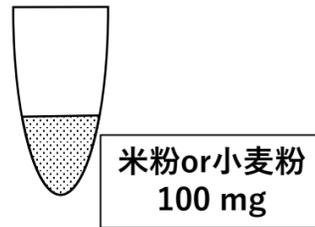


高校分子生物学実験キット プロトコール

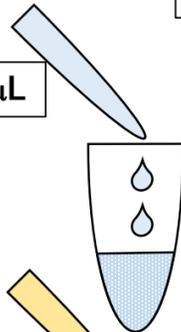
(1) 米粉・小麦粉からのDNA抽出 (1時間目)

↓ 米粉・小麦粉100 mg (0.1 g) を
それぞれ2.0 mLマイクロチューブに薬さじで取る。



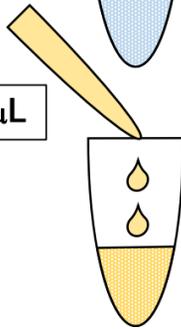
↓ そこにBuffer Aを500 μ L加え、
強く転倒混和する。

Buffer A : 500 μ L



↓ 次にBuffer Bを250 μ L加え、
強く転倒混和する。

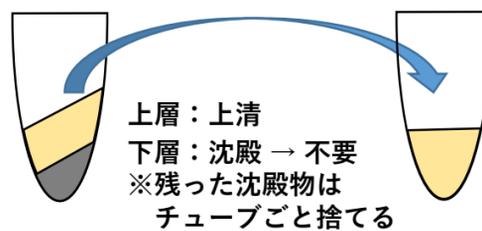
Buffer B : 250 μ L



↓ 遠心 12,000 rpm \times 1 min

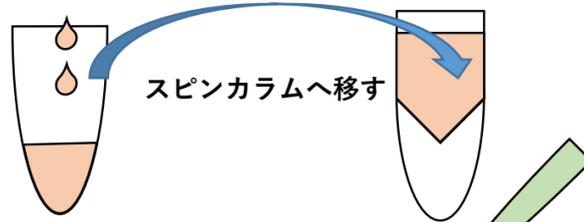
↓ ピペットで上清 (約500 μ L) を
別の1.5 mLマイクロチューブに取る。

上清のみを別のチューブへ移す



↓ そこにエタノールを500 μ L入れ、
強く転倒混和する。

エタノール : 500 μ L

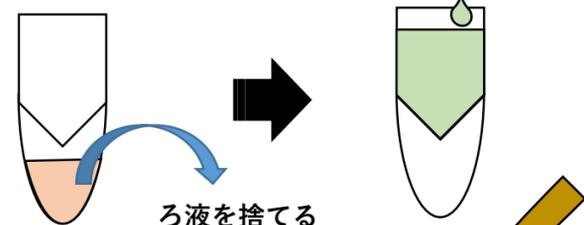


↓ 混合液を全てスピнкаラムに入れる。

↓ 遠心 12,000 rpm \times 1 min

↓ ろ液を捨て、
カラムに Buffer Cを500 μ L入れる。

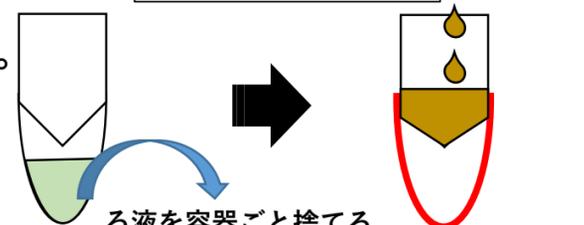
Buffer C : 500 μ L



↓ 遠心 12,000 rpm \times 1 min

↓ ろ液を捨て、
新しいマイクロチューブを受け皿にする。

Buffer D : 100 μ L



↓ カラムにBuffer Dを100 μ L入れる。

↓ 遠心 12,000 rpm \times 1 min

↓ カラムを捨て、各DNA溶液の完成。
(次の実験に使うので、フタを閉め
フタにラベルを書いておく。)



- ・空のマイクロチューブを電子天秤に乗せゼロ合わせをした後、米粉を0.1 g秤量する。
- ・迷子にならない様に、マイクロチューブのフタに必ずサンプル名など記載する

- ・P1000ピペットの目盛を「050」にし、Buffer Aを500 μ L分取する。
- ・「転倒混和」では、マイクロチューブのフタがしっかり閉めてあることを確認してから、液体が米粉にしっかり浸潤する程度に激しく振る。

