一歩進んだ生物学実験

実験場所：東京文京センター

実験日：2019/10/26,27

学生番号：181-071989-3

氏名　長島秀暢

目次

第1日目

１．動物・植物組織の観察とデジタルカメラ記録

２．植物組織・動物細胞標本の作製とデジタルカメラ記録

３．クラミドモナスの走性と精子遊泳運動の観察

４．画像を含んだ文書あるいはスライドの作製

第2日目

１．核酸の抽出

２．DNAの分析

３．PCR法によるDNAの増幅

４．電気泳動によるDNAの分離

第1日目

１．動物・植物組織の観察とデジタルカメラ記録

　顕微鏡の使用の仕方を学ぶ。拡大倍率は対物レンズと接眼レンズの倍率の籍であるが、対物レンズの性能の方が重要である。対物ミクロメーターと接眼ミクロメーターからより正確な計測が可能となる。維管束を観測した。

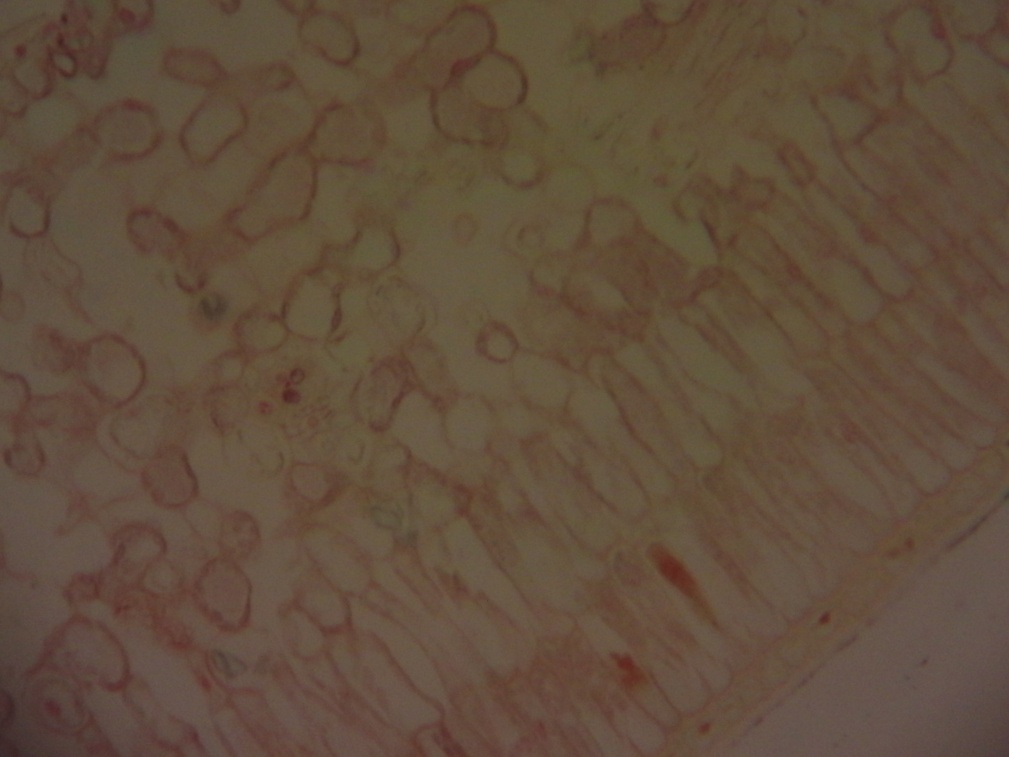


図1-1. 維管束の縦断面



図1-2. 維管束の横断面

２．植物組織・動物細胞標本の作製とデジタルカメラ記録

