

簡易電気泳動装置の作製

住友 裕一

高等学校学習指導要領（文部科学省 平成30年）において、生物（4単位）「(3)遺伝情報の発現と発生 (ウ)遺伝子を扱う技術」の内容については「遺伝子を扱う技術について、その原理と有用性を理解すること」、内容の取り扱いについては「制限酵素、ベクター及び遺伝子の増幅に触れること。また、それらが実際にどのように用いられているかについても触れること。」と記載されている。遺伝子組み換え技術で利用する制限酵素を扱った実験やPCR法のように遺伝子増幅に関わる実験においては、結果を確認するために電気泳動法が一般的に用いられている。今回は身近なものをを用いて作製した電気泳動装置について検討した。

[キーワード] 電気泳動 電源装置

はじめに

バイオテクノロジーは急速な進展を遂げており、日常生活でも遺伝子組換え、遺伝子診断、再生医療、オーダーメイド医療などの言葉を聞くことが多くなっている。高校生物の教科書にもPCR法や電気泳動に関する学習内容や実験内容が記載されている。電気泳動はDNAの塩基配列の決定やDNA鑑定に用いられる技術であるため、DNAを用いた実験研究には必要不可欠な実験であり、分子生物学にとって重要な実験であるといえる。学校に電気泳動装置がなくても、手軽に身近なものをを用いて工夫して実験できるように電気泳動装置の作製を行った。BIO-RAD社のDNA電気泳動キットを用いて電気泳動装置Mupid-2-plusと食品保存用容器を用いて作製した電気泳動装置での実験を比較して検討した。

1 アガロースゲルの作製

①バッファの調整

- ・50×TAEから1×TAEを調整する。

※3Lあれば、8台分の電気泳動槽および8枚のアガロースゲル作成に使用できる。今回は1L用意して実験を行った。

表1 バッファの調整

1×TAE	蒸留水	50×TAE
1L (1000ml)	980ml	20ml
2L (1000ml)	1960ml	40ml
3L (1000ml)	2940ml	60ml

- ・電気泳動槽1台につき、およそ275～300mlの1×TAEバッファが必要である。
- ・1枚分のゲル量の目安として、1%アガロースゲルの作成に100mlの1×TAEバッファが必要である。

表2 ゲルの大きさや量

ゲルの大きさ	0.75cm厚	1.0cm厚
7×7cm	30ml	40ml

②アガロースゲルの準備

- ・ゲル濃度は1%アガロースを使用した。
- ・ゲルの厚さは0.75～1.0cmになるように作製した。

③アガロース粉末の溶解

- ・アガロース100mlを調整するときは200～300mlのフラスコを使用する。
- ・アガロース粉末1gに1×TAEバッファを100ml加えて混ぜて懸濁させる。

- ・アガロース粉末が完全に溶解してしまうまで、この混合液を電子レンジで加熱設定を「中」にし、加熱時間を5分に設定して煮沸する。
- ・30～60秒ごとに、あるいは溶液が沸騰しそうになったら電子レンジを止め、フラスコを実験台上で水平に、ゆっくりと振ってとけ残っているアガロースを懸濁させる。



図1 電子レンジによるアガロースゲルの溶解

- ・フラスコを約60℃（手で触れられる程度）まで冷ます。

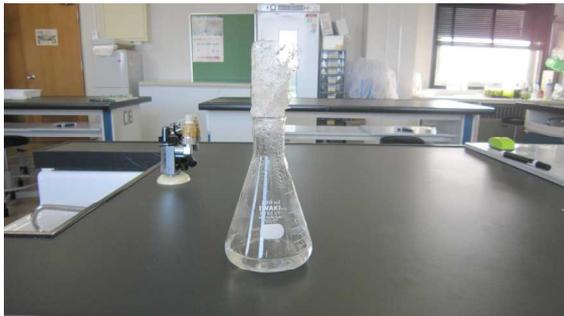


図2 溶解させたアガロースゲル

④アガロースゲルの流し込み

- ・ゲル用コームの歯を完全に覆うまで、およそ0.5～0.75cmの深さまでアガロースを注ぐ。
※ゲルトレイのゲルを注ぐ面から0.75～1.0cmの部分に印をつけておくとよい。



図3 ゲルをゲル作成容器に流し込む様子

2 アガロースゲルの電気泳動

①サンプル準備

- ・4本のマイクロチューブにL, P, E, Hと書き、マイクロチューブラックに立てる。

L=制限酵素なしー完全なラムダDNA

P=Pst I で切断したラムダDNA

E=EcoR I で切断したラムダDNA

H=HindIIIで切断したラムダDNA

(HindIIIで切断された断片の大きさは既におかっている。したがって、HindIIIで切断したラムダDNAが大きさの基準になる。)



