

## 日本生物学オリンピック 2014 本選 つくば



実験試験 1 動物学

制限時間 90 分

解答は全て、解答用紙に記入しなさい。

解答用紙は全部で 3 枚あります。

**その全てに受験番号と名前を記入しなさい。**

[注意]

これから試験を開始しますが、試験開始の合図があるまでは解答をはじめないでください。

## はじめに

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は、遺伝などの研究材料としてよく使われるモデル生物です。交配実験では未交尾の雌雄を集めておき、適切な遺伝子型の組合せをもった雌雄を同じ培地に移し入れることによって交配が開始されます。ここでは、ショウジョウバエの雌雄にはどのような違いがあるのか、またどのような工夫をすれば発生の早い段階で雌雄の区別が可能になるかを考えます。

## サンプルと器具

配布済みのピンセット 2 本を各自の持ち物から出さない。それ以外に実験で使用するのは、実体顕微鏡 1 台、光学顕微鏡 1 台、スライドガラス 5 枚、カバーガラス 1 箱、空のシャーレ 1 枚、スポイト 1 個、マイクロチューブ 5 本です。スライドガラスはプラスチックピーカーの中に、マイクロチューブはチューブラックにあります。これらがそろっていることを確認しなさい。

なお、マイクロチューブの中身は、リン酸緩衝液が 1 本（上面に P の表記）、ショウジョウバエの成虫が入ったサンプルが 3 本（上面に①～③の表記）、空が 1 本（上面に A の表記）です。マイクロチューブ A は解答として提出するためのものです。空のシャーレは必要に応じてマイクロチューブ内のショウジョウバエを出し入れするのに使ってください。

また、机の上においてあるキムワイプ、キムタオルは自由に使えます。

2 つのプラスチックピーカーは廃棄物用に使ってください。1 つはガラス用、もう 1 つは可燃物用です。

試験中に顕微鏡の光源がつかなくなったり、顕微鏡のレンズがよごれたらすみやかに申し出てください。

問題は第 1～3 部の 3 部構成になっていますので、全体に眼を通してから作業に取りかかってください。解答用紙はバラバラにしないでください。

試験終了後、問題用紙はお持ち帰りください。

### 評価項目

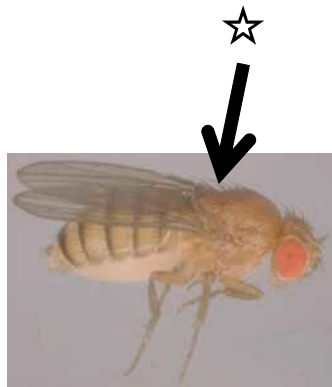
1. ショウジョウバエを解剖します。解剖とスケッチの技術进行评估します。
2. 野生型と変異体の中で形質の違いがつけられるかどうか进行评估します。
3. 幼虫の雌雄を簡単に判別するための工夫を考えてもらいます。

それでは解答をはじめてください。

## 第1部

野生型の雌雄（サンプル①）を実体顕微鏡下で観察しなさい。

**問題 1.** 胸部背面には比較的に目立つ剛毛が複数存在する。中胸小楯板（下図の☆印部分に見られる逆三角形あるいは半円形の構造）には剛毛がどのような状態で生えているか。剛毛基部の位置と剛毛の数、向きが分かるようにスケッチしなさい。



**問題 2.** 予備体験で学習したように、ショウジョウバエの成虫は雌雄間で腹部背板の色が異なっている。雌雄間で異なった外部形態を他にも2つ見つけ、その違いが分かるようにそれらの部分をスケッチしなさい。必要があれば、言葉による説明を加えてもよい。

## 第2部

野生型の雌雄（サンプル①）の腹部を、ピンセットを用いて解剖しなさい。予備体験と同様に、スライドガラス上にリン酸緩衝液を滴下し、実体顕微鏡下で解剖すること。その後、観察に不要な部分は取り除き、カバーガラスを被せ、光学顕微鏡で観察しなさい。解剖や観察に使用したスライドガラスは、サンプルおよび緩衝液を拭き取ることによって、何度でも使用できる。

雄を解剖したときに目立つ、黄色い1対の渦巻き状の器官は精巣である（場合によっては色が薄いことがある）。精巣の基部（渦巻きの中心側）は貯精囊（ふくらみのある黄色い部分）につながり、運動性を獲得した精子はここに蓄えられる。また、1対の半透明の袋である付属腺があり、交尾のときには精子以外にも付属腺から分泌されたタンパク質が雌の体内に受け渡される。

**問題 3.** 精巣・貯精囊・付属腺がどのようにつながっているか分かるように、スケッチし、これらの名称を記入しなさい。

雌を解剖したときに目立つ、1対の房状の白いかたまりは卵巢である。卵巢は十数本の卵巢小管からなるが、その中で卵母細胞が形成され、徐々に大きくなる。

**問題 4.** 卵巢中にある最も発達した卵の1つをスケッチしなさい。また、その方向が分かるように、スケッチ上でより若い卵母細胞が存在する側に☆印を記入しなさい。

左右の卵巢から出ている輸卵管（側管）はさらに後方で合一して、共通管となる。共通管には、透明で細長い管状受精囊（じゅせいのう）と2個（まれに3個）の茶色い受精囊が付属している。交尾をした雌では管状受精囊と受精囊に精子が蓄えられており、共通管に下りてきた未受精卵がこの開口部付近を通るときに受精が行なわれる。

**問題 5.** 茶色い受精囊の1個をスケッチしなさい。

### 第3部

ショウジョウバエが成虫になる前の発生段階で雌雄を分けるには、どのようにすればよいのだろうか。三齢（終齢）幼虫では精巣の方が卵巣よりも大きいので、雌雄を判別することができる。しかし、これには熟練を要するであろうし、発生のもっと早い段階で雌雄の区別が必要になることがあるかもしれない。そこで、X 染色体上にある劣性の遺伝子変異体 *white* (*w*) を利用することにする。野生型 (+) の成虫は複眼が赤いが、変異体 *w* は複眼が白い。サンプル②は *w* 系統の雌雄である。

+ と *w* の系統間では複眼以外にも異なった形質がある。例えば、頭頂部にある単眼は + 系統では着色しているが、*w* 系統では白色である。

**問題 6.** ショウジョウバエの単眼をスケッチしなさい。また、その並び方が分かるように、スケッチ上で頭部の前側に相当する部分に☆印を記入しなさい。

精巣やマルピーギ管も + 系統では着色しているが、*w* 系統では白色である。マルピーギ管は、透過光を用いれば幼虫でも簡単に外部から確認することができる。

**問題 7.** この形質を利用して + 系統と *w* 系統に関するある交配をすれば、生まれた幼虫の内部器官の色を確認するだけでその雌雄を判別することができる。交配の組合せとして適切な雌雄の成虫をサンプル③より 1 匹ずつ 選び、空のマイクロチューブ A の中に入れなさい。

**問題 8.** ショウジョウバエの雌雄を幼虫で簡単に見分けられるようにするための工夫を他にも考え、記述しなさい。

# 日本生物学オリンピック 2014 つくば

## 予備体験

実体顕微鏡の使い方と動物の解剖

時間 45 分

### 注意事項

顕微鏡の使用法でわからない点があれば、スタッフに質問してください。

ただし、解剖の方法、観察しているサンプルの各部名称等に関しては、スタッフは答えることができません。

## ショウジョウバエの外部形態の観察

1. 配布済みのピンセット 2 本を各自の持ち物から取り出してください。ピンセットは本選でも使いますので、先を曲げたりしないよう注意してください。
2. マイクロチューブ①内のショウジョウバエを空のシャーレに出します。
3. ショウジョウバエを 1 匹取り出し、実体顕微鏡のステージに置きます。このとき、ピンセットで翅（はね）をつまむようにすると操作しやすいです。
4. 実体顕微鏡\*を用いて、外部形態の各部を観察しましょう。
5. 複眼を拡大するとたくさんの個眼が集まってできている様子がわかります。ひとつひとつの個眼はどのような並び方をしているのでしょうか？

