

研 究 論 文

家庭の台所にある器具や食材を使って DNAを抽出する実験教材開発

宮脇 博巳* ・ 西元 博文*

Development of DNA Extraction Method Using Appliances and Foodstuffs Available in the Kitchen

Hiromi MIYAWAKI* and Hirofumi NISHIMOTO*

【要約】

アメリカ合衆国では、すでに小学校においてDNAについて学んでいる。すなわち、我が国においても、小学校においてDNAについて学ぶ時代が迫っていると考える。そこで、台所にあるような器具と食材を使って、中学校だけでなく小学校でもできるDNA抽出実験を開発した。

【キーワード】

DNA, 台所器具, 小学校理科実験, 中学校理科実験, 小中連携教育

I. はじめに

生徒の興味・関心に応じて課題や方法などを選択させ、その過程で生徒の発想や考えを生かして探求するという「生徒の興味・関心を生かした主体的・対話的な学習」が重要である。そのためには、教師は常に学び続けていかないと、やがて児童生徒の主体的・対話的な学習を指導できなくなってしまう。現在の日本の小中学生は「DNA」という用語を知っているが、多くの小中学生は、自分たちが日ごろ食べる物の中にもDNAが存在していることを理解していない(佐治原・松本 2005)。アメリカ合衆国の小学校教科書(Badders, W. et al. 2007a & 2007b)では、5年次にDNAの構造、複製、突然変異を学び、6年次に減数分裂の結果生じたDNAが生殖細胞の中に配分されることを学習している。我が国においても小学校でも遺伝子およびその実体であるDNAを指導する時代がすぐそこまで来ていると考える。そこで、我々はDNAの抽出実験をより簡単にし、小中学生でも可能な実験あるいは教師自身のバックグラウンド知識としてDNA抽出実験の簡素化に取り組むことにした。

研究レベルでのDNAの抽出方法としては、以下の手順がよく知られている(中山・西方 1995a & 1995b)。

- ① 液体窒素を使って生物組織を破碎する。
- ② 界面活性剤 Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) により細胞を破壊し、同時にDNAの沈殿に必要な塩を加える。塩は一部のタンパク質を沈殿させる効果もある。
- ③ 遠心分離機により不溶物(細胞の破碎物など)を除去する。
- ④ フェノール処理やクロロホルム処理によりタンパク質、糖類などを除去する。
- ⑤ アルコールを加えてDNAを塩析し、遠心分離により沈殿を得る。

フェノールやクロロホルムなどの危険薬品、液体窒素、および高価な遠心分離機は、教育現場での使用は難しい。しかも、かつては、材料として入手が難しい精巣やカイコの絹糸腺がよく使われていた。

しかし、森田（1997, 2003, 2005）は、高等学校の授業でも行えるように高価な機器や危険な薬品を使わず身近な器具を使い鶏レバーとブロッコリーからDNAを抽出する方法を開発した。（以下「森田法」とする。）具体的には、森田法では、

- ① 劇物であるクロロホルムの代わりに加熱によりタンパク質を変性させて不溶物とした。
- ② 遠心分離機の代わりに不溶物（細胞の破碎物、変性タンパク質など）をガーゼで取るなどした。

その後、森田法を参考に、伊左治・松本（2005）は、やはり鶏レバーとブロッコリーを材料に、高校の授業でDNAを抽出する方法を発表した。（以下「伊左治・松本法」とする。）この報告では、湯煎の代わりに電子レンジでも加熱して、タンパク質を変性させ除去できることを初めて紹介した。伊左治・松本（2005）は、安全性を考えるとガスバーナーを使う湯煎使用は避けたいが、電子レンジでは加熱度合いが分かりにくく、グループ実験には向かないと述べている。さらに、材料によってはDNAを抽出がうまくいかず、時間がかかるという課題を述べている（伊左治・松本 2005）。

