

日本生物学オリンピック本戦2021鶴岡大会（山形）

大問2Aの問題解説 ver.2 (2021.09.21改訂)

JBOスタッフ（好きな生物 パンダ）

大問2Aの作成意図：コロナ禍で現地での実技試験が叶わない中、少しでも選手に実験をした気分を味わってほしいと思い作成しました。また、実験を行う際には、実験機材の使い方や原理、扱っている物質の性質を知った上で、さまざまに注意が必要であることが伝われば幸いです。

大問2A問題1

誤っている操作を全て選びなさい。正解1、4 または1、4、5（完全解答のみ4点）

1. 純水の採取量の設定→誤り。マイクロピペッターの設定が880 μL になっている。
2. 10倍濃縮制限酵素バッファの採取量の設定→正しい。
3. 制限酵素EcoRIの採取量の設定→正しい。
4. チップの先を手で触る→誤り。使用済みのチップの先には試薬がついており、試薬の混雑（コンタミネーション）を避けるため、触るべきではない。本問題では特に、試薬を採取済みのチップの先を触ったのちに、マイクロピペッター本体を触っており、不適切である。
5. チップの捨て方→100-1000 μL マイクロピペッターを使っている場面は、解説動画で示したとおりで正しい。なお、その後の2-20 μL マイクロピペッターを使う場面において、10倍濃縮制限酵素バッファを正しく採取したのち、ピペットの先を触って、画面が変わり、EcoRI制限酵素を正しく採取する場面があった。この流れで、チップを変えずに制限酵素を採取した、つまり「チップを捨てなかった」という点で、チップの捨て方を誤っている」と判断することも可能であると考え、5を誤りとした解答も正解とする。

大問2A問題2

原因として考えられるものを次の選択肢から3つ選びなさい。正解1、2、3（完全解答のみ4点）

1. ヒートブロックのSTARTボタンを押していない→原因として考えられる。実験装置にはメインスイッチとは別に、電源ボタン（STARTやON・OFFスイッチ）が存在する 경우가しばしばある。装置が作動しているかどうかは、客観的指標（この場合温度計）を用いて確かめる必要がある。

2. 温度計が故障している→原因として考えられる。もしブロックを触って暖かい場合は、別の温度計を使って測ってみよう。
3. ヒートブロックが故障している→原因として考えられる。24℃は常温なので、ヒートブロックが作動していない可能性が高い。
4. 部屋が寒すぎる→4℃のコールドルームで検討したところ、温度計は46-48℃を指した。原因としては考えにくい。
5. 温度計の挿す場所を間違っている→「均質なアルミからなるブロックを使用している」と問題文で述べている。どこに挿しても温度は均質であるので、原因としては考えにくい。

大問2A問題3

原因と対策として最も適切な組み合わせを1つ選びなさい。正解5（4点）2（2点）3（1点）

【原因】

- A. チューブが耐熱性でなかった→「チューブはポリプロピレン製で、研究室で汎用されているもの」と問題文で述べている。ポリプロピレン製の製品は120℃程度は問題なく使用できる。また動画における蓋の開く勢いから、チューブの耐熱性の問題ではないと考えられる。
- B. チューブの蓋がしっかり閉まっていなかった→可能性はあるが、なぜ勢いよく蓋が開いたのかを考えればDが直接原因と考えられるので部分点とした。
- C. チューブの蓋をしっかりと閉めすぎた→蓋はしっかりと閉められるようになっており、閉めすぎるということは設計上ない。
- D. チューブの内圧が高まってしまった→100℃に熱したことから、チューブ内の内圧が高まり、蓋が勢いよく開いてしまったと考えられる。