## \* 実体顕微鏡の使い方

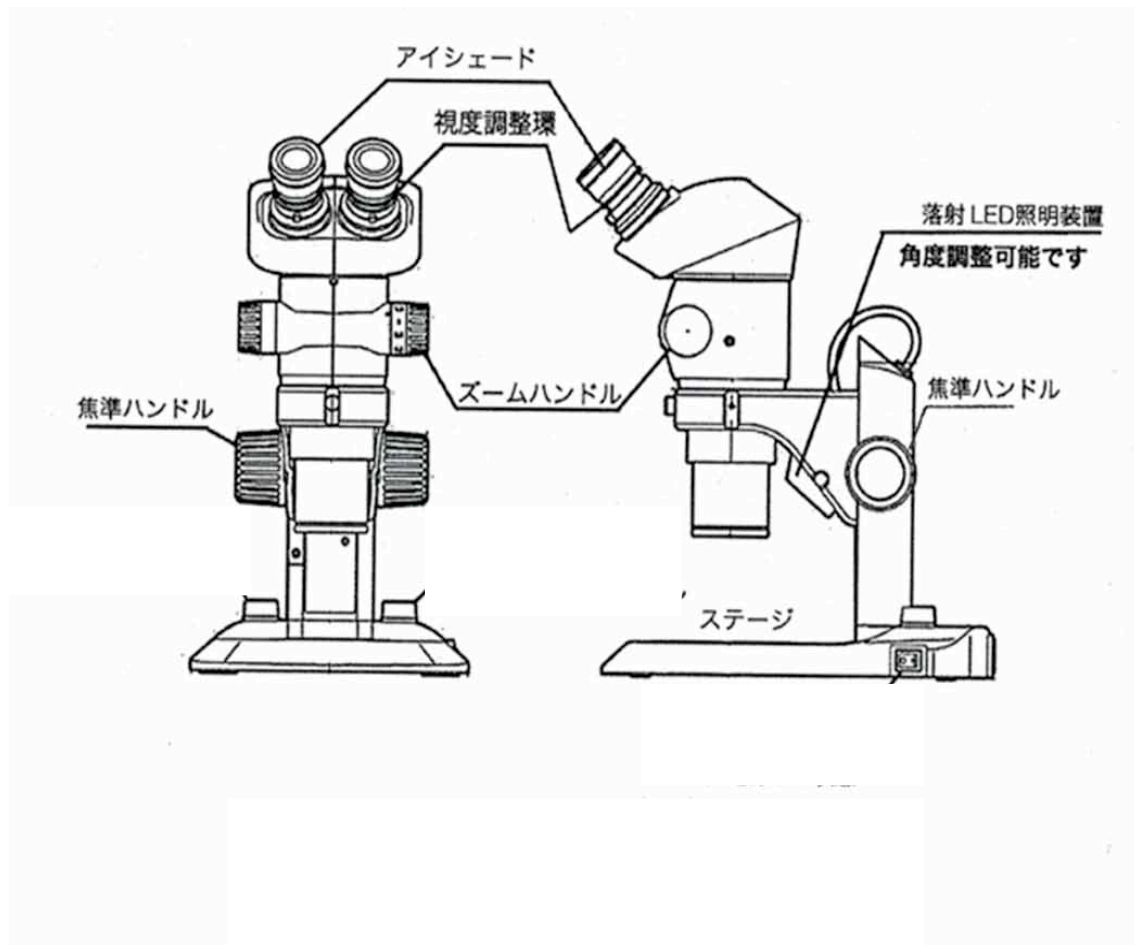
### 眼幅、視度調整

1. 眼幅、視度などは個人ごとに違いがあるので顕微鏡には各人の違いを補正する機能がある。
2. 眼幅調整：接眼レンズを左右に動かして自分の眼の幅にあった状態で観察する。左右の丸い視野像がひとつになった位置が正常な位置になる。
3. 視度調整：左右の眼のピントが違うので、まず右目で観察する標本に鏡筒を上下してピントを合わせる。鏡筒の位置をそのままの状態にして左目で覗き接眼レンズの根本にある視度補正環を回転させてピントを合わせる。

### 実体顕微鏡

1. 光源スイッチを ON にする。光量調節ツマミを回して適度な明るさに合わせる。
2. 角度を調整して、試料に光が十分当たるようにする。
3. 焦準ハンドルとズームハンドルを回して、ピントと倍率を調整する。





## ショウジョウバエの雌雄の判別

1. ショウジョウバエの成虫は雌雄間で腹部背板の色が異なります。
2. 雌では各体節の後端だけが黒いため、横縞模様に見えます。
3. 雄ではこれに加えて、第5・6背板の全体が黒くなっています。
4. シャーレに取り出したショウジョウバエの雌雄を判別してみましょう。

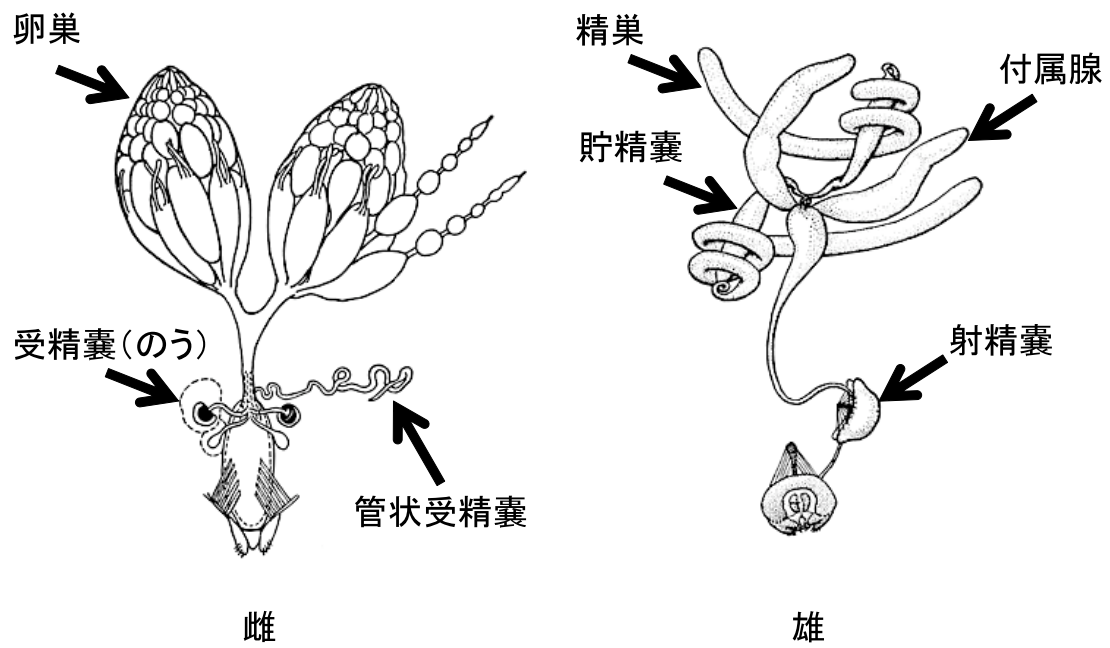


雌

雄

## ショウジョウバエの解剖

1. スポイトを用いてリン酸緩衝液（マイクロチューブ P に入っている）を 1 滴、スライドガラス上に落とします。
2. ショウジョウバエを 1 匹取り出し、スライドガラスの液滴上に置きます。このときピンセットで翅（はね）をつまむようにすると操作しやすいです。
3. 実体顕微鏡のステージに置き、ショウジョウバエにピントを合わせます。
4. 両手にピンセットを 1 本ずつ持ちます。
5. 片方のピンセット（利き手でない方の手で持っているもの）で腹部の前端（胸部の側）を挟んで固定します。このとき腹部の内部器官がピンセットで後部に押され、内圧のため腹部がふくれます。
6. もう 1 本のピンセット（利き手で持っているもの）で腹部の後端（体節 1 個分）を挟んで、引っ張ります。
7. 腹部後端がちぎれ、それに付着した形で内部器官が出てきます。
8. これがうまく行かなかった場合（内部器官が出てこなかった場合）、内部器官は前方の腹部内に残存しています。このときにはピンセットで腹部の体表をはがし、内部器官を露出させてください。
9. 下図のような内部生殖器が観察できるように、ピンセットで形を整えてください。
10. 何匹か解剖して、雌雄の内部生殖器の違いを観察しましょう。
11. 解剖や観察に使用したスライドガラスは、サンプルおよび緩衝液を拭き取ることによって、何度でも使用できます。
12. ピンセット 2 本は本選でも使用しますので、必ず持ち帰ってください。



Demerec, M., Kaufmann, B.P. (1950). *Drosophila* guide; introduction to the genetics and cytology of *Drosophila melanogaster*. 5th edition. より引用、加筆

# 日本生物学オリンピック 2014 本選 つくば



実験試験 2 進化生態学

制限時間 90 分

解答は全て、解答用紙に記入しなさい。

[注意]