そこで、本研究では、授業時間内で完結するために、より短時間にDNAを抽出できる方法（以下改善法とする。）の開発を目指した。その際、児童生徒には拒絶気味である鶏レバーではなく、ブロッコリー、さらにほかの野菜等を材料として、それらに中から一番有効な野菜等を探した。また、抽出したDNAが本当にDNAであるのか、児童生徒が理解しやすい確認方法の検証と改善も試みた。

II. 材料と方法

II-1. DNA抽出実験の材料

【器具類】 葉さじ、ガラス棒、ガーゼ、ビーカー（100ml×1, 200ml×1, 300ml×1）、おろし器、シャーレ、乳鉢と乳棒

【材 料】 鶏レバー、ブロッコリーの芽、タマネギ、カボチャ、ダイコン、キュウリ、ニンジン、バナナ、アボカド、ナス、リンゴ、トマト、アスパラガス、キウイ、ピーマン、シイタケ

【試薬類】 クリアクリーン（うがい薬：花王）、ファミリー（食器用洗剤：花王）、ジョイ（食器用洗剤：P&G）、キュキュット（食器用洗剤：花王）、スーパーマイルドシャンプー（洗髪用洗剤：資生堂）、キッチンハイター（台所用漂白剤：花王）、バスピカ（浴槽掃除用洗剤：ツムラ）、エマール（毛糸用中性洗剤：花王）、2M食塩水

【機器類】 電子レンジ（600W）

II-2. DNA確認実験の材料

II-2-1. 酢酸オルセインによる確認実験での器具・材料・試薬・機器等

ろ紙、ガラス棒、酢酸オルセイン

II-2-2. DNA分解酵素による確認実験での器具・材料・試薬・機器等

試験管、メスピペット、DNA分解酵素(DNaseI)

II-2-3. 分光光度計による確認実験での器具・材料・試薬・機器等

ろ紙、漏斗、漏斗立て、マイクロチューブ、マイクロピペッター、分光光度計(HITACHI U-1800)

II-3. DNA抽出実験の方法

- ① 凍らせた材料をおろし器でおろした。なお、ブロッコリーの場合は乳鉢と乳棒で粒がなくなるまですりつぶした。
- ② ①で得られた破碎物を100mlビーカーに約20ml入れた。
- ③ ②に同量（約20ml）の冷えた食塩水と3滴ほど洗剤を加えた。

- ④ を氷水で冷やししながら3分間よくかき混ぜた。
- ⑤ ④を600Wの電子レンジで25秒間加熱した。なお、鶏レバーの場合は途中でかき混ぜながら全体が白っぽくなるまで加熱した（約5分）。
- ⑥ 200mlビーカーの上に4枚重ねにしたガーゼを置き、⑤を濾過した。
- ⑦ ⑥を氷水で3分間ゆっくりと冷やした。
- ⑧ ⑦を氷水から取り出し、⑦の溶液の2～3倍量の冷エタノールを、ガラス棒を使って、ゆっくりと加えた。
- ⑨ 浮いてきた白い繊維状の物（DNA）を観察した。DNA量についても目測で検討した。

II-4.DNA確認実験の方法

II-4-1.染色による確認実験

- ① 本法によって抽出した繊維状の物をガラス棒で巻き取った。
- ② ①をろ紙の上のにせ風乾させた。
- ③ ②に酢酸オルセインを垂らし、再び乾燥させた。
- ④ ③を、ろ紙ごと、2分間熱湯の中に入れ、ピンセットを用いて取り出した。
- ⑤ ④を風乾させた。
- ⑥ ろ紙の上のにせ乾燥させた繊維状の物が赤く染色されたか確認した。

II-4-2.DNA分解酵素による確認実験

- ① 本法によって抽出した白い繊維状の物をガラス棒で巻き取った。
- ② 巻き取った繊維状の物についているエタノールをろ紙で吸収させた。
- ③ 繊維状の物を蒸留水20mlに溶かした。
- ④ ③を2本の試験管に分注した。
- ⑤ 2本のうちの1本にDNA分解酵素（DNase I）を加え、37℃の湯煎で5分間反応させた。
- ⑥ 各々の試験管に冷エタノールを20ml加えた。
- ⑦ DNA分解酵素を加えた試験管では、繊維上の物が分解されることから、繊維状の物はDNAであったことを確認した。