- ・P1000ピペットの目盛を「025」にし、Buffer Bを250 μ L分取する。
- ・なお、チップは溶液毎に新しいものを使うこと (以下同様)。

- ・「遠心」では、軸の対角線上に点対称になる様にチューブを配置する (「バランスを合わせる」という)。同量の水を入れたマイクロチューブを用意して、適宜バランスを合わせてもよい。

- ・P1000ピペットの目盛を「050」にし、上清を約500 μ L分取する。
- ・ピペットの先を見ながら沈殿層を崩さない様に上清を吸う (少しくらいなら沈殿を吸ってしまってもOK)。

- ・P1000ピペットの目盛を「050」にし、エタノールを500 μ L分取する。
- ・エタノール混和後の全ての混合液を、ピペットを用いてスピнкаラム上部に入れる。
- ・混合液中のDNAはカラムに吸着し、それ以外の成分はろ液として出てくる。

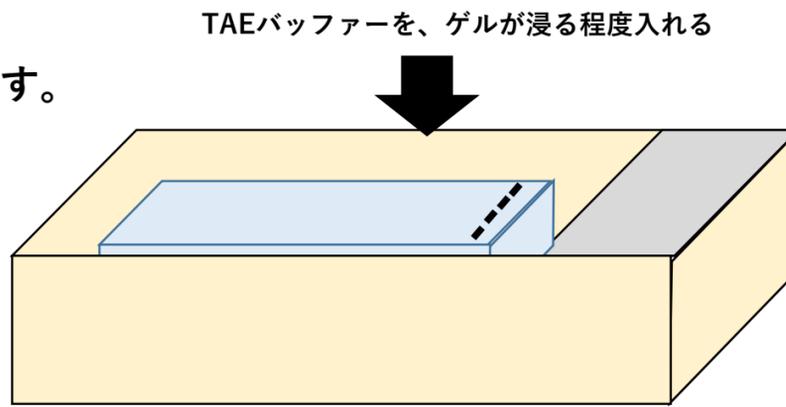
- ・スピнкаラム上部を外し、下部に溜まったろ液を捨てた後、また上部を装着させる。
- ・P1000ピペットの目盛を「050」にして500 μ LのBuffer Cを分取し、スピнкаラム上部に入れる。
- ・Buffer Cはカラムに吸着したDNAを洗浄する役割をする。

- ・ろ液の溜まった容器は、ろ液がスピнкаラム上部に触れないように容器ごと廃棄する。
- ・P1000ピペットの目盛を「010」してBuffer Dを100 μ Lを分取し、スピнкаラム上部に入れる。
- ・Buffer Dでカラムに吸着したDNAを押し出す (溶出する)。

- ・実際の溶液の色は透明であるが、アガロース電気泳動でも分かるように溶液中にDNAが存在する。
- ・溶出後のDNA溶液は一樣にDNAが分散していないので、軽く振って一樣な溶液とする。

(2) アガロース電気泳動 (2時間目)

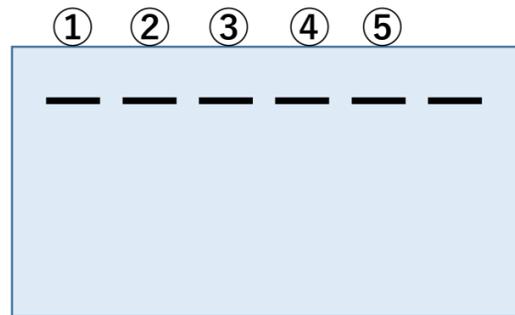
↓ゲルを右図の様に置き、
そこにTAEバッファを満す。



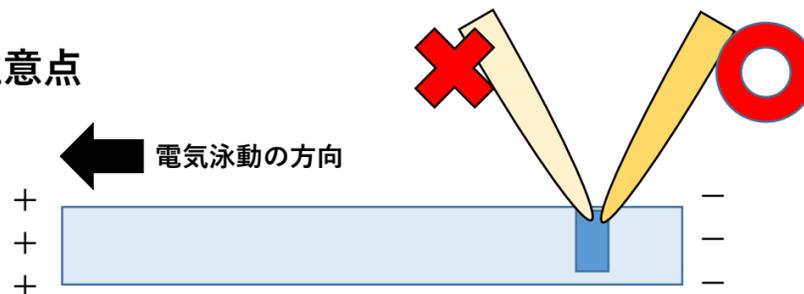
↓左のレーンから順に：

- ① マーカー (10 μ L)
- ② 米粉由来DNA (20 μ L)
- ③ 小麦粉由来DNA (20 μ L)
- ④ 米粉由来PCR産物 (20 μ L)
- ⑤ 小麦粉由来PCR産物 (20 μ L)