これから試験を開始しますが、試験開始の合図があるまでは解答をはじめないでください。

## はじめに

アブラナ科のミヤマハタザオ (*Arabidopsis kamchatica*) はおもにアラスカ、シベリア、カムチャッカ半島、北海道、本州に分布します。中部地方では 30~3000 m という極めて広い標高帯の川沿い、林道沿い、岩場などの明るい場所に出現します。生息場所は大きくても数平方 km で明瞭な集団を構成し、集団と集団の間は地理的に不連続です。北方に分布中心がある植物であり、高標高ほど生育密度が高いのですが、どの集団も発芽・成長・開花・結実という同じ生活史をもち (図 1)、種子繁殖によって集団が維持されています。野外で数年にわたる調査を行った結果、高標高の集団は、数年以上生きて何度も繁殖する個体が多い典型的な多年草の生活史を示しました。一方で、低標高の集団は夏の個体死亡率が高く、大多数の個体が 1 年以内に死亡し生涯に 1 回しか繁殖できないという、一年草に近い生活史を示しました。このように集団間にさまざまな違いがありますが、お互いに交配可能な同種です。

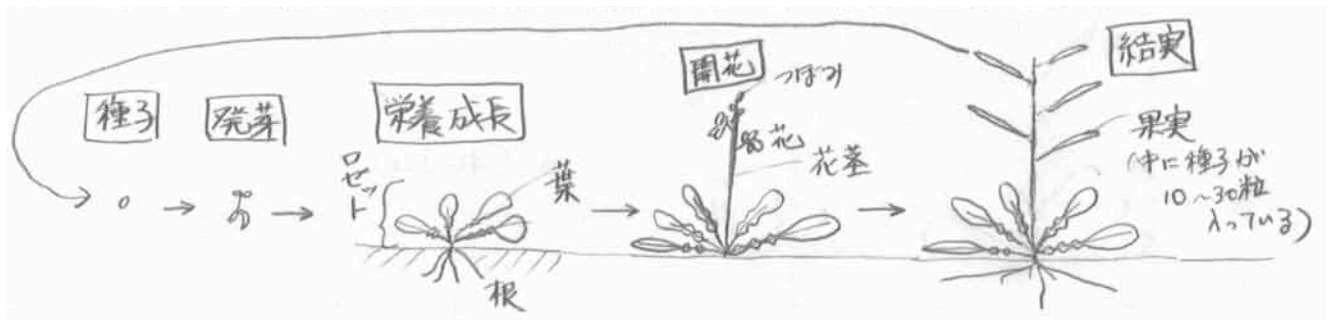


図 1 ミヤマハタザオの生活史。どの集団も数ヶ月から数年かけてこれらの段階を経る。

## サンプルと器具

生物材料としてミヤマハタザオが、静岡県孫佐島（まごさじま、標高約 500 m）集団由来の 6 個体が緑のトレイに入って左側に、富山県室堂（むろどう、標高約 2400 m）集団由来の 6 個体が黒のトレイに入って右側に並んでいることを確認しなさい。配布してある実験セットのなかから、物差し・ルーペ・はさみを机の上に出しなさい（ピンセットは出してはいけません）。ただし、机の上に出した器具は、使用するのも使用しないのも自由です。問題や解答用紙の裏面は自由にメモに使えます。机上のキムワイプ、キムタオル、プラスチックビーカー（2 つ）、洗びん（水入り）は自由に使えます。

解答用紙はバラバラにしないでください。

試験終了後、問題用紙はお持ち帰りください。

## 評価項目

問題の問題 1～4 への回答の、確実性・論理性・独創性を評価します。

それでは解答をはじめて下さい。解答時間は、今から 90 分です。

解答用紙 4 枚全てに受験番号と名前を書いてください。

## 問題

以下の文を読み、配布された植物を良く観察し、問題 1～4 に答えなさい。

静岡県孫佐島付近（標高約 500 m）にある孫佐島集団と、富山県の室堂付近（標高約 2400 m）にある室堂集団で種子を採集し、それを同じ実験室で播種・栽培した。これらの栽培個体は自家受粉によって自動的に結実したので、それらから種子を採集した。これらの種子を同じ実験室で播種・栽培して得られた植物を配布する。播種・栽培は、昼 20 時間（明条件、20℃）・夜 4 時間（暗条件、18℃）で行った。全ての種子を同じ日に播種し、約 70 日が経過している。それぞれの集団の播種後 28 日時点での発芽した種子の割合と発芽にかかった時間は、それぞれ図 2、図 3 のようだった。このうち、発芽した植物だけを配布してある。

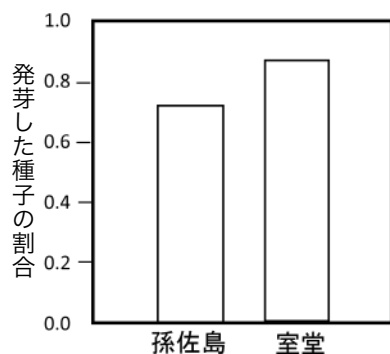


図 2 ミヤマハタザオ 2 集団の、播種後 28 日時点の発芽した個体の割合。

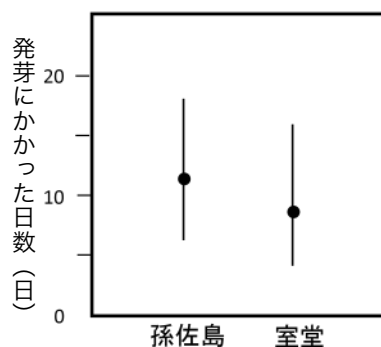


図 3 ミヤマハタザオ 2 集団の、播種後 28 日時点での、発芽にかかった時間。点は平均値、線は最小値から最大値までの範囲を示す。

**問題 1.** 配布した植物の模式図を図 4 に示す。配布した植物個体ごとに葉身が最も長く見えるロゼット葉を選んでその葉身幅を測り、集団名と各個体の葉身幅を表にまとめなさい。平均値・最小値・最大値を集団ごとに求め、図 3 のように図示しなさい。次に、各個体のロゼット葉にサインペンによる印があるかどうかを調べ、集団名と印の有無を表にまとめなさい。印有りの個体の割合を集団ごとに求め、図 2 のように図示しなさい。

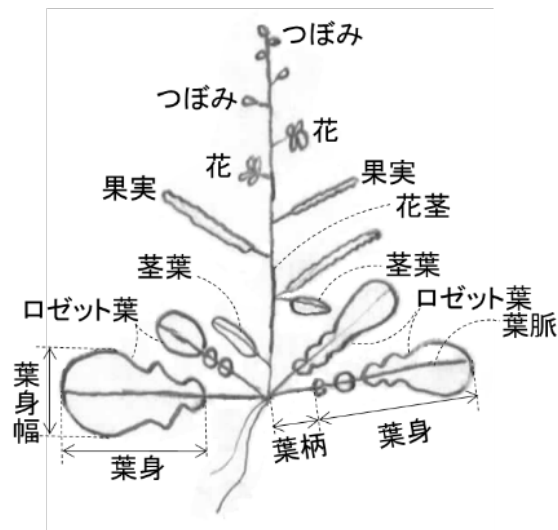


図4 ミヤマハタザオの模式図。

**問題2.** 図2・図3および問題1で示したような、生物がもつ特徴のひとつずつを形質と呼ぶ。配布された植物をよく観察し、集団間に違いがあると思われる形質を4つ選び、それを何らかの方法で測って平均値・最小値・最大値や割合を求め、問題1の例のように図表を用いて集団間の違いを示しなさい。形質を選ぶ際は図4の模式図を参考にしてもよいが、それに限る必要はない。独創性の高い解答は高く評価する。

**問題3.** 問題2で測定した形質について集団間で異なる表現型をもつことが、それぞれの集団が野外で適応するうえでどのように有利になっているだろうか。ひとつの形質を選び、考えられる可能性を枠内で説明しなさい。

**問題4.** 問題2で示したような集団間の違いが生じた理由を、「同一栽培環境」「自然淘汰」「進化」の語を必ず用いて、枠内で説明しなさい。



# **日本生物学オリンピック 2014 つくば**

## **予備体験**

正立顕微鏡の使い方と動物組織の観察

時間 45 分

### 注意事項

顕微鏡の使用法でわからない点があれば、スタッフに質問してください。  
ただし、観察しているサンプルについては答えることができません。

## 正立顕微鏡の使い方

### 顕微鏡の初期設定（図 1 参照）

1. 光源スイッチを ON にする。光量調節ツマミを回して適度な明るさに合わせる。
2. 粗動ハンドルを回してステージを一番下まで下げる。
3. レボルバーを回して対物レンズを 4 倍（最低倍率）にする。

### 標本のセット（図 2 参照）

4. 標本押さえにプレパラートをセットして標本押さえレバーで固定する。
5. コンデンサー上部のレンズから見えている照明光の位置に、標本の観察したい部位を、ステージ移動ハンドルを使って移動させる。

### ピント合わせ

6. 接眼レンズをのぞいてピントが合うまで粗動ハンドルを回してステージを上下させる。
7. 微動ハンドルを回してピントを微調整する。  
\*初めて使う顕微鏡では、ここで下記の眼幅、視度調整を行う。
8. コンデンサー絞りをを使ってコントラスト、焦点深度を調整する。
9. 倍率を上げて観察する場合には、レボルバーを回して対物レンズを 10 倍、40 倍に交換する（今回は 100 倍の対物レンズは使用禁止です）。