II-4-3.分光光度計による確認実験

- ① 本法によって抽出した繊維状の物をガラス棒で巻き取った。
- ② 巻き取った繊維状の物についているエタノールをろ紙に吸収させた。
- ③ マイクロチューブに蒸留水を1ml入れた。
- ④ ③にエタノールを吸収させた繊維状の物を溶かした。
- ⑤ 漏斗に折ったろ紙を入れ、蒸留水をかけた。次に④の溶液をろ過した。
- ⑥ 分光光度計用のセルに蒸留水と⑤を少量加え混合した。
- ⑦ 分光光度計（波長230nm～340nm）で吸光度を測定した。

Ⅲ. 結果および考察

Ⅲ-1. DNA抽出実験

図1および図2で示すように、本法（改善法）でブロッコリーからDNAを抽出した。比較のために、森田法および伊左治・松本法でもブロッコリーからDNAを抽出した。その結果を表1にまとめた。

本法では、電子レンジを使用したことにより加熱時間を短縮することができた。同様に電子レンジを使う伊左治・松本法や、湯煎を使う森田法に比べて大幅な短縮となっている（表1）。伊左治・松本法では電子レンジでの過熱度合いの難しさを指摘しているが、本法ではこの問題点は観察されず、安定してDNAを抽出することが出来た。ただし、電子レンジについては、容量（内部の体積）が様々であり、この実験条件が必ずしも適切とは言えない。機器ごとに条件を設定する必要がある。その際に、定められた加熱時間を設定できる電子レンジ、つまり、秒単位や5秒単位で時間を設定できるものを用いることが望ましい。また、伊左治・松本法の加熱が2回であったが、これを1回にした。目視では、本法は伊左治・松本法よりもDNAがより多く抽出できた。理由として、DNAが壊れるのを防ぐことで抽出されるDNA量が増えたことが考えられる。森田法や伊左治・松本法よりも大幅に時間を短縮し、20分前後で実験することができる点は重要である。このことにより、1時間の授業（50分間）でも余裕を持って実験を行うことができるようになった。

次に、本法により、各食物材料約20gから抽出される量の比較を行った（表2&3）。ろ紙を用いて乾燥重量を測定し、30mg以上を+++、10～30mgを++、10mg以下を+とすると、材料の違いとDNA抽出量の関係を測定した（表3）。抽出された量に差はあるもののすべての材料において、DNAが抽出できた。特に、鶏レバー、ブロッコリーの芽、タマネギ、キウイはたくさんのDNAを抽出することができた。これらはおそらく、体積当たりの細胞数が多いためであると思われる。これらの材料は1年を通して手に入れやすく、安く購入できるので実験材料として適している。

また、バナナやアボガドなどもDNAを抽出することができたが、これらは、デンプンなどの不純物が多く含まれていることから、実験材料としては適していないと思われる。バナナやアボカドなどから、不純物の少ないDNAを抽出するには、更なるDNA抽出法の改善が必要であると思われる。