【対策】

- E. チューブを1分毎に冷やしてトータル10分熱する→動画で「100℃で10分間」といっているので、連続10分でなければならない。
- F. チューブの蓋が開かないように物理的にロックする→蓋の上に重量物をおいたり、蓋を開かせないような器具を使用することで、対策できる。
- G. チューブの蓋を手で押さえておく→100度に設定しているので。手で抑えると熱傷する。ビニール手袋をしていても同様。耐熱性の手袋をしている場合は、可能性はあるので部分点としたが、10分間押さえ続けることは現実的ではない。
- H. チューブの蓋を少し開けておく→100℃に設定しているので、水溶液が蒸発してしまい、サンプル量や濃度が変化してしまうので不正解。

1. AとE
2. BとF
3. BとG
4. CとH
5. DとF
6. DとH

大問2A問題4

明らかに誤っている操作を1つ選びなさい。正解 3 (5点)

1. 大腸菌溶液の分注の仕方→問題ない。動画はデカンテーションと呼ばれる分注方法。
2. 50mlチューブの蓋の閉め方→問題ない。
3. 遠心分離機内でのサンプルのセット→回転中心に対して対称に置くべきなので誤り。
4. 回転速度の設定→問題ない。
5. 時間の設定→問題ない。

大問2A問題5 正解1、2、5 (5点) 2、5 (3点)

誤っている操作を全て選びなさい。

1. コンピテントセルの溶かし方→「氷上で溶かす」となっているにも関わらず、常温のピペトラックにおいているので間違い。あらかじめ氷を詰めた発泡スチロール（アイスボックス）を用意しておき、そこに置くべき。溶かす過程は実際の動画ではなかったため、1を不選択の際も部分点を設けた。
2. プラスミドの採取量→プラスミド1 μg となっており、プラスミド濃度は200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ なので、5 μL 採取すべきである。動画では50 μL 採取しているため誤った動作である。
3. 大腸菌とプラスミドの混ぜ方→軽く混ぜるとあるので、問題ない。動画はタッピングという手法である。
4. インキュベーション（保温）時間→1分となっているので正しい。
5. インキュベーション（保温）温度→プロトコールでは42 $^{\circ}\text{C}$ となっていたが、動画では37 $^{\circ}\text{C}$ に設定されていたので誤り。

大問2A問題6 (各1点、満点6点)

Lysing solution		
NaCl	5 mol/L	1) 20 ml
EDTA	0.5 mol/L	2) 20 ml
Tris-HCl	1 mol/L	3) 20 ml
SDS	10 %	4) 25 ml
Mercaptoethanol	100 %	例) 2.5ml
Proteinase K	20 mg/ml	5) 5 ml
H ₂ O		6) 407.5 ml
500 ml		

大問2A問題7

ゲノムDNAの取り扱いとして不適切なものを全て選びなさい。正解1、2、3、4
(完全解答は5点) 部分点(正解1つ毎に1点 ただし5を解答に入れている場合は正解数による合計点からマイナス1点)

1. ピペット操作を激しく繰り返し、溶液を均一化させる→この後、制限酵素処理をするゲノムDNA(ヒト細胞)の取り扱いについて問うている。激しく力学的ストレスを加えると、ゲノムが分断化してしまい、制限酵素サイト以外でも切断されてしまうので不適切。
2. ボルテックスミキサー(電動攪拌器)で激しく混ぜる→上記と同じ理由で不適切
3. 保存の際は完全に乾燥させてから-20℃に保存する→ヒトゲノムのような長鎖DNAは、一旦乾燥させてしまうと容易には水溶液に再溶解しない。
4. 保存の際は98℃で10分間熱したのちに-20℃に保存する→ゲノムDNAを98℃で熱してしまうと、二本鎖DNAが開裂して一本鎖になってしまい、制限酵素が切断部位を認識できなくなってしまうので不適切。
5. 4℃で1週間保存する→DNAは安定な物質であり、DNA分解酵素の混入がない条件ならば4℃で長期保存することができる。

参考リンク：サイエンス系お役立ちメディアM-hub <https://m-hub.jp/biology/2332/137>

大問2A問題8

不適切な操作を4つ選びなさい。正解1、2、3、5 (完全解答のみ5点)