　ヤツデの葉を切り取り、葉脈部の横断面を観察した（図2-1）。標本にあるような維管束を上手く観察できなかった。手技の鍛錬の重要性を感じた。



図2-1

　また、葉の裏面の気孔を確認しようとしたが、できなかった（図2-2）。



図2-2

　STAP細胞で話題となった小保方氏は、「特殊な手技が必要」と確かコメントされていた記憶だが、細胞を見るのにも手技は重要なのだろうと実際に実習を行って理解できた。

　また動物細胞の確認ということで、口腔内から綿棒を用いて採取したヒトの粘膜細胞を染色し観測した（図2-3）。

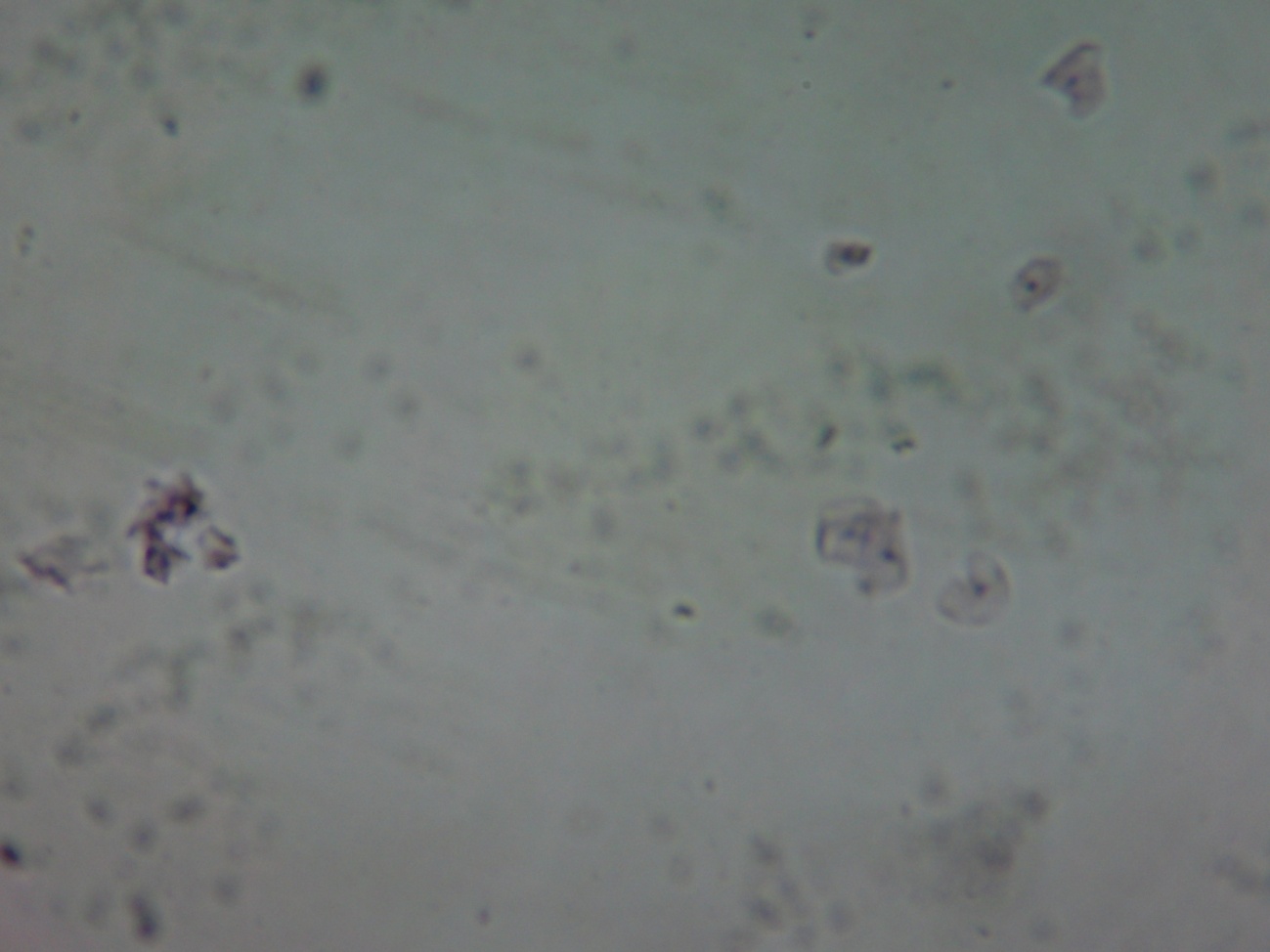


図2-3

動物細胞では植物細胞と異なり、細胞壁をもっていないため、形が様々であった。

３．クラミドモナスの走性の観察

モデル生物であるクラミドモナスを用いて、光の走性の確認を行った。暗室を黒色の紙を用いて作成、１か所に光源が入るように設計する。シャーレに入れたクラミドモナスを暗室に入れ、LED光源を用いて一方向のみから光が差し込むようにして10分待つ。