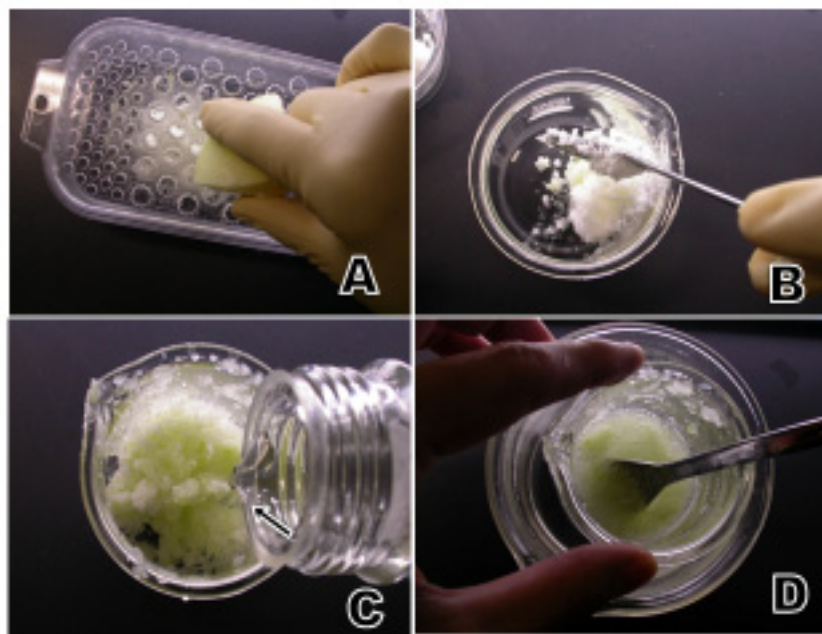


図1. DNA抽出実験改善法手順その1

- A. 凍らせておいた材料をおろし器で適量おろす。
- B. 得られたものを100mlビーカーに約20ml入れる。
- C. 同量の冷えた2ml食塩水（矢印）と各種家庭用の洗剤を3滴ほど加える。
- D. 氷水で冷やしながら3分間よくかき混ぜる。

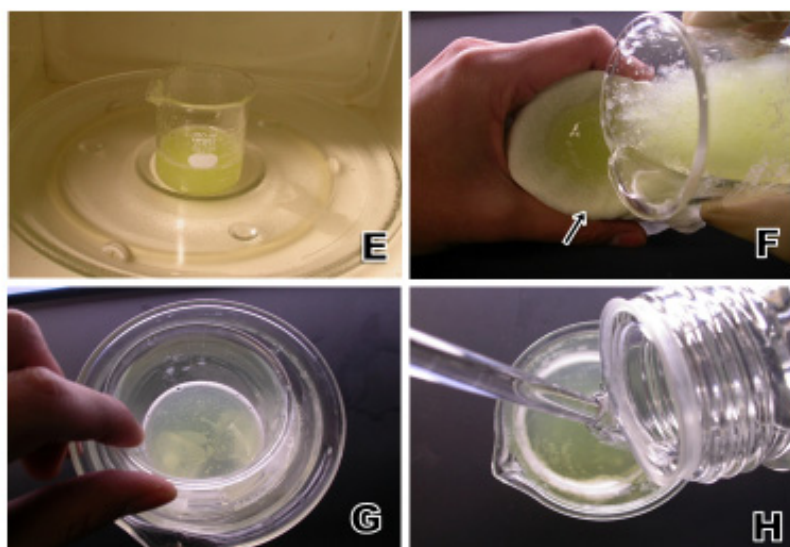


図2. DNA抽出実験改善法手順その2

E. かき混ぜた物を600Wの電子レンジで25秒間加熱する。

F. 200mlビーカーの上に4枚重ねのガーゼ(矢印)を置き、ビーカの内容物をろ過する。

G. ろ過したものを氷水で3分間ゆっくりと冷やす。

H. ビーカーを氷水から取り出し、溶液の2～3倍量の冷エタノールをガラス棒を使ってゆっくりと加え、浮いてきた白い繊維状の物(DNA)を観察する。

表 1. 簡易DNA抽出法比較


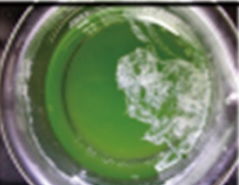

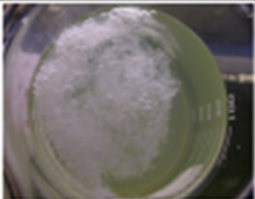
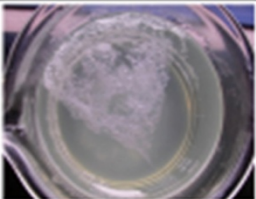