図4 使用したマイクロチューブ

- ・マイクロピペットのダイヤル10 μ lに合わせて新しいチップを装着し、原液チューブに入っているラムダDNA10 μ lを、マイクロチューブに移す。また、P, E, HのチューブのDNAについても同様に、各サンプル10 μ lをマイクロチューブに移す。このとき、毎回ピペットチップを交換する。
- ・マイクロピペットのダイヤル2.0 μ lに合わせて新しいチップを装着し、②のL, P, E, Hの各マイクロチューブにそれぞれサンプルローディングダイを2.0 μ lずつ加える。
- ・ゲルのサンプルウェルにサンプルを入れる前に、各マイクロチューブのDNAとマーカー色素を完全に混和させる。片方の手の親指と人差し指でマイクロチューブの頭部を持ち、もう一方の手の人差し指でマイクロチューブをはじくようにして混和させた。



図5 マイクロチューブにおける混和

②Fast BlastDNA染色液の調整

表3 染色方法

	Fast Blast 染色液	蒸留水
オーバーナイトステイン (一晩染色)の場合	1ml	499ml
クイックステイン (染色時間1～2時間)の場合	100ml	400ml

- ・フラスコの口を食品保存用ラップ等で覆い、使用するまで室温で保管する。
- ・1辺が7cm正方形のゲルを染めるのに必要な、Fast Blast染色液は60～100ml程度。



図6 Fast BlastDNA染色液の写真

③電気泳動槽の準備

- ・ゲルトレイを泳動槽に置く場合は、サンプルウェルが陰極（黒色電極）側になるように注意する。
- ・1×TAE泳動用バッファを必要量準備する。
※ゲルの上が2mm程度浸るぐらい（およそ300ml）の1×TAE電気泳動用バッファを注ぎ入れる（ゲルが泳動用バッファに完

全に浸っていることを確認する）。

- ・定電圧（100V）で行い、およそ30分程度で泳動を停止させた。
- ・固まったゲルが入ったゲルトレイを、泳動槽の中央の台上に置く。このとき陰極側にサンプルを置くようにする。
- ・電気泳動槽に電気泳動用のバッファを約275～300ml注ぐ。ゲルの上をおおよそ2mm覆うまでバッファを注ぐ。



図7 ゲルを電気泳動装置にセッティングした様子

- ・ピペットで各マイクロチューブ（L, P, E, H）からサンプルを10μlずつ取り、ゲルの1つのサンプルウェルに1サンプルずつ入れる。サンプルごとに新しいチップを使用する。



図8 ウェルにサンプルを注入する様子

- ・100Vで約30分間電気泳動する。
- ・ゲルトレイを泳動槽から外す。ゲルを容器に入れる。泳動槽の中のバッファはビーカーなどの容器に入れる。
- ・約60mlのFast Blast DNA染色液をゲルを入れた容器に注ぐ。オーバーナイトステインで行ったため、1晩染色した。



図9 オーバーナイトステインによる染色の様子



図10 Mupid-2-plusで電気泳動したゲル

④手作り電気泳動装置による電気泳動

- ・容器の左と右を目玉クリップではさむ。
- ・電源装置とリード線を接続し、電極につなぐ。
- ・電源装置（30V 30分）で電気泳動する。



図11 電源装置による電気泳動の様子

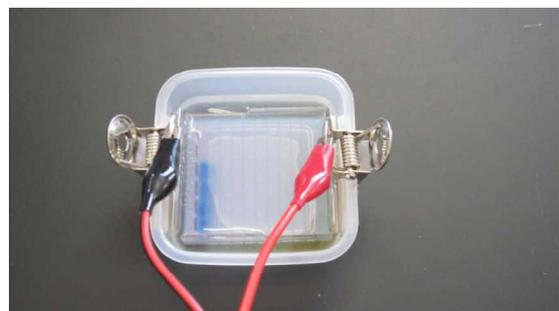


図12 陽極と陰極を目玉クリップを利用したとき

⑤ゲルの保存

- ・染色トレイのDNA染色液をビーカーなどの容器に注ぎ戻す。
- ・DNA染色液は2～3回程度繰り返し使用できる。
- ・脱色するために、染色トレイに精製水を入れ、ゲルを軽くすすぐ。
- ・ゲルを十分覆う量の水を染色トレイに入れる。
- ・10～20分置いてから余分な水を注ぎ捨てる。
- ・各レーンのDNAバンドを観察する。
- ・白い紙の上にゲルを置いて観察し、結果を記録する。

3 手作り電気泳動装置の特徴

手作り電気泳動装置の場合、電気泳動自体は問題なくバンドの検出ができた。問題点としてはスチールの目玉クリップをそのまま電極にすると、陽極が溶解してバッファーが汚れてしまった。同様に染色時に染色液も汚れてしまった。