### 眼幅、視度調整（上記の 6, 7 を右目で行うこと）

眼幅、視度などは個人ごとに違いがあるので顕微鏡には各人の違いを補正する機能がある。  
眼幅調整：接眼レンズを左右に動かして自分の眼の幅にあった状態で観察する。左右の丸い視野像がひとつになった位置が正常な位置になる。

視度調整：左右の眼のピントが違うので、先ず右目で観察する標本にステージを上下してピントを合わせる。ステージをそのままの状態にして左目で覗き接眼レンズの根本にある視度補正環を回転させピントを合わせる。

### コンデンサーの使い方

コンデンサーには絞りがついており、絞りを開閉することにより標本にコントラストをつけたり焦点深度を調整することができる（以下の表を参照のこと）。

	コンデンサー絞り（開）	コンデンサー絞り（閉）
明るさ	大	小
焦点深度	浅	深
コントラスト	弱	強

注：使用中、レンズがよごれた場合には監督員（TA）まで申し出てください。

図1 正立顕微鏡全体図

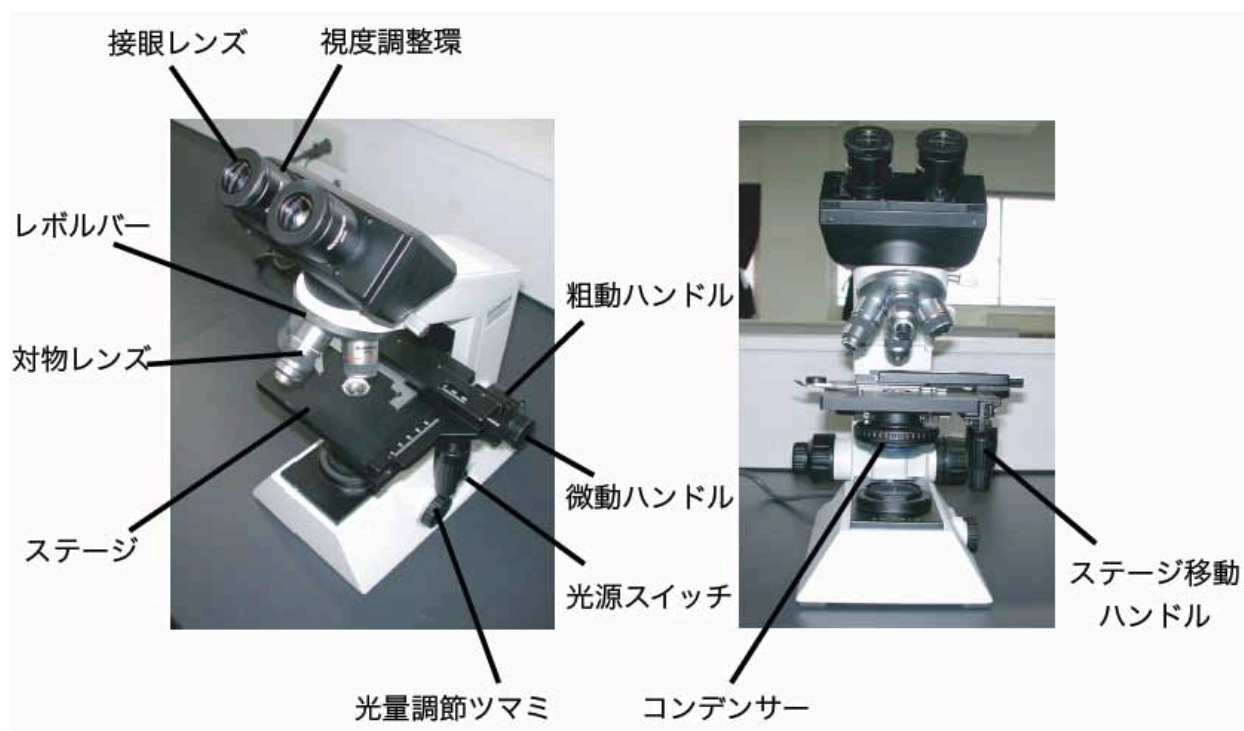


図2 ステージへの標本のセット



## 日本生物学オリンピック 2014 本選 つくば



実験試験 3 生理学

制限時間 90 分

解答は全て、解答用紙に記入しなさい。

解答用紙は全部で 3 枚あります。

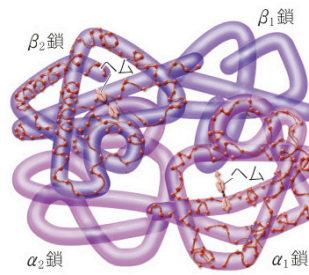
[注意]

これから試験を開始しますが、試験開始の合図があるまでは解答をはじめないでください。

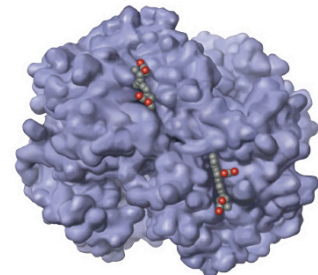
## はじめに

真核細胞の活動には酸素が必要です。しかしながら、ヒトなどの多細胞動物では非常に多くの細胞から個体が形成されているため、血液によって酸素を運ばなければ、生体の深部にまで酸素が行き渡りません。特に、哺乳類などは時に激しい運動をするので、多量の酸素が必要です。そのため、血液では体内の隅々にまで酸素を供給するための特別な酸素運搬細胞、赤血球が働いています。

赤血球の内部はヘモグロビンと呼ばれるタンパク質で満たされています。ヘモグロビン分子は、4つのポリペプチド鎖（ $\alpha$ 鎖2つ、 $\beta$ 鎖2つ）から形成されており、ヘムと呼ばれる分子を4つ含んでいます（右図）。ヘムは鉄を含んでおり、この鉄と酸素が結合することで、酸素を運搬しています。



▲ヒトのヘモグロビン



▲ヘモグロビンの立体構造

出典：「スクエア最新図説生物 neo」吉里勝利他監修  
第一学習社（2013）

では、いったいどれくらいのヘモグロビンが赤血球に含まれているのでしょうか？

この課題では、ヒツジ保存血（以下、保存血と呼ぶ）を使い、2つの実験をします。1つめの実験では、血球計算盤を使い、保存血の赤血球濃度を計測します。2つめの実験では、まず保存血を低張液にさらすことにより細胞膜を物理的に破壊し、ヘモグロビン溶液を作製します。次に、この溶液の吸光度を測定し、その値を元にヘモグロビン濃度を計算します。2つの実験によって得られた値から、「赤血球1個に含まれるヘモグロビン分子の数」を求めるのが、この課題の最終目標です。

## サンプルと器具類

### サンプル

- 生理食塩水で 1/20 に希釈したヒツジ保存血 10 mL（ふた付き 15 mL 遠沈管）、

### 器具

- 血球計算盤                      □カウンタ                      □正立顕微鏡
- 遠心機                      □分光光度計用セル 5 つ（ラックに受験番号が記載されています）
- マイクロピペット（P1000、P200）
- ピペットチップ白（P1000 用）1 箱                      □ピペットチップ黄（P200 用）1 箱
- マイクロチューブ 20 本                      □ふた付き 15 mL 遠沈管 5 本
- プラスチックビーカー（2 つ；チップ捨て用、廃液捨て用）

### 試薬

- 純水 50 mL（ふた付き 50 mL 遠沈管；白ラベル）
- 生理食塩水 50 mL（ふた付き 50 mL 遠沈管；水色）
- 希釈生理食塩水    各 1.2 mL（マイクロチューブ）
  - ・純水で 1/4 に希釈した生理食塩水（赤ラベル）
  - ・純水で 1/2 に希釈した生理食塩水（黄ラベル）
  - ・純水で 3/4 に希釈した生理食塩水（青ラベル）

### 注意事項

- ・保存血に毒性や感染性はありませんが、保存血が付いた手で目や口を触らないでください。
- ・ピペットチップ等の器具については、意図せず液体が混合しないよう使用してください。
- ・油性ペンはラベリングに使用してください。ただし、分光光度計用セルの透明な面には使用しないでください。
- ・机上のキムワイプ、キムタオルは自由に使えます。
- ・試験終了後、問題用紙は持ち帰ってください。

### 評価項目

- ・血球計算盤を使い、正しく赤血球の濃度を算出できるか。
- ・血液を正しく溶血させることができるか。
- ・分光光度計による測定結果から、ヘモグロビンの濃度を算出できるか。
- ・得られた実験値により「赤血球 1 個に含まれるヘモグロビン分子の数」を正しく導き出すことができるか。

