

基礎セミナー「遺伝子を使うと何がわかる？ 何ができる？ 2010」

実験2-1 (DNAの抽出)

【目的】

PCR で分析するのに用いるため、ブロッコリーの DNA を調製する。

【実験】

1. 材料・試薬

ブロッコリー (蕾の部分のみ)	10 g
抽出液 (NaCl: 3.2 g、20% SDS: 1.25 ml、水: 48.8 ml)	50 ml
エタノール	100 ml
70%エタノール	20 ml
水	0.5 ml

2. 器具

乳鉢、乳棒、200 ml ビーカー、ろうと、不織布製の排水口ネット、細いガラス棒

3. 方法

- (1) 乳鉢にブロッコリーと抽出液を入れ、乳棒でよくすりつぶす。
- (2) ろうとに排水口ネットを敷き、(1) でつぶしたものをに入れて濾過する。
- (3) 濾液をビーカーに回収する。
- (4) 濾液に2倍量のエタノールを注ぐ。
- (5) そっと混合する。現れた DNA をガラス棒に巻き付けて回収する。
- (6) 回収した DNA を 70%エタノールでよくすすぐ。
- (7) 再びガラス棒に巻き付け、よく乾かす。
- (8) 0.5 ml の水に溶かす。この液をそのまま PCR のサンプルとして用いる。

実験 2-2 (PCR)

【目的】

PCR で特定の遺伝子 (または特定の塩基配列) のみを増幅できることを理解し、PCR の方法や結果の解釈のしかたを学ぶ。

【実験の概要】

1. 材料

- (A) シロイヌナズナの DNA
- (B) 今日調製したブロッコリーの DNA
- (C) GUS 遺伝子を導入した「遺伝子組換え」シロイヌナズナの DNA
- (D) pGWB433 (GUS 遺伝子を持つプラスミド)
- (E) pGWB450 (GUS 遺伝子を持たないプラスミド)

2. 調べる遺伝子

- (イ) シロイヌナズナの遺伝子 AtDAD1
- (ロ) ブロッコリーの遺伝子 BoDAD1
- (ハ) GUS 遺伝子

3. 調べること

- (イ)、(ロ)、(ハ) の各遺伝子は (A)、(B)、(C) のどのサンプルから検出できるか?
- (ハ) の遺伝子は (C)、(D)、(E) のどのサンプルから検出できるか?

※ひとり一つの遺伝子を担当する。手順は以下の通り。詳細は口頭で説明。

	AtDAD1	BoDAD1	GUS	GUS
Arabidopsis	○1	○4	○7	
Broccoli	○2	○5	○8	
GM-Arabidopsis	○3	○6	○9	○10
pGWB433				○11
pGWB450				○12

Primer-F (4 uM)	1	} 2 ul
Primer-R (4 uM)	1	
DNA	2	} 2 ul
10x Ex Taq Buff	2	
2.5mM dNTPs	2	} 16 ul
Ex Taq	0.2	
H ₂ O	11.8	
	20 ul	

94°C 4' → (94°C 30", 60°C 30", 72°C 30") × 40 → 72°C 7' → 4°C

実験 2-3 (電気泳動による分析)

1. 電気泳動

- (1) 左から順に、1, 2, 3, . . . 9 までサンプルを載せる。
- (2) 一番右に、サイズマーカーを載せる。
- (3) 電気泳動をする。
- (4) 泳動後、エチジウムブロミドで染色し、UV で DNA を光らせて、写真を撮る。

【注意】 エチジウムブロミドは発ガン性があるとされるので、触らないように注意。

※ レポート

今日の結果を見てから課題を決めますので、それに従ってレポートを作成して下さい。