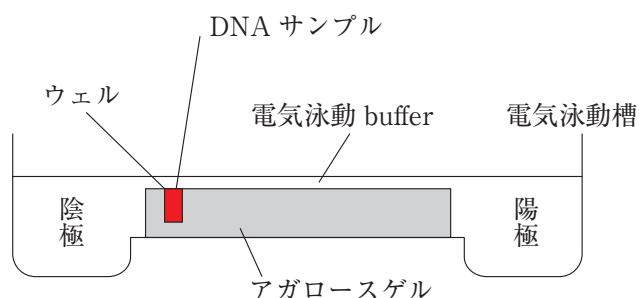


図4 DNA サンプルのアプライ

- (4) 電気泳動終了後に青色 LED の光を照射すると、レーン（ウェルから陽極に向かう带状の区域）を移動した DNA などの核酸を蛍光色素が発する光によって可視化し、明るいバンド（短い帯）として、検出することができる（図5）。

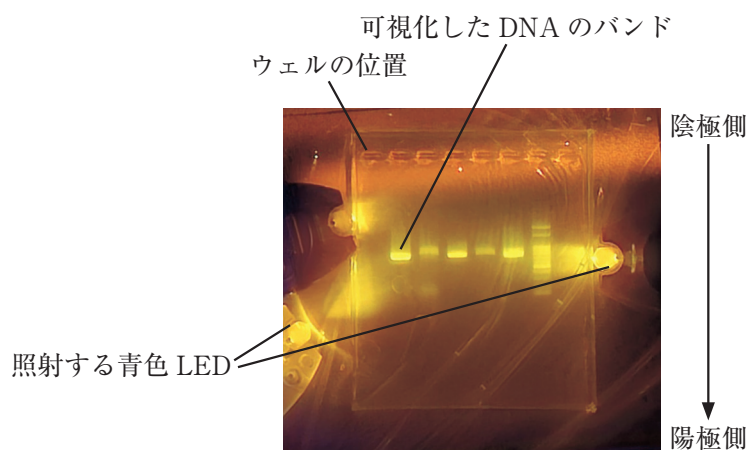


図5 可視化した DNA サンプルのバンドの例

注2) 水溶液の pH をほぼ一定に保つ効果がある。競技では TAE (Tris Acetate EDTA の略) Buffer という溶液を用いる。

注3) 蛍光色素はDNAなどの核酸と結合する。ローディング buffer には、DNA サンプルの比重を大きくするためのグリセロールと、電気泳動の進行状況を観察するための色素（蛍光色素とは異なる）が含まれている。

【参考】 別のウェルに分子の長さ（塩基対数 bp）がわかっている DNA 断片をマーカー（指標）としてアプライし、DNA サンプルと同時に電気泳動をすれば、バンドの移動距離の比較によってDNA サンプルの塩基対数を推定できる。（競技ではマーカーのアプライは省略する。）

●マイクロピペッターの使い方

マイクロピペッター（図6）は、1 mL 以下の微量の液体を正確に計量する器具である。ピペッター内部のピストンが上下する距離をダイヤルで調整して、 μL ($\times 10^{-3} \text{ mL}$) スケールの液体を計量することができる。ピペッターの種類によって、先端に取り付けて使用するチップの種類や計量できる容量の範囲が異なるので、適した組み合わせを選択する必要がある。



図6 マイクロピペッター

操作手順

1. 本競技では、20 μL 用のマイクロピペッターを使用する（表1）。
2. ダイヤルを回して、目盛を一旦は計量する容量よりやや多めの数字に合わせた後、ゆっくりとダイヤルを戻して、計量する容量に設定する（表1，目盛の設定例）。

※ダイヤルは目盛が計量範囲を超えたところで回らなくなる。無理に回すと壊れてしまうので注意すること。

表1

マイクロピペッターの プッシュロッドの種類	計量範囲	チップの色と容量	目盛の設定例		
20 μL 用	2 ~ 20 μL	黄色（1-200 μL ）	12.5 μL	1	…10 の位
				2	…1 の位
				5	…0.1 の位

3. マイクロピペッターは片手で握るように持ち、親指でプッシュロッドを操作する（図7）。
4. ラックに並んだマイクロピペッター用チップ（以後、チップという）にマイクロピペッターを差し込み、軽くトントンと叩くようにしてチップを取り付ける（図8）。
5. シャフトにはプッシュロッドを軽い力で押し込める第1ストップと、強い力で押し込める第2ストップがある（図9）。
6. 一定量の溶液を計量するには、まずプッシュロッドを第1ストップまで押した状態で、チップの先端を溶液の中に軽く入れる。次に、プッシュロッドを押さえていた指をゆっくりと離し、溶液を吸い上げ、そのまま引き抜く。
7. 計量した溶液を別の容器に移すには、その容器の内壁にチップの先端を軽く触れて、プッシュロッドをゆっくり第1ストップまで押して溶液を排出し、さらに第2ストップまで押し込んで、チップ内の溶液を完全に排出する。
8. プッシュロッドを押さえていた指をゆっくりと離し、プッシュロッドをはじめの位置に戻す。
9. 使用済みのチップは、チップ回収容器の上でイジェクターボタンを押してはずす。他の溶液の混入を防ぐために、異なる溶液を計量する場合には、必ずチップを交換する。



図7 マイクロピペッターの持ち方
(操作するときは垂直に持つ)



図8 チップの取り付け



図9 マイクロピペッターの第1ストップと第2ストップ

【参考】 マイクロピペッターの操作技法**ピペッティング**

溶液が不均一な場合などに、溶液の中にマイクロピペッターのチップの先端を入れ、解放と第1ストップのあいだで、溶液をゆっくりと一定の速度で吸い上げたり排出したりすることで、溶液を攪拌して均一にする方法。

リバースピペッティング

マイクロピペッターで、泡立ちやすい溶液や粘性の高い溶液、揮発性の高い溶液などを量り取るときに、プッシュロッドを第2ストップまで押してから解放の位置まで溶液を吸い上げ、そののち第1ストップまで押して溶液を取る方法。揮発性の高い溶液の場合には、この操作を何回か繰り返してから採取することがある。