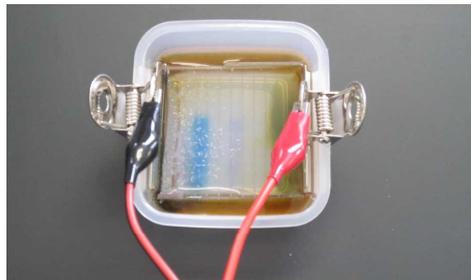


図13 陽極の目玉クリップが溶解

また、溶け出した陽極の鉄によって陽極側のゲルが茶色く変色してしまった。通電中はゲルの中に気泡が入り見た目が悪くなってしまったが、染色後、気泡は目立たなくなった。

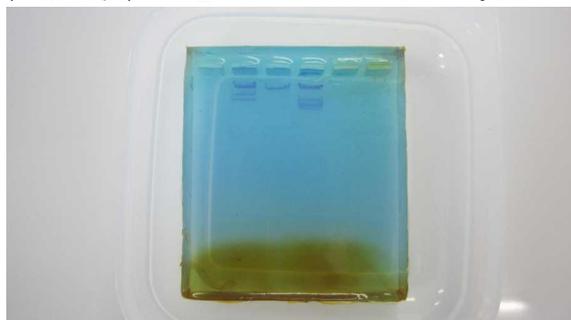


図14 陽極と陰極を目玉クリップで電気泳動したときのゲルの様子

陽極を銀板，陰極を目玉クリップにして電気泳動すると，陰極に銀が析出してバッファーが汚れてしまった。両極を目玉クリップにしたときは異なり，ゲルの変色やゲル内の気泡は無かった。

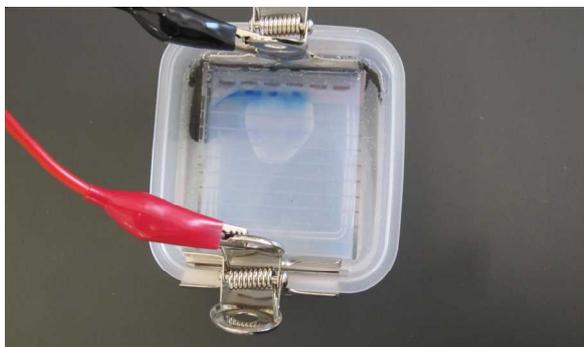


図15 陽極に銀板を用いたとき陰極に銀が析出した様子

陽極をろ紙に針金を通して目玉クリップで止め，陰極を目玉クリップにして電気泳動すると，陽極に多少の汚れは出たが，バッファーは目立つ汚れでは無かった。両極を目玉クリップにしたときは異なり，ゲルの変色やゲル内の気泡はほとんど無かった。結果的に電気泳動装置 Mupid-2-plus に比べて泳動したときのバンドの移動が遅いことが問題点である。



図16 陽極をろ紙にしたときの電気泳動の様子



図17 陽極をろ紙にしたときの電気泳動のゲル

4 今後の展開

生物Ⅱから4単位生物に移行して，多くの教科書で電気泳動の内容が扱われるようになった。

電気泳動の実験は，材料と実験器具が高価であるため，身近なものや安価なものを探して購入するようにしてできる実験を目指したい。

電気泳動で用いる染色試薬であるエチジウムブロマイドは変異原性があるため，安全面での問題がある。安価で安全で迅速な染色試薬を選んで使用したい。特に今回の実験で用いたFast Blast DNA染色液は扱いやすいのでおすすめしたい。

ゲルの作製においては100ml程度の大きさの食品保存容器を用いて作ることができるが，コームは自分で作製しなければならない。コームを自作できないかが今後の課題である。

マイクロピペットがない場合はどのように微量のものを量りとるかが課題である。注射器を利用したマイクロピペットを作製し，マイクロピペットの代用ができないか今後検討していきたい。

電圧が安定した電源装置に変わる電池の使用についても検討していきたい。

今回はBIO-RAD社のDNA電気泳動キットを用いて実験を行ったが，キットを使わず身近な材料であるタマネギ，ブロッコリー，納豆などからDNAを抽出して電気泳動できないか検討したい。

また，PCR法と組み合わせた実験内容についても検討していきたい。

上記の内容が解決できれば、教材として利用しやすくなると考えられる。多くの学校で実施できるようにキット教材の開発についても進めていきたい。

参考文献

- 1) 「高等学校学習指導要領」(平成30年3月)文部科学省
- 2) Biotechnology Explorer™ 実習用テキスト DNA電気泳動キット BIO-RAD (<http://explorer.biorad.co.jp>)
- 3) 「やってみよう！遺伝子実験 PCR法を用いる実験の解説書～PCR法を用いたイネの品種判別を題材として～」岩手県立総合教育センター (ww1.iwate-ed.jp/kankou/kkenkyu/174cd/h30tyou.html)
- 4) 「高等学校生物「遺伝子とその働き」における観察・実験に関する研究－遺伝子を扱う教材・教具の活用方法の構築を通して－」(平成30年度)岩手県立総合教育センター (ww1.iwate-ed.jp/kankou/kkenkyu/174cd/h30tyou.html)
- 5) 「研究資料 簡単に安価な電気泳動装置の開発による実践的な電気泳動実験」倉林 正・武村 政春 生物教育 第58巻 第3号 (2017) (https://doi.org/10.24718/jjbe.58.3_114)
- 6) 「寒天を用いた電気泳動の実験条件に関する検討」北海道立教育研究所附属理科教育センター研究紀要第24号

(すみとも ゆういち 生物研究班)