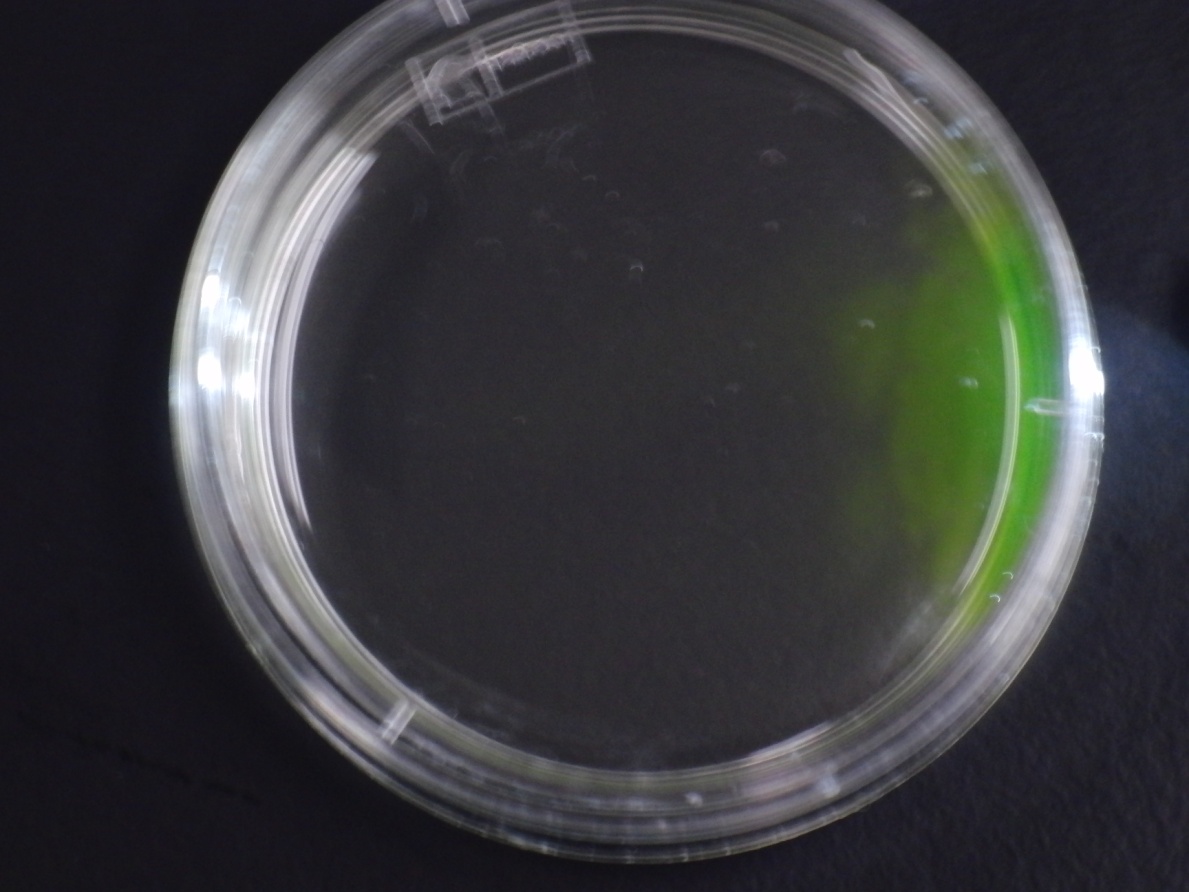


図3.1

　結果は図3.1に示すように光が差し込む一方向にクラミドモナスが集中しているのが確認できた。

　クラミドモナスは葉緑体を持つことから、光への走性があると考えられる。

４．精子遊泳運動の観察

　ニジマスの精子を用いて、その運動の開始とメカニズムを探索する。ニジマスの精子は通常、精巣内に貯留されており、その環境下では運動は開始されず、ある一定の環境下やシグナル（刺激）によって運動を開始すると考えられる。

　ニジマスが淡水魚であり、精子血漿中ではカリウムイオンが非常に高いことが知られている。そこで、以下の条件の下で、ニジマスの精子が運動を開始するかを確認する。

0．淡水

1. 生理食塩水

2. 500mM塩化ナトリウム水溶液

3. 50mM塩化カリウム水溶液

4. 800mMマンニトール液

　実験の結果、淡水では精子の運動を確認でき、生理食塩水でもやや動いていることを確認した。しかし、500mM塩化ナトリウム水溶液、50mM塩化カリウム水溶液、800mMマンニトール液では精子の運動を確認できなかった。

　以上より、ニジマスの精子は、①カリウムイオンの存在しない下で、②浸透圧が淡水と同程度であるという二つの条件がそろえば、ATPを使用して遊泳運動を開始すると考えられる。

第2日目

１．核酸の抽出

　DNAは核内に存在しており、細胞壁、細胞膜を破壊してそれらを抽出する。方法は課題内に含まれているので、そこで示す。

２．DNAの分析

　透過度から、分光光度計を用いてDNAが採取した試料内に含まれているのかを確認する。透過度はランバート・ベール則が成立することが前提となる。またファーストブラスト染色による確認を行う。