	森田 (1997)	伊佐治・松本 (2006)	本研究
材料	ブロッコリー	ブロッコリー	ブロッコリー
加熱方法	湯煎 (100℃)	湯煎 (100℃)	電子レンジ 600W
加熱時間	5分と3分	5分	25秒
ろ過方法	ガーゼとろ紙	茶こし	ガーゼ
抽出時間	60分	30分	20分
抽出結果			

表 2. DNA抽出量比較

材料	タマネギ	ダイコン	ハクサイ
抽出結果			
乾燥重量	30mg以上	10～30mg	10mg以下
	+++	++	+

学校現場でDNAを抽出するときは、収量が多い鶏レバー、ブロッコリーの芽、タマネギ、キウイ等を用いることで、視覚的にDNAを捉えさせることができ、DNAを身近に感じ興味・関心を持たせることができるのではないかと思われた。白い糸状の物質であるDNAは、その後のDNA確認実験に使用することもできた。ただし、鶏レバーにおいては、実験の過程で加熱処理を行うため、鶏レバー独特の悪臭が発生した。DNAを単に視覚的にとらえることが目的であるならば、鶏レバーではなく、野菜を用いた方が、臭いもせず生徒も実験をスムーズに行うことができると思われた。また、班ごとに違う材料を用いて抽出実験を行い、情報交換することですべての植物・動物にはDNAがあることが、視覚的に理解できると思われた。さらに、食物材料によって含有DNA量は違うことも学習できると思われた。

本法を用いて、タマネギを材料に8種類の洗剤の違いとDNA抽出量の関係を調べた(表4)。これを見ると台所用洗剤では、たくさんのDNAを抽出できたことが判明した。それは、他の洗剤に比べて強力な界面活性剤を含んでいるため、たくさんのDNAを抽出できたのではないかと思われた。また、塩素系のキッチンハイターを用いて実験を行った際、塩素のきつい臭いがしたため、実験には適していないと思われた。また、塩素系漂白剤は皮膚に付着した時に害があることから、適していないと思われた。今回はアルカリ性洗剤(マジックリンなど)を試さなかったが、色々取り扱いに注意が必要なアルカリ性洗剤を用いる必要がないことがわかった。すなわち、小中学校の授業で行うには、中性の台所用洗剤が適していると結論された。なお、洗剤は新たに購入する必要はなく、界面活性剤の代わりに学校にある市販の台所用洗剤をほんの少量使用することで低コストに抑えることができると思われた。

表 3. 材料の違いとDNA抽出量の関係

材料	DNAの量	材料	DNAの量
鳥のレバー	+++	ピーマン	++
ブロッコリーの芽	+++	アスパラガス	++
タマネギ	+++	リンゴ	++
キウイ	+++	アボカド	++
ダイコン	++	キュウリ	+
トマト	++	ハクサイ	+
カボチャ	++	シイタケ	+
バナナ	++	ニンジン	+

表 4. 洗剤(界面活性剤の代用)の違いと改善法によるDNA量の関係

市販の洗剤	DNA量
ジョイ(台所用洗剤)	+++
ファミリー(台所用洗剤)	+++
キュキュット(台所用洗剤)	+++
クリアクリーン(液体は磨き)	++
スーパーマイルド(シャンプー)	++
エマール(洗濯用洗剤)	++
バスピカ(浴室用洗剤)	++
キッチンハイター(台所用漂白剤)	++

III-2. DNA確認実験

III-2-1. 染色による確認実験

単離したDNAを酢酸オルセインで染色した（図3）。繊維状のもの全てが濃く染まっていることから、抽出したものにDNAが含まれることは明らかである。よって、本法によって抽出されたDNAは、酢酸オルセインによる確認実験が可能であるといえる。この方法は、中学校生徒が体細胞分裂を観察する時に使用する酢酸オルセインをすでに使っているため、生徒にも直感的に抽出したものはDNAであると理解しやすい。また、この確認実験は酢酸オルセインとろ紙があればできるので、生徒1人1人で行うことができ、小中学生でも安全で理解しやすい方法であると思われた。