ここから先は試験開始の合図があるまで

めくってはいけません

始めの合図の後、すべての解答用紙に  
受験番号と名前を記入してください。

## 実験 1 血液中の赤血球の濃度

動物では、体内の多くの組織に酸素を運ぶために多量の赤血球が必要とされます。保存血に含まれる赤血球の濃度を算出し、動物（本実験ではヒツジ）1 個体の血液に含まれる赤血球の数を調べます。

### 実験

1. 1/20 希釈保存血を計数に適した濃度にするため、100 倍に希釈する。まず、2 本のマイクロチューブに P1000 マイクロピペットを使ってそれぞれ 900  $\mu\text{L}$  の生理食塩水を入れなさい。次に 1/20 希釈保存血のふたをしっかりと閉め、上下に 5~6 回ほど転倒、攪拌し、よく混合しなさい。次に、P200 マイクロピペットを使って 1/20 希釈保存血 100  $\mu\text{L}$  をどちらかひとつの生理食塩水の入ったマイクロチューブに入れ、マイクロピペットで軽く出し入れを繰り返し（ピペッティング）、均一になるようによく混合しなさい。この懸濁液から 100  $\mu\text{L}$  回収し、もう一方の生理食塩水の入ったマイクロチューブに入れ、ピペッティングでよく混合しなさい。
2. P200 マイクロピペットで元の濃度の 100 倍に希釈した保存血を 20  $\mu\text{L}$  吸い取り、血球計算盤のサンプル注入口（図 1）のどちらか一方に静かに流し込みなさい。
3. 血球計算盤を正立顕微鏡にセットしなさい。
4. 4 倍の対物レンズで血球計算盤のメモリ（縦横の線）にピントを合わせた後、10 倍の対物レンズに変更し、再びピントを合わせて細胞を観察しなさい。図 2 の赤い線で囲まれた 4 カ所の計数エリア（ア～エ）の中から 2 カ所を選択し、各エリア内に含まれる赤血球の数を、カウンタを用いてそれぞれ計数しなさい。ただし、一番外側の枠と重なっている赤血球についてはカウントしないこととする。

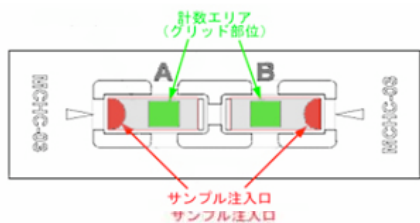


図 1

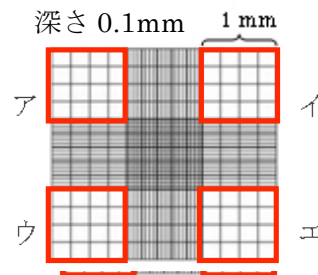


図 2

**問題 1.** 計数した 2 カ所のエリアの赤血球数を記し、平均値を求めなさい。また、平均値から 1/20 希釈する前のもとの保存血 1 mL に含まれる赤血球の数を算出しなさい。ただし、計数エリアは幅 1 mm、深さ 0.1 mm（図 2）、 $1\text{ mL}=10^3\text{ mm}^3$ である。計算過程を必ず記述し、有効数字 2 桁、単位を  $\text{○.○} \times 10^{\text{○}}$  細胞個/mL というかたちで答えなさい。

**問題 2.** ヒツジの体重の 6 %が血液成分と仮定し、80 kg のヒツジ 1 頭に含まれる全赤血球細胞の数を計算しなさい。ただし、血液の比重を 1.0 g/mL とし、有効数字 2 桁で答えなさい。



## 実験2 血液中のヘモグロビンの濃度

赤血球は外液の浸透圧を下げるにより容易に破裂し、内部物質が外部に流出します。この現象は溶血と呼ばれます。次の実験では、細胞内部に存在するヘモグロビンを溶血により外部に流出させ、その濃度を光学的に測定します。実験1の結果とあわせて、この実験の最終目標である「赤血球1個に含まれるヘモグロビン分子の数」を求めます。

### 実験

1. まず、1/20 希釈保存血のふたをしっかりと閉め、上下に5～6回ほど転倒、攪拌し、よく混合しなさい。次に、5本のマイクロチューブに1.0 mLの1/20 希釈保存血をそれぞれ入れ、5,000 rpm、2分間の条件で遠心機にかけなさい。この時、チューブの配置のバランスがとれていることに注意すること。
2. 処理後、各マイクロチューブにおいて赤血球が沈殿していることを確認し、不用なうわすみをP1000 マイクロピペットでていねいに吸い取り、廃液入れに捨てなさい。
3. 赤血球が沈殿したマイクロチューブ各5本に、P1000 マイクロピペットで、生理食塩水、純水で1/4に希釈された生理食塩水、純水で1/2に希釈された生理食塩水、純水で3/4に希釈された生理食塩水、純水（合計5つ）をそれぞれ1.0 mL入れ、ピPETTINGでよくかき混ぜなさい。
4. 3分間静置し、先ほどと同じ条件で遠心機にかけなさい（処理後、マイクロチューブ内の血液の様子をスケッチする：問題3）。
5. 各マイクロチューブのうわすみ 0.8 mL を、P1000 マイクロピペットで5本の15 mL 遠沈管にそれぞれ移した後、純水で5倍希釈しなさい。
6. 希釈したうわすみ液をピPETTINGでよくかき混ぜた後、各セルの上部に生理、3/4、1/2、1/4、純水とサインペンで記入し、各2 mL をそれぞれの分光光度計用セルに入れセルスタンドに並べなさい。
7. 手を挙げて、係にセルスタンドごとサンプルをわたしなさい（係は分光光度計で各サンプルの555 nmの吸光度\*を測定します。）

\*吸光度とは、物質が光を吸収する度合いのことを指す。

(参考) 物質の濃度に関する吸光度  $A$  は以下の式①で定義される。

$$A = -\log_{10} T = -\log_{10} (I/I_0) \quad \cdots \text{式①}$$

(ただし、 $T$  は光の透過率、 $I_0$  および  $I$  は入射光と透過光の強さ)

さらに、物質の濃度と吸光度は正比例するため、濃度  $C$  (mol / L<sup>註</sup>)、吸光層の長さを  $L$  (cm) とすると、次の式②が成立する (Lambert-Beer の法則)。

$$A = \varepsilon CL \quad \cdots \text{式②}$$

本実験で使用する分光光度計は、光路 (吸光層  $L$ ) が 1 cm のセルを使用する。

また、ヘモグロビンが波長 555 nm 時に示す  $\varepsilon$  は 13.0 である。

注：mol / L はモル濃度とよばれ、溶液中の分子の数を表す単位である。

1 mol / L は 1 L の溶液に  $6.0 \times 10^{23}$  個の分子が含まれていることを表している。

**問題 3.** \*で示された遠心分離処理後のマイクロチューブ中の各サンプルの様子をスケッチしなさい。また、この実験結果から血液溶解の特徴とその特徴から赤血球についてどのようなことが分かるかを記しなさい。

**問題 4.** 得られた吸光度を縦軸、段階希釈生理食塩水の濃度を横軸とし、グラフを作成しなさい。また、完全溶解（完全に赤血球が溶血している状態）時の生理食塩水の最高濃度を、吸光度を測定した 5 段階の希釈生理食塩水の中から選び、その吸光度を書きなさい。

**問題 5.** 式②を用いて、完全溶血時の吸光度の値からヘモグロビンのモル濃度  $C$  (mol/L) を求めなさい。計算過程を記述し、解答には単位を含めること。

**問題 6.** 問題 1、問題 5 の結果から、保存血の「赤血球 1 個に含まれるヘモグロビン分子の数」を求めなさい。計算過程を記述し、解答には単位を含めること。

## 日本生物学オリンピック 2014 本選 つくば



実験試験 4 植物分子生物学

制限時間 90 分

解答は全て、解答用紙に記入しなさい。

解答用紙は全部で 3 枚あります。

**その全てに受験番号と名前を記入しなさい。**

[注意]