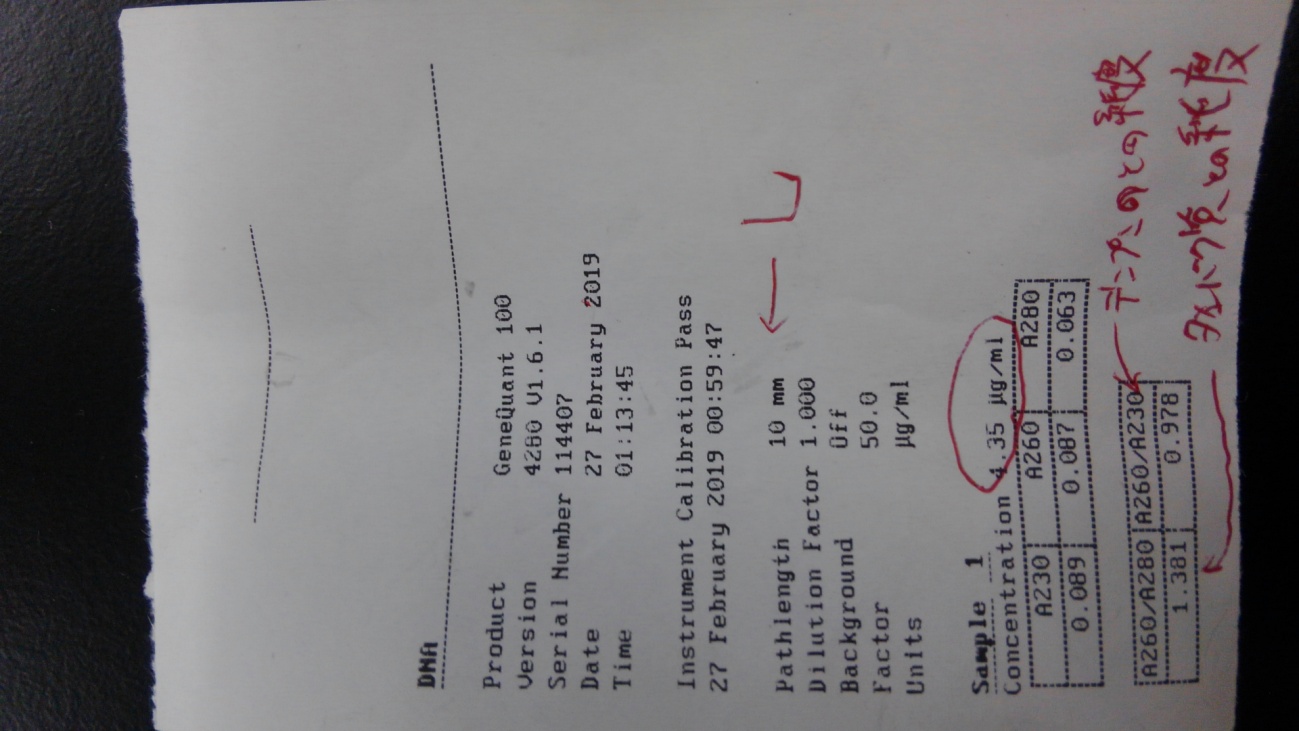


図2-1

吸光度測定結果。260nmが核酸の数値である。濃度など異常はないことを確認した。

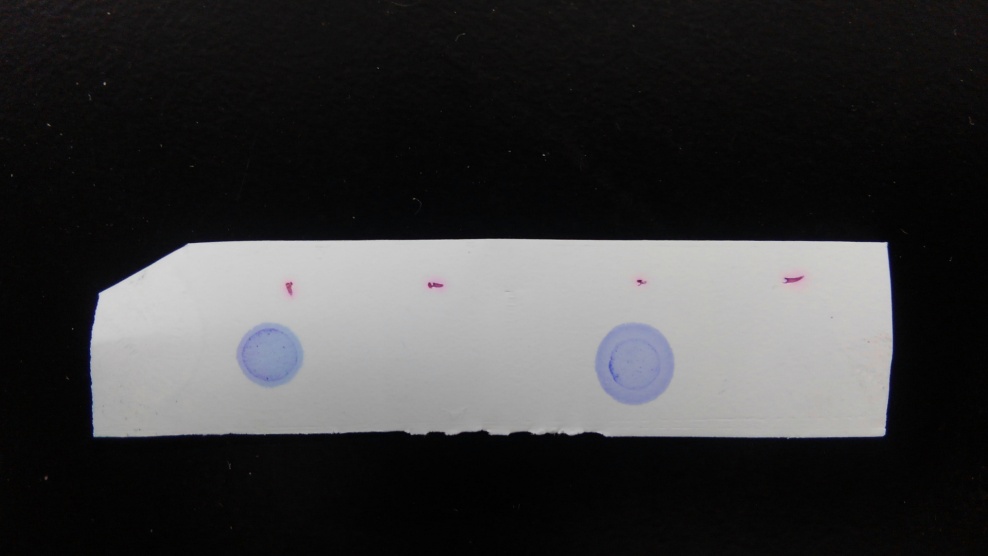


図2-2

　ファーストブラスト染色においても、採取した試料にDNAが含まれていることが確認できた。右から水、標準DNA、BSA（標準タンパク質）、抽出したDNAである。

３．PCR法によるDNAの増幅

　Taqポリメラーゼを用いて、９４℃の変性と５５℃でのアニーリング、７２℃でのポリメラーゼの伸長反応を行う。

４．電気泳動によるDNAの分離

　PCR法によって伸長したDNAを電気泳動にかけて、増幅がきちんとされているか、バンドを見て確認する。また異物の混入がないかも確認できる。DNAは負に帯電しており、短いものから早く流れる傾向がある。