1. アガロース粉末の計量方法→バランス(計量計)の上にフラスコをおいて、直接アガロース粉末を加えているが、加える量をオーバーしてしまうと濃度

が変わってしまう。バランスディッシュ（薬包紙など）を用いて、1gを計量した後、それを加えるべきである。

2. フラスコサイズを選択→電子レンジで沸騰させた後は、突沸に注意すべきであるので、ギリギリのサイズを選択するのは不適切である。
3. アガロースゲルの冷やし方→フラスコごと水道水につけてしまうと、フラスコと接する部分が短時間で固形化してしまう。また、高温のガラスを水道水などで急に冷やすと、ガラスが急に収縮して割れてしまうことがある。実験用のガラス器具は耐熱性の良いガラスを使っているとはいえ、水で急冷するのは良くない。
4. ゲルキャストに流し込むアガロース溶液の量→コームを挿したときにDNA溶液を流し込める程度のウェル（穴）ができれば良いので、厳密な計量は必要としない。器具（例えばピペット）を使って計量してしまうと、器具上でアガロースが冷えてしまったり、アガロースの粘性のために量が減ってしまう。説明動画でも同様の流し込みシーンを見せている。
5. コームの抜き方→固まったからといって、急速にコームを抜くと、ウェルの形が崩れたり、陰圧のため穴が開くことがある。コームを抜く時は両端を持って、ゆっくり垂直に引き上げる。

大問2A問題9 正解3（5点）

原因として最も考えられることを1つ選びなさい。

1. ゲルキャストを置く向きが逆であった→逆であっても色素は陽極方向に流れる。
2. 電極を逆に差し込んでいた→逆であっても色素は陽極方向に流れる。
3. 電源が入っていなかった→ウェル付近から動いていないので、電源が入っていないと考えられる。泳動実験の際には、電気をON（START）したのちに、電極付近の電線から細かい気泡が出ている（電気分解による）のを確かめよう。気泡が出ていない場合は、電源が入っていなかったり、バッファの種類を間違えている場合がある。
4. ウェルに穴があいていた→穴が開いていても、色素は陽極方向に流れる。
5. 制限酵素によるゲノムDNAの切断が不十分だった→ゲノムDNAの切断が不十分であるとDNAが流れにくい可能性はあるが、色素は500bp程度の移動度なので、アガロースゲル中を移動できる。

大問2A問題10 正解2（5点）*Bという答えも正解（5点）とした

1)~5)の中から正解を1つ選びなさい。

1. プローブA
2. プローブB

3. プローブC
4. プローブD
5. プローブE

親株との比較から、クローン1は対立遺伝子の片方でゲノム編集が成功したと考えられ、クローン2は対立遺伝子の両方でゲノム編集が成功したと考えられる。

(出題者からのコメント) 理論問題では問題10のような、理論上確かな結果をもとに答えを導きます。一方、実際のサザンブロッティングは結果が出るまでに、数多くのステップがあり、今回大問2A問題5ー問題9ではほんの一部を紹介しました。その他には電気泳動の後にアルカリ処理、メンブレンへのトランスファー (DNAの転写)、プローブのラベルなどなど、結果が出るまでには数日かかりますし、問題10のようなクリアな結果が常に出るわけではありません。予想と反する (説明がつかない) 結果が出た時は、大発見かもしれませんが、単なる実験ミスかもしれません。その判断には、自分が何を扱って何の処理をしているのか、対象物質がどのような性質を持っているのか、実験器材は正常に作動しているのかなど、常に注意しておく必要があります。選手の皆さんが研究を始められるときの参考になれば幸いです。

参考図書：

イラストでみる超基本バイオ実験ノート 田村隆明 著

ISBN-13 : 978-4897069203

バイオ実験超基本Q&Aー意外に知らない、いまさら聞けない 大藤道衛 著

ISBN-13 : 978-4758120159

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 中山広樹 著

ISBN-13 : 978-4879621481