

# 平成 27 年度工学部技術部奨励研究実施報告

齋藤希

生命資源研究・支援センター

## 1. 概要

中学校及び高等学校学習指導要領に当たって、観察及び実験を取り入れた学習の重要性が強調されている。しかし、教育現場では設備不足のため、生物基礎分野を含めその多くは、座学のための学習にとどまっている問題がある。

そこで、中高生を対象に実物の遺伝子を観察する生物実験教室を開き、生物学の興味喚起を図ることを考えた。今回の研究では、身近に感じやすいヒトの培養細胞や口腔上皮細胞の遺伝子を蛍光色素で染める最適条件を検討した。研究実績を平成 27 年度熊本大学総合技術研究会で発表し、今後、生物実験教室を開催する予定である。

課題名 生物学の啓発活動における簡便な遺伝子可視化の確立と実績

期間 平成 27 年 10 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

予算 250,000 円

## 2. 方法

### 1) 細胞の準備

DMEM 培地中に 2 日間、CO<sub>2</sub> インキュベーター（37℃）で培養した HeLa 細胞及び口から採取した直後の口腔上皮細胞を用いた。

### 2) RNA 染色

RNA 蛍光色素（SYTO® RNASelect™ Green Fluorescent Cell Stain, Thermo Fisher SCIENTIFIC）で染色後、緩衝液で 2 回洗浄した（各 1 分）。

### 3) 細胞の安定化（HeLa 細胞のみ）

DMEM 培地中に 5 分間、CO<sub>2</sub> インキュベーター（37℃）に静置した。

### 4) DNA 染色

DNA 蛍光色素（DAPI, Thermo Fisher SCIENTIFIC）で染色後、緩衝液で 2 回洗浄した（各 1 分）。

### 5) 固定（HeLa 細胞のみ）

(a) methanol 固定：冷却した 100% methanol 中に、10 分間、-20℃で静置した。

(b) formaldehyde 固定：4% formaldehyde 中に、15 分間、室温で静置した。

固定後、(a)(b)共に緩衝液で 2 回洗浄した（各 5 分）。

### 6) プレパラートの作成 固定していない細胞の封入剤として緩衝液を、固定した細胞の封入剤としてマウント液を用いた。

### 7) 観察

蛍光顕微鏡（ECLIPSE Ti-E, Nikon）にて、600 倍で観察した。DNA、RNA 蛍光色素の濃度及び染色時間、並びにプレパラートの封入剤について条件検討を行った。

### 3. 結果

HeLa 細胞及び口腔上皮細胞の最適な染色条件を見つけた（図）。

（最適条件）

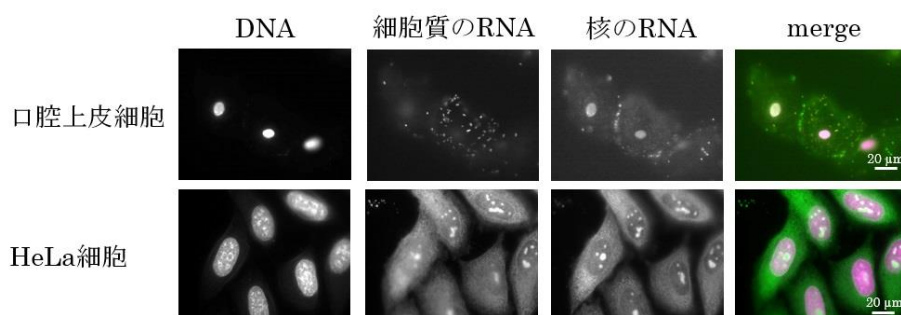
DNA 蛍光色素の濃度及び染色時間：0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 5 分

RNA 蛍光色素の濃度と染色時間：500 nM, 20 分

封入剤：緩衝液（細胞を固定しない場合）

染色した HeLa 細胞を methanol 固定した場合、生きた HeLa 細胞本来の RNA の局在を観察できた。一方、formaldehyde 固定ではその局在が変わってしまった。また、methanol 固定後、遮光しながら冷蔵保存すれば、蛍光の退色が少なく、3 日後でも観察可能であり、染色と観察の工程を数日に分けることが可能である。

今回の結果を踏まえて、今後中高生を対象にした生物実験教室を開催する予定である。



（図）最適条件で DNA, RNA を染色した口腔上皮細胞及び HeLa 細胞

### 4. 研究発表

齋藤希, 遺伝子可視化の簡便なシステムの開発, 熊本大学総合技術研究会, 平成 28 年 3 月 8 日

### 5. 謝辞

実験実施に際して、理学部生命科学講座谷時雄教授及び研究室の皆様のご協力いただきましたこと、さらに、本奨励研究に採択していただきました村山伸樹元工学部長他関係者に深く感謝いたします。