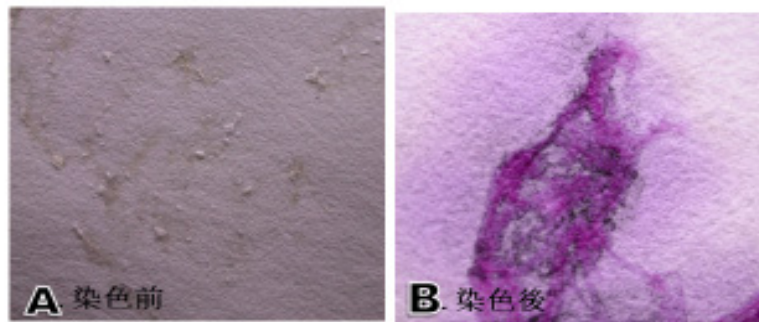


図3. 酢酸オルセインによるDNA確認実験

採集DNAをろ紙に付着，乾燥後，酢酸オルセインによる染色を確認した。A. 染色前，B. 酢酸オルセインによる染色後。

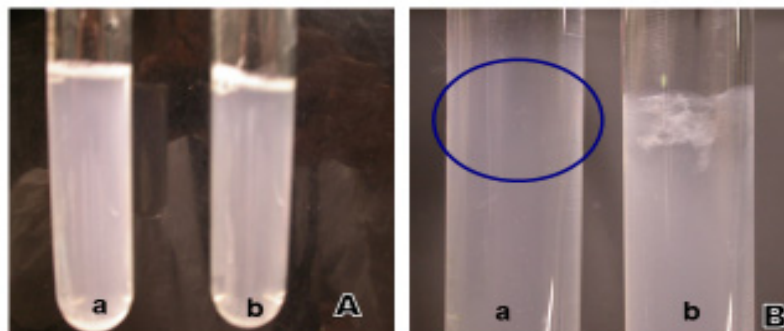


図4. DNA分解酵素を使ったDNA確認実験.

A: 反応前,aにはDNA分解酵素を入れた. B: 反応後, 枠の様に分解酵素を入れたaではDNAは特異的に分解された. 試験管a. DNA溶液+DNA分解酵素. 試験管b. DNA溶液

III-2-2. DNA分解酵素による確認実験

次に、DNA分解酵素による影響を確認する実験を行った（図4）。これを見ると、DNA分解酵素を入れた試験管は、白い繊維状のものは分解され見えなくなった。このことにより本法によって抽出されたDNAはDNA分解酵素によって分解されたといえる。よって、本法によって抽出された白い繊維状のものはDNAだと確認された。

III-2-3. 分光光度計による確認実験

分光光度計とは特定の波長の光を試料に当て、吸収される光の波長や強さを調べることでその物質の吸光度や濃度を測定する分析装置である。

DNA溶液（蒸留水にDNAを溶かした溶液）は、波長260nmの紫外線をよく吸収する性質がある。また、タンパク質溶液は、280nmにおける吸光度がその濃度の基準とされる。このことから、波長

260nmの吸光度（A260）／波長280nmの吸光度（A280）を計算しその値が1.8以上ならばタンパク質の混在が少ない純粋なDNA溶液だとされている。

本法で抽出したDNAの分光光度計の結果は、図5である。これを見ると、およそ260nmで吸収極大が見られ、DNA溶液特有の吸光を示していることから、抽出されたものはDNAであるといえる。また、 $A_{260nm}=0.317$ 、 $A_{280nm}=0.180$ であるので、 $A_{260}/A_{280}=1.76$ である。この値は1.8に近いことから、改善法で抽出されたDNAはたんぱく質の混在が少ない純度が高いDNAだということが判明した。フェノールやクロロホルムによるタンパク質除去を行っていないことを考慮すると、抜群の結果であった。