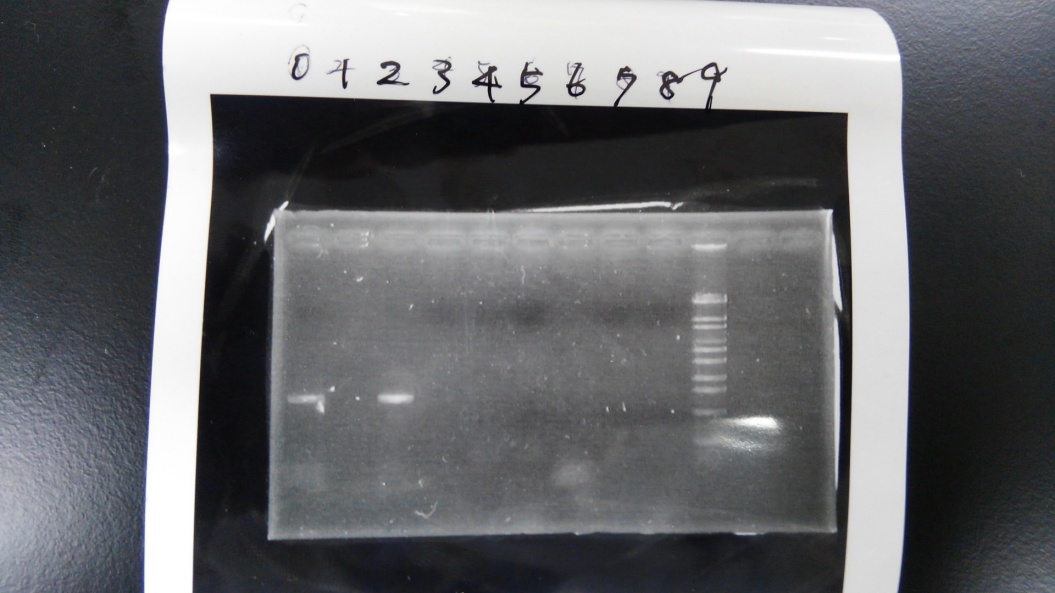


図4-1

　1番のバンドが現れず、残念であったが、自身の抽出したDNA（0番）はバンドが確認できた。

レポート必須課題

1. PCRによるDNAの増幅はどのレーンで観測できましたか？増幅されるためには何が必要でしょうか？

　バンドからプライマー、dNTP、バッファー、DNA、酵素がない状態だとバンドが現れていない。またpositive controlから確認できるように、これらが存在する下ではバンドは現れている。よってプライマー、dNTP、バッファー、DNA、酵素が必要だと考えられる。

2. 次のページの塩基配列のうち、アンダーライン部分は何を示しますか？

　テロメア領域と考えられる。

※本著者はプライマー（RNA）とプロモーターを混同していた。転写開始を示すDNAの領域をプロモーターと呼ぶ。プロモーターを目印として基本転写因子がDNAに結合し、その後RNAポリメラーゼがDNAに結合する。RNAポリメラーゼはDNAの塩基配列を基にRNAを合成する。

3. DNA染色に用いる呈色色素と蛍光色素の特徴を述べて下さい。

○呈色色素：ファーストブラストの色素

吸光する波長が変化することで発色する。

○蛍光色素：臭化エチジウム、GRR-500

紫外線（UV）は可視光線よりもエネルギーをもつ光のため、蛍光物質は励起をして光を発することで安定な状態になる。

4. 核酸の抽出実験を安全に行う上で注意すべき点を挙げて下さい。

　試薬にクロロホルムを使用しているので、手袋を装着する。

　臭化エチジウムが発がん性を含むため手袋を装着する。

　GRR-500も同様に手袋が必要。

5. 抽出実験のフローチャートを書け。

　以下に画像として添付する。