これから試験を開始しますが、試験開始の合図があるまでは解答をはじめないでください。

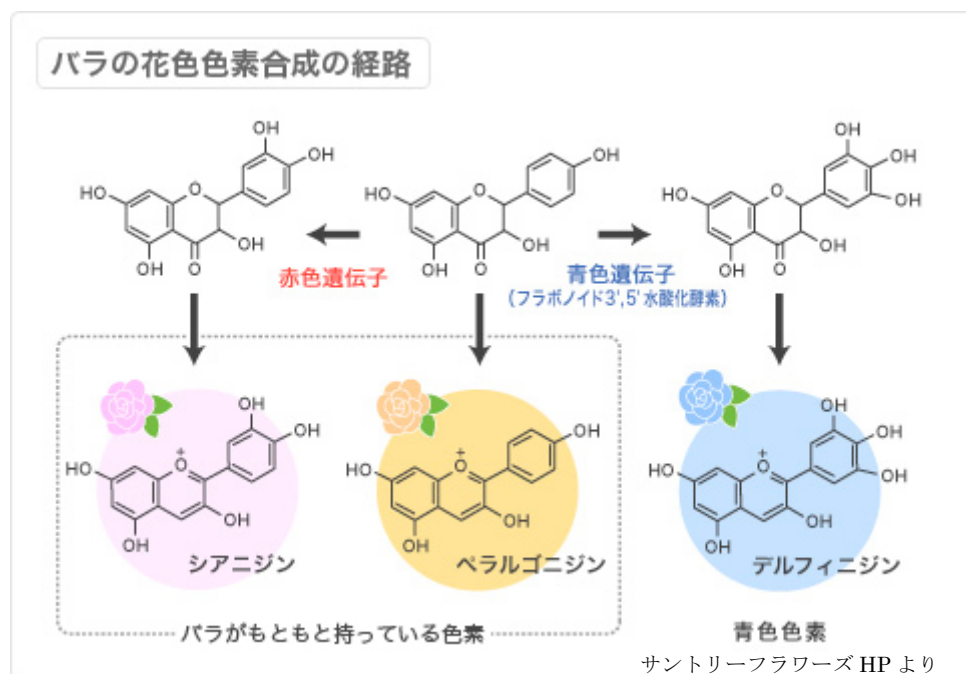
## はじめに

青いバラ、青いカーネーション

～遺伝子導入による新しい花の作出～

“Blue rose”という言葉には「不可能」や「存在しないもの」という意味があるように、青いバラや青いカーネーションの作出はこれまで不可能とされてきました。しかしながら近年の遺伝子組換え技術の発達によりそれらの開発に成功し、青いバラ（アプローズ、喝采）の花言葉には「夢 かなう」が、青いカーネーション（ムーンダスト）には「永遠の幸福」が与えられています。花の色は花弁にどのような色素が蓄積するかによっておおむね決まっており、バラやカーネーションの赤色花弁にはシアニジン、オレンジ色花弁にはペラルゴニジンという色素が多く含まれています（下図参照）。しかしながら、バラやカーネーションは青色遺伝子と呼ばれるフラボノイド 3', 5' 水酸化酵素をコードする遺伝子をもっておらず、そのため、これらの花弁では青色色素であるデルフィニジンを生合成することができなかったのです。そこでサントリーフラワーズはパンジーやペチュニアがもっている青色遺伝子の cDNA<sup>注)</sup>を、遺伝子組換え技術を用いてカーネーションやバラに導入することで、青色の花弁をもつ品種の作出に成功しました。これらの植物は遺伝子組換え植物ですが、国の許可を得て、青いカーネーションは平成 13、14 年に、青いバラは平成 21 年に販売が開始されています。

注) cDNA とは RNA を鋳型にして逆転写酵素により合成した DNA



フラボノイド類（アントシアニン）合成系

## サンプルと器具類

□にチェック✓を入れながら確認してください。不足している場合は挙手により知らせてください。

### サンプル、試薬類

- ☐ DNA 溶液 ①～⑤（各 1 本）
- ☐ DNA マーカー（青色シール：1 本）
- ☐ 緩衝液（10 倍濃度）（黄色シール：1 本）
- ☐ キシレンシアノール溶液（緑色シール：1 本）
- ☐ 蒸留水（白色シール：1 本）
- ☐ 制限酵素溶液（*Hind*III）（赤色シール 氷上：1 本）

### 器具

- ☐ マイクロピペット（P200・P20：各 1 本）
- ☐ ピペットチップ（黄色：1 箱）
- ☐ 1.5 mL マイクロチューブ（3 個）
- ☐ アイスボックス（氷入り：1 個）
- ☐ ストップウォッチ（1 個）
- ☐ 電気泳動装置およびアガロースゲル（1 セット）
- ☐ フローター（1 枚）
- ☐ 小型遠心器（1 個）
- ☐ ものさし（自分の実験セットから机の上に出してください）
- ☐ 手袋（自分の実験セットから机の上に出してください）
- ☐ マーカーペン（自分の実験セットから机の上に出してください）

また、机の上においてあるキムワイプ、キムタオルは自由に使えます。

2 つのプラスチックビーカーは廃棄物用に使ってください。1 つはチップなどの固体用、もうひとつは液体用です。

## 注意事項

- ・試験中に手元にある試薬を使い切った場合は、挙手により知らせてください。
- ・試験中に座席間を移動してはいけません。
- ・解答用紙はバラバラにしないでください。
- ・試験終了後、問題用紙は持ち帰ってください。

## 評価項目

1. 正しく制限酵素処理を行うことができるか。
2. 制限酵素処理をした DNA 溶液を適切に電気泳動することができ、泳動結果から DNA の分子サイズを明らかにすることができるか。
3. 制限酵素処理をした DNA 溶液の電気泳動結果から、遺伝子の特徴を理解することができるか。
4. 遺伝子組換え技術について基本的な知識を有しているか。

ここから先は試験開始の合図があるまで  
見てはいけません

## 実験. DNA の制限酵素処理と電気泳動

本実験では 4 種類のムーンダストに含まれている青色遺伝子がパンジー由来かペチュニア由来かを調べます。

青色遺伝子は普通のカーネーションにはありませんので、青色遺伝子をもっていれば組換えカーネーションであると言えます。そこでこれら 4 種のムーンダストについて、遺伝子診断等で用いられる PCR 法を用いて青色遺伝子の塩基配列の一部を増幅させました（以下 PCR 増幅産物と呼びます）。予備実験としてそれらの電気泳動を行ったところ、パンジーまたはペチュニアに由来するどちらの青色遺伝子の PCR 増幅産物も同じ位置にバンドが現れました。つまり、PCR 増幅産物の分子サイズによってこれらの違いを判別することはできませんでした。そこで、PCR 増幅産物の塩基配列に着目したところ、パンジー由来の青色遺伝子だけが PCR 増幅産物内に制限酵素（*Hind*III）によって認識・切断される配列をもっていることがわかりました。本実験では実際に PCR によって増幅された DNA に対して制限酵素処理と電気泳動を行い、現れるバンドをもとに考察を行います。

以下実験を行いながら指示に従って解答しなさい。

### 制限酵素処理および電気泳動

1. 配布された DNA 溶液は、5 種類（DNA 溶液①～④はそれぞれ上記ムーンダストの種類①～④の花由来、DNA 溶液⑤はムーンダスト種類①～④のいずれかの葉由来）の PCR 増幅産物を含む溶液が 8  $\mu$ L ずつ入れられている。それぞれの DNA 溶液に下記の操作により準備した溶液（制限酵素 mix）を 12  $\mu$ L ずつ加え、合計 20  $\mu$ L の液量で制限酵素処理を行いなさい。また制限酵素処理のための反応液について問題 1 に解答しなさい。
  - ・制限酵素 mix の準備には空の 1.5 mL マイクロチューブを用いなさい。DNA 溶液 5 本分の反応に必要なと思われる液量は自分で考えて用意しなさい。
  - ・制限酵素については、配布した制限酵素溶液（*Hind*III）が酵素反応を行う反応液中に 2  $\mu$ L ずつ入ることになるように制限酵素 mix を準備しなさい。またこの溶液は制限酵素 mix に最後に加えること。
  - ・緩衝液は酵素反応を行う際に最適な濃度になるように計算して準備しなさい。今回配布されている緩衝液は最適濃度の 10 倍の濃度である。
  - ・制限酵素 mix に含まれる緩衝液や制限酵素は蒸留水を用いて濃度調整しなさい。
  - ・各溶液を加えたら、よく混合して制限酵素 mix を均一にしなさい。またそれぞれの DNA 溶液に制限酵素 mix を加えた後もよく混合して均一にしなさい。



ここまでの準備が終了した人から挙手により合図をし、フローターに 5 本のチューブを差し込んでアシスタントにわたしなさい。アシスタントがチューブを 37°C の恒温槽へ入れ、20 分間の制限酵素処理を行います。待ち時間は他の問題に取り組んでも構いません（問題 2～4）。サンプルは処理終了後にアシスタントが返却します。

2. 制限酵素処理の終了した反応液に 2  $\mu\text{L}$  のキシレンシアノール溶液を加え、良く混合した後、アガロースゲルのウェル（穴）に 10  $\mu\text{L}$  入れなさい。DNA マーカーについては 5  $\mu\text{L}$  をウェルに入れなさい。入れる順番は左からマーカー、制限酵素処理済みの DNA 溶液①、同②、・・・同⑤としなさい。100 V で 20～30 分間、電気泳動を行いなさい。