をピペットで入れる。



※アガロースゲルへの サンプルのロードの注意点

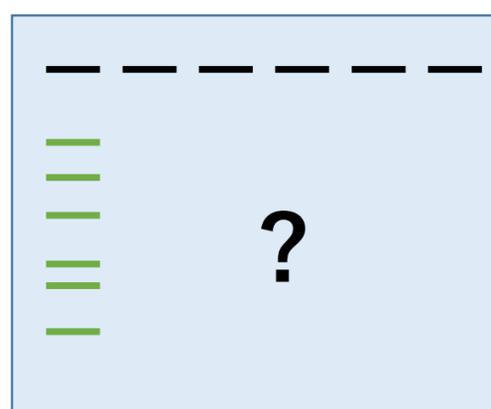


サンプルをアガロースゲルにロードする際、
電気泳動方向とは逆の角度からサンプルを静
かにロードをする。電気泳動方向の壁を崩す
と、電気泳動像が崩れる可能性がある。また
静かにロードしないとサンプルがウェルから
溢れ出してしまうので注意。

↓100 Vで20分間電気泳動を行う。

↓ゲルを引き上げ、
LEDイルミネーターでゲルを照射しバンドを確認する。
適宜デジタルカメラなどで泳動結果を保存する。

※イルミネーターの光が直接目に入らない様に保護メガネ着用のこと。



・TAEバッファとはTris-Acetate EDTAの略であり、Trisは生化学実験で良く使われる緩衝液(溶液のpHを安定化させる試薬)、Acetateは酢酸を意味している。要するにTris-Acetateで緩衝液を作っている。EDTA(エチレンジアミン四酢酸)はキレート剤と呼ばれ、溶液中の2価の陽イオンを捕えることができる試薬である。電気泳動のバッファにキレート剤を入れる理由はマグネシウムイオン Mg^{2+} の捕捉のためである。一般的にDNAを切ったり貼ったりするためには Mg^{2+} が必要と考えて良く、例えばPCRで用いた酵素液にも Mg^{2+} が入っている。電気泳動ではDNA切断酵素が混入が危惧されるが、キレート剤を泳動バッファに入れることによって Mg^{2+} を捕捉でき、DNA切断酵素が混入したとしても酵素は活性を持つことはできないので、結果的にサンプルDNAを混入による予期しない切断から守ることができる。

・P20ピペットの目盛を「100」にし、
マーカー溶液を分取する。
・P20ピペットの目盛を「200」にし、
各DNA溶液を分取する。
なお、チップは溶液毎に新しいものを使うこと。

・DNAはマイナス電荷を持っているので、プラスの方向に引っ張られる電気的性質を持っている。これを利用したのがDNAの電気泳動の原理となっている。

・ゲルを用いた電気泳動(ゲル電気泳動)では、電気泳動中にどれだけゲルの網目に対象物が物理的に引っかかるかによって、対象物の大きさに従って振り分けができるということが重要なポイントである。大きいものほどゲルの網目に引っかかるので、大きいものほどゲルの上部に、小さいものほどゲルの下部にそれぞれ振り分けられる。

・DNAサンプルをウェルにロードする際、サンプルがウェルの中に沈むことができるのは、サンプル中のグリセロールの働きによる。グリセロールは水よりも比重が大きいため、TAEバッファ中では沈むことができる。

・DNAサンプル(酵素液)が青いのはBPB(ブロムフェノールブルー)という指示薬が入っているためである。BPBはゲルへのローディングをしやすくするために入っている。

・DNAの可視化のために、ミドリグリーン(日本ジェネティック社)と呼ばれる蛍光試薬がゲル内に既に入っており、これがDNAと結合することによって、特定の波長の光を照射されると蛍光として緑色を発することによってゲル内のDNAを可視化できている。