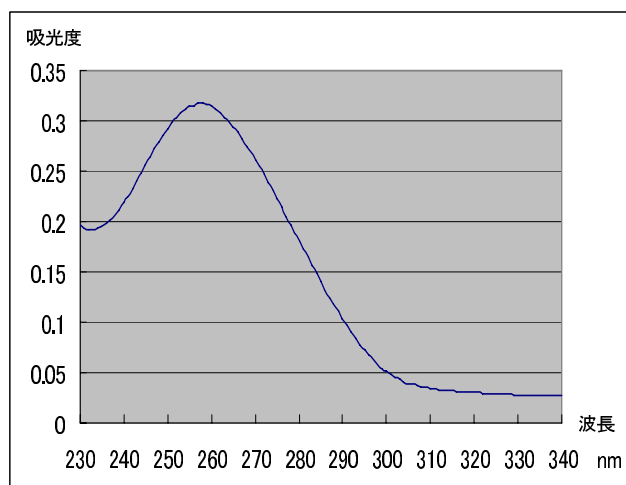


図 5. 本実験改善法によってタマネギから抽出され DNA 溶液の吸収スペクトル

IV. まとめ

IV-1. DNA抽出・確認方法の検討

今回開発したDNA抽出方法は、ガスバーナーや危険な薬品を使用しないため安全な方法だといえる。ただし、ビーカーなどのガラス器具を使用するので割らないように注意を促さなければいけない。ガラスは正の電荷を帯びており、DNAと結合するため、DNA精製実験にガラス器具を用いることは一般的ではない。しかし、本法により、多量のDNAが精製できることから、その影響は軽微であった。器具、材料などは手に入れやすく、おろし器は100円均一で購入したものを主に使ったが、試しに金属性のおろし金を使ったら効果大であり、細胞壁、細胞膜の破壊が進んで、DNAの抽出が容易になった結果と理解された。材料についても、必要なのは1班20g程度なので、ブロッコリー、タマネギ、キウイは大差はなかった。特に、たまねぎ1個で2～4班分の材料になるので数百円以下で十分購入可能である。台所用中性洗剤は最も好成績だった。家庭科教室などから借用等でコストを抑えられる。また、改善法では森田法、伊左治・松本法に比べ時間が短縮できているのでDNA抽出実験と酢酸オルセイン（カーミン）を使ったDNA確認実験であれば1授業時間内で行えた。もし、時間が足りず確認実験ができない場合は、エタノールをいれたマイクロチューブなどの容器に抽出したDNAを中に入れ冷蔵庫に入れて保存、後日確認実験をすればよい。

DNA確認実験については、DNA分解酵素、分光光度計などを使用するため、コストがかかってしまう。DNA分解酵素は、1vial (11mg) で17000円とコストがかかってしまった。しかし、授業ではDNAであることが確認できれば良いことから、DNA分解酵素や分光光度計を使わずとも酢酸オルセイン染色による確認実験だけで十分であると思われた。使用する試薬も酢酸オルセイン(酢酸カーミン) だけであるので低コストに抑えることができる。また、安全性についても危険な試

葉などは一切使用しないため、安全であるといえる。また、その他の確認実験については必要な試薬や、機器類があれば行えばよいので、ここでは発展実験に留める。

IV-2. 実験の位置づけ

このDNA抽出実験の最大の目的は、DNAを視覚的にとらえ、DNAに興味を持ってもらうことにある。つまり、この実験を通してDNAに関心を持ってもらい遺伝子学習のスタートにしたいということである。

平成29年告示中学校理科学習指導要領では、単元「生命の連続性」で細胞分裂、生殖、遺伝について学ぶことになっている。その単元の発展的学習としてこの実験を行えば、遺伝の規則性と遺伝子について興味を持って取り組むことができる。