- ・電気泳動は手袋をして作業すること。ゲルが泳動槽の中で動いている場合などは手袋をして位置を調節し、ゲルや泳動槽内の液体には素手で触らないこと。
- ・電気泳動に利用するアガロースゲルは作製済のものが配布してある。上記のように準備した溶液をウェルに入れなさい。あまったウェルは予備とする。5 種類の反応液および DNA マーカーをウェルに入れ終えたら、スイッチを入れ、電気泳動をはじめなさい。
- ・スイッチを入れ、ストップウォッチで 20～30 分間の測定を開始した段階で、挙手により合図しなさい。アシスタントが電気泳動結果を撮影した写真の一例（問題 5～9 で使用）をわたします。
- ・ストップウォッチで 20～30 分たったら、スイッチを切りなさい。電気泳動結果は試験スタッフが撮影し、評価の対象とします。

## 問題

問題 1. 制限酵素処理をする際の反応液の準備について以下の表を完成させなさい。

制限酵素処理のための反応液	
溶液	1 反応液あたりの液量 ( $\mu\text{L}$ )
DNA 溶液	8
緩衝液 (10 倍濃度)	
蒸留水	
制限酵素溶液 ( <i>Hind</i> III)	2
合計	20

問題 2. 与えられたカーネーションの写真を見て、色や形から、種類①～④のカーネーションのもつ青色遺伝子が、パンジー由来なのかペチュニア由来なのかを推測できますか。そのように考えた理由も説明しなさい。

問題 3. 制限酵素 *Hind*III で DNA を処理する際に、緩衝液を添加し、37℃に保ちます。なぜこのような条件で酵素反応を行うのか、理由を答えなさい。

問題 4. 遺伝子組換え生物を一般市場に持ち込む場合、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」を遵守する必要がある。つまり、遺伝子組換え生物等が野生の動植物等へ影響を与えないようにしなければならない。本実験で用いている青いカーネーションでは、野生の動植物等へ影響を与えないようにするためにどのような工夫がなされていると考えられるか述べなさい。

**問題 5.** アシスタントからわたされたアガロースゲル電気泳動写真の一例を用いて、DNA マーカーのバンドの位置から、塩基対数 (bp、縦軸) とウェルからバンドまでの距離 (mm、横軸) についてのグラフを作成しなさい。

**問題 6.** 電気泳動写真にある DNA 溶液①～⑤の泳動結果をもとに、それぞれの DNA 溶液についてウェルからバンドまでの距離を求め、問題 5 で作製したグラフからバンドのサイズ (塩基対数) を求めなさい。バンドが 2 本以上見られる場合はそのサイズ (塩基対数) を全て答えなさい。バンドが検出されない場合は、「バンドなし」と答えなさい。

**問題 7.** 電気泳動写真から、パンジー由来青色遺伝子が導入されているカーネーションが①～④のうちどれであるか理由を添えて答えなさい。

**問題 8.** DNA 溶液⑤は種類①～④のムーンダストのいずれかの葉から抽出した DNA の PCR 増幅産物である。制限酵素処理後の電気泳動におけるバンドパターンは DNA 溶液①～④のうちどれと似ていますか。複数ある場合は複数挙げなさい。また、なぜ葉から抽出した DNA を用いても青色遺伝子の PCR 増幅産物が得られるのかを説明しなさい。

**問題 9.** ペチュニアの花から抽出した DNA を用いて PCR 反応を行った場合の PCR 増幅産物では 2300 bp (塩基対数) 付近にバンドが得られた。DNA 溶液①～④に含まれていた、ペチュニア由来青色遺伝子が導入されていると考えられる溶液のバンドと、ペチュニア花 DNA 由来の PCR 増幅産物のバンドパターンが違うのはなぜか説明しなさい。

# **日本生物学オリンピック 2014 つくば**

## **予備体験**

マイクロピペット、電気泳動装置、小型遠心器の使い方と実践

時間 60 分

### 注意事項

機器の使用法でわからない点があれば、スタッフに質問してください。

## サンプルと器具類

☐にチェック✓を入れながら確認して下さい。不足している場合は挙手により知らせて下さい。

### サンプル、試薬類

- ☐ DNA 溶液 (1 本)
- ☐ キシレンシアノール溶液 (緑色シール：1 本)

### 器具

- ☐ マイクロピペット (P200・P20：各 1 本)
- ☐ ピペットチップ (黄色：2 人あたり 1 箱)
- ☐ ストップウオッチ (2 人あたり 1 個)
- ☐ 電気泳動装置及びアガロースゲル (2 人あたり 1 セット)
- ☐ 小型遠心器 (2 人あたり 1 個)
- ☐ 手袋 (必要であれば自分の実験セットから出して使ってください)

また、机の上においてあるキムワイプ、キムタオルは自由に使えます。

2つのプラスチックビーカーは廃棄物用に使ってください。1つはチップなどの固体用、もうひとつは液体用です。

手元にある試薬を使いきった場合は、挙手により知らせてください。

## < マイクロピペットの使い方 >

マイクロピペット（図1）は1.0 mL (= 1000  $\mu$ L) 以下の微量の液体を測り取る時に用います。今回使用するマイクロピペット P1000、P200、P20（プッシュボタンに書かれています）では、それぞれ200  $\mu$ L～1000  $\mu$ L、50  $\mu$ L～200  $\mu$ L、2  $\mu$ L～20  $\mu$ Lの容量を測り取ることができ、目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量を設定します。プッシュボタンを上下させることにより本体内の空気を動かすことで液体を吸い上げたり排出したりできる構造になっています。

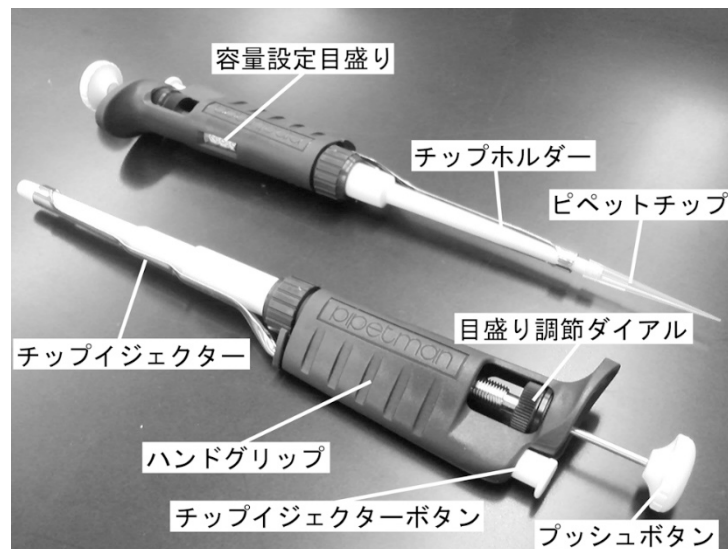


図1 マイクロピペット（手前: P1000、奥: P200 ピペットチップ装着）

1) 目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量にセットする（図2 参照）。ダイヤルはゆっくり回す必要はないので手早く設定容量にセットする。

P20	P200	P1000
1	1	0
2	2	7
5	5	5
12.5 $\mu$ L	125 $\mu$ L	0.75 mL

図2 マイクロピペットの容量設定目盛り  
（GILSON 社 PIPETMAN 取扱説明書より）

2) 親指でプッシュボタンを押せるように片手でハンドグリップを握る。チップイジェクターボタンが手のひら側の向きになるように握る。

- 3) ピペットチップが入った箱（チップラック、図3）のふたを開け、ピペットチップにチップホルダーの先端を差し込んで装着する。P1000 は白色、P200 と P20 は黄色のピペットチップを使用する。ピペットチップとチップホルダーの間から空気が漏れないように、装着したピペットチップでチップラックを軽くトントンと叩くようにしてしっかりと装着する。装着後チップラックのふたを閉める。

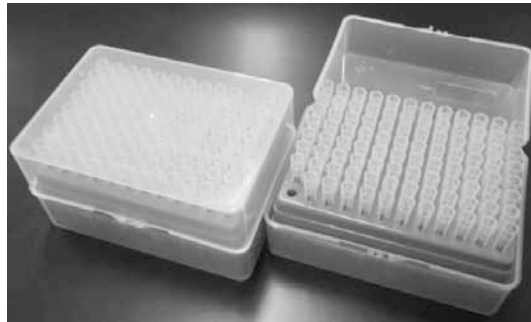


図3 チップラック

- 4) プッシュボタンを第一ストップ（図4）まで押し込み、その状態のままピペットチップの先端を液につけ、ゆっくりかつ滑らかにプッシュボタンをトップまで戻すことで液を吸い上げる。

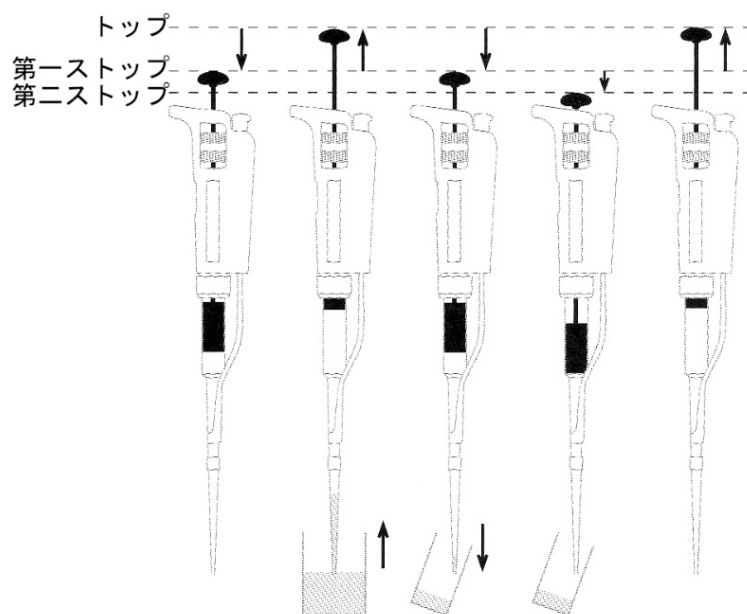


図4 プッシュボタンの動かし方  
(GILSON 社 PIPETMAN 取扱説明書より)

- 5) ピペットチップの先端を液を移す容器に入れ、プッシュボタンをゆっくりと第一ストップまで押し下げて液を排出する。第一ストップで一度止めたプッシュボタンを続けて第二ストップまで強く押し下げ、ピペットチップ内に残った液を完全に排出する。
- 6) プッシュボタンをトップまでゆっくりと戻す。

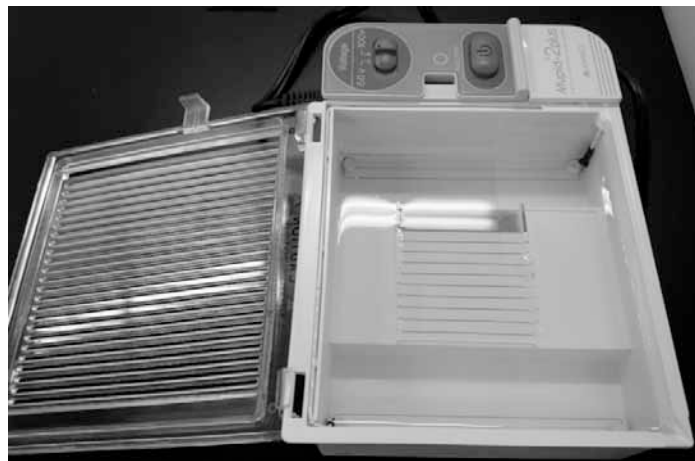
7) イジェクターボタンを親指で押してピペットチップを取り外す。ピペットチップは測りとり液体が変わるたびに使い捨てる。

#### 注意点)

- ・ 必ずピペットチップを装着して液を吸い上げること。
- ・ 液を吸い上げた状態でマイクロピペットを逆さまにしないこと。
- ・ 液を吸い上げる際に、マイクロピペット本体まで液を吸い込まないように注意してゆっくり操作すること。特に吸い上げ途中でプッシュボタンから指を離すことは絶対にしないこと。ただし、ゆっくり動かしすぎてシリンダーの移動がスムーズでない場合は測りとり量の正確性が損なわれるので、滑らかに動かすよう注意する。吸い上げ開始から完了まで1～2秒かけるのが適正な速度である。また、マイクロピペット作業中に本体まで液を吸い込んでしまった場合はすみやかに挙手し、アシスタントに知らせること。

### < 電気泳動装置の使い方 >

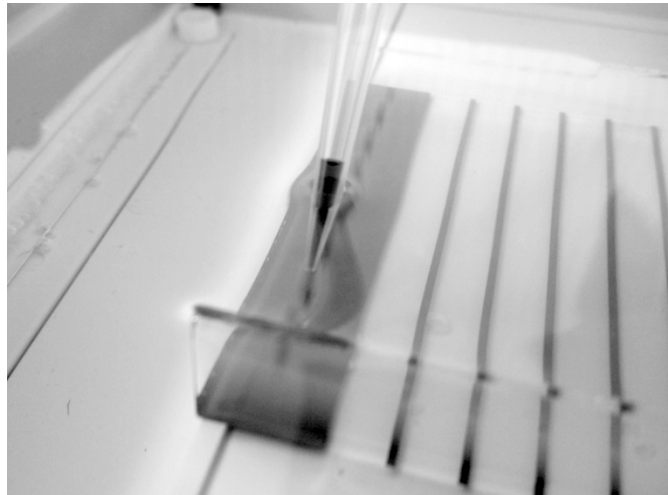
1) 泳動槽の中央にプラスチックトレイ付のゲルがあり、浮き上がっていないことを確認する。



DNA は泳動槽に通電すると陽極側に移動するため、ゲルのウェル（穴）が陰極側になる方向で使用する（プラスチック製のカバーにプラスとマイナスで表記されている）。



- 2) 泳動しようとするサンプル溶液に対してピペットチップを装着したマイクロピペットで 1/10 量のキシレンシアノールを加え、吸い上げと排出を数回繰り返すことによりよく混合する。
- 3) 小型遠心機によりサンプル溶液をマイクロチューブの底に集める。
- 4) ピペットチップを装着したマイクロピペットを用いて泳動しようとするサンプル溶液を泳動ゲルのウェルに静かに入れる。キシレンシアノールの比重が重いいため、サンプル溶液はウェルの底に沈む。



この作業によりゲルが泳動槽の中を移動した場合は、手袋をした手で泳動槽の中央に移動させる。

- 5) プラスチック製のカバーをして、100 V の電圧設定であることを確認したらスイッチを入れ泳動を開始する。

#### 注意点)

- ・ 通電中は泳動槽に指などを入れないこと（感電注意）。
- ・ 泳動しようとするサンプル溶液をウェルに入れる際、ウェルの底をピペットチップの先端で破らないように注意すること。
- ・ プラスチックトレイからゲルが外れても泳動槽の中央にゲルがあれば泳動可能であるため、注意深く位置を戻すこと。
- ・ ゲルが動かないように泳動中は泳動槽を動かさないこと。
- ・ 泳動時の電圧設定に注意すること（今回は 100 V 設定）。

## < 小型遠心機の使い方 >

1) 遠心したいサンプルを小型遠心機にセットする。その際スムーズに回転するように回転軸を中心として対角線上になるようサンプルをセットすること。



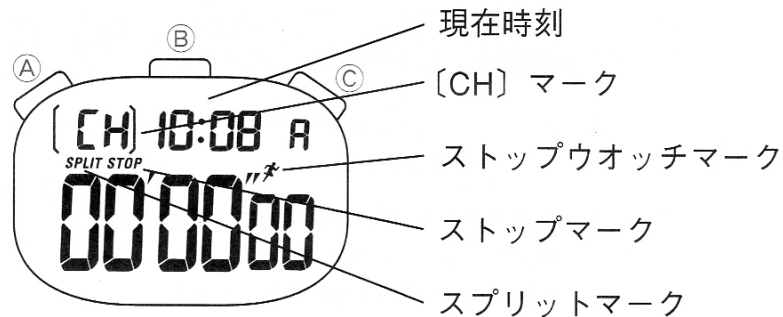
- 2) ふたを閉じて横にあるスイッチを入れて回転させる。
- 3) 5 秒程度回転させたらスイッチを切り、回転が止まったらふたを開けてサンプルを回収する。

### 注意点)

- ・ 安全のため回転中はふたを開けないこと。

## < ストップウォッチの使い方 >

1) ボタン B を何度か押して画面左上の表示を「CH」にする。



2) ボタン A を押して表示を「00'00'00」にリセットする。

3) ボタン C を押して計測を開始する。ストップウォッチマークが点滅し、デジタル表示の加算がスタートする。

4) ボタン C を再度押して計測を終了する。ストップマークが点灯し、デジタル表示の加算がストップする。

5) 再度使用する場合はボタン A を何度か押して表示を「00'00'00」にリセットする。

### 注意点)

- ・ 計測中に間違えてボタン A を押してもデジタル表示はストップする。その際にはストップウォッチマークとスプリットマークが両方とも点滅している。計測を終了した場合はその数値を計測時間とする。誤って計測中にボタン A を押してしまった場合は、もう一度ボタン A を押すことで復帰できる。戻るまでの時間も計測は継続されている。