遺伝は、多くの生徒にとって難解な印象を与え、DNAに対する正しい理解を養えないことが多い。実験を通してDNAを自分の目で確認し、身近なものとして実感させ興味を持たせることは、重要である。そうすることで、DNAを念頭に置いた生物学学習の第一歩につながるのではないだろうか。

なお、本実験を指導する際、教員はDNA抽出・確認の原理を知っておく必要がある（中山・西方1995a & 1995b）。

- ① おろし器を使うのは、細胞壁等の破碎であり、できれば金属製のおろし金を薦める（図1-A）。
- ② 低温で行うのは、DNA分解酵素の働きを抑える為である。しかし、短時間で実験を行えば、電子レンジにかける前に冷やすことは必要ないかもしれない。一方、加熱後に冷やすことは重要である。熱い溶液を冷やすことが安全上重要であるし、また、分子の動きが遅くなることで、DNAが沈殿しやすくなるからである（図2-G）。
- ③ 家庭用の洗剤は一種の界面活性剤であり、リン脂質が主成分である細胞膜や核膜を溶かす（図1-C）。
- ④ 食塩水を使う処置は豆腐を固めるのと同じ一種の塩析であり、不要なタンパク質を固めて除去しやすくなる。しかし、より重要なのは、食塩の正の電荷が、DNAのリン酸基（負に帯電）と作用することで、エタノールによるDNA沈殿を引き起こすことである（図1-C）。
- ⑤ エタノールを加えるのは、DNAやRNAなど核酸の水溶液にエタノールを添加し、加えた食塩の助けも得て、溶解度を低下して目的物質を沈殿分離する手法である（図2-H）。
- ⑥ DNAはマイナスイオンを帯びるリン酸基を多く持っているために、プラスイオンを帯びる塩基性色素（酢酸オルセイン溶液など）と引き合うことになる（図3-B）。
- ⑦ DNAは、分光光度計で波長260nmの紫外線（UV-C領域）を特異的に吸収するという事は、クリーンベンチで使われる紫外線もその波長であり、すべての生物はその波長の紫外線に強く影響されることが理解される（図5）。太陽からの危険な紫外線を防いでくれるオゾン層の破壊は、人類の危機となる。

今回開発した改善法を用いて授業実践を行い、DNAに興味・関心をもたせ、小中学校での遺伝子学習の糸口にして行きたい。さらに、今回提案した改善法によって抽出されたDNAを使い、組換え実験を開発し、その教材化も考えて行きたい。

謝辞

ご助言して下さいました佐賀大学総合分析実験センター永野幸生先生にお礼申し上げます。

また、環境基礎講座の元教授の中島道夫氏には、分光光度計操作のご指導をして頂いた。最後に、温かい励ましをくださった研究室の佐保善隆さん、和家遼太郎さんに厚くお礼申し上げます。

引用文献

Badders, W. et al. 2007a. Houghton Mifflin Science grade5. ,608pp, Houghton Mifflin, Boston.

Badders, W. et al. 2007b. Houghton Mifflin Science grade6. ,658pp, Houghton Mifflin, Boston.

伊左治錦司・松本省吾. 2005. 高等学校におけるDNA簡易抽出実験に関する教材開発. 岐阜大学教育学部
研究報告・教育実践研究 7 : 69-78.

森田保久. 1997. WebページDNA抽出実験 (<http://homepage3.nifty.com/ymorita/DNAext.htm>)

森田保久. 2003. WebページDNA確認実験 (<http://http://homepage3.nifty.com/ymorita/DNAexc.htm>)

森田保久. 2005. Webページ「森田保久の高校生物関係の部屋」(<http://morita.la.coocan.jp/a/humanDNA/humanDNA.htm>)

中山広樹・西方敬人. 1995a. バイオ実験イラストレイテッド〈1〉分子生物学実験の基礎, 171pp.
秀潤社, 東京.

中山広樹・西方敬人. 1995b. バイオ実験イラストレイテッド〈2〉遺伝子解析の基礎, 193pp. 秀潤社,
東京.