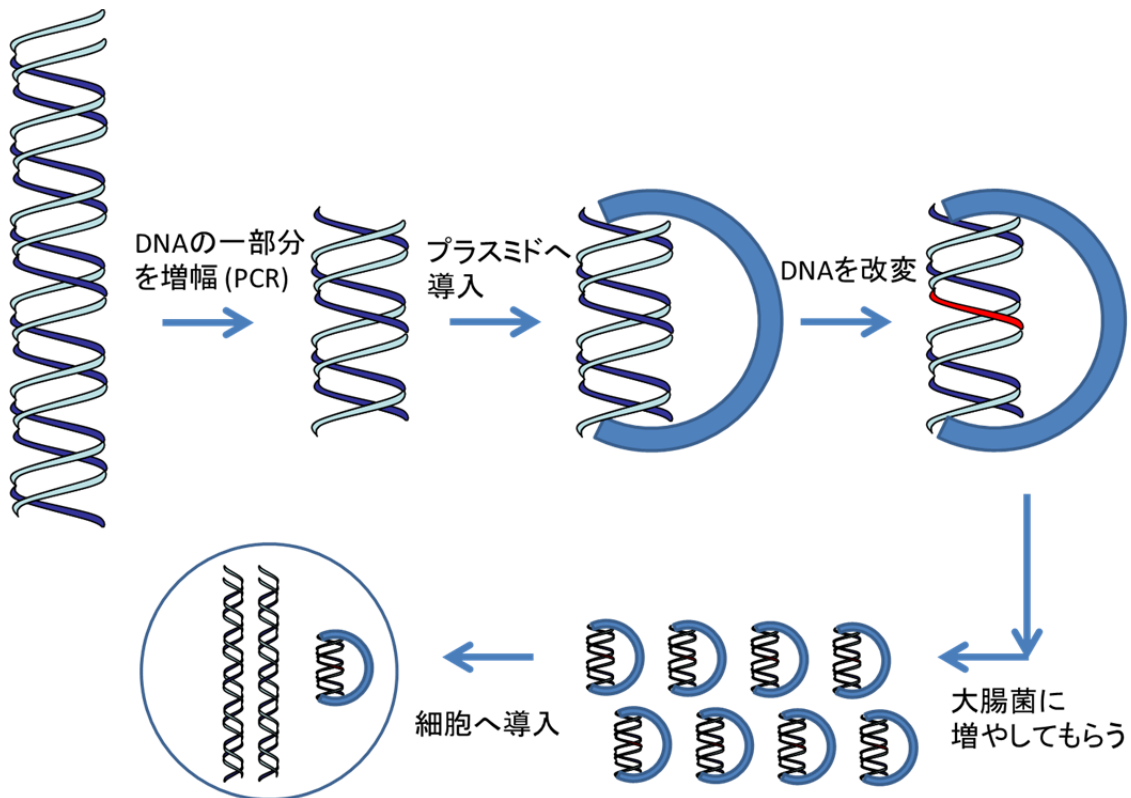


## 分子生物学実験の基礎、プラスミド DNA の精製と切断、分離を学ぼう

### 1 プラスミド DNA の精製

プラスミドは細菌(大腸菌など)の生育に必須でない染色体外 DNA であり、宿主の染色体とは独立に自律複製して安定に遺伝される。薬剤耐性や性因子などの性質に関与した遺伝情報を司っている。遺伝子組換え実験においては外来遺伝子の担体(運搬体、ベクター)として利用される。



(1)目的— プラスミド DNA の精製方法を習得する。

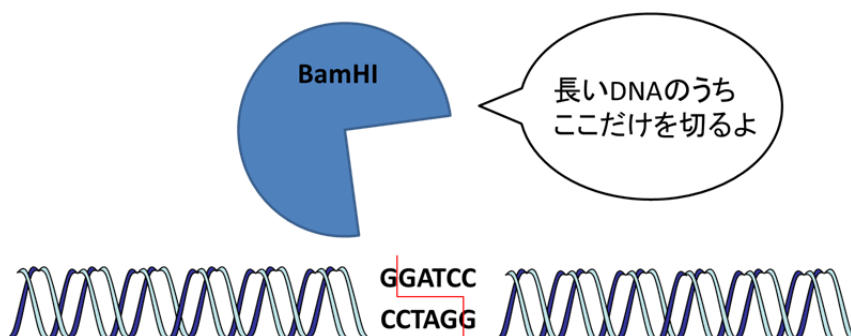
(2)操作—

- (i) 1.5ml チューブに1ml の大腸菌培養液をとり、15000rpm で30秒間遠心。
- (ii) 上清をピペット(P1000)で除去。(除去した培地はビーカーにとり滅菌)
- (iii) P1 150uL を加えて混合。
- (iv) P2 150uL を加えて混合。
- (v) P3 150uL を加えて混合。
- (vi) 15000rpm で5分遠心。
- (vii) 上清を別のチューブにとり、エタノール1ml を加え混合

- (viii) 15000rpm で 5 分遠心。
- (ix) 上清をピペット(P1000)で除去。
- (x) ペレットに 70%エタノール 0.3ml を加え、15000rpm で 0.5 分遠心。
- (xi) 上清をきれいに除去
- (xii) 卓上型微量遠心濃縮機を使って、上清を完全に除去
- (xiii) P1 を 50uL 加え、よく混ぜる。

## 2 DNA の制限酵素消化

組換え DNA 実験において DNA を切断し、これをゲル電気泳動法で分離・分析することは必要不可欠な技術となっている。一般に、DNA を切断するには制限酵素 (Restriction endonuclease) が用いられる。制限酵素は必須因子や切断部位によって 3 種類に分類され、主に II 型が遺伝子工学の実験に広く利用される。II 型はおおむね 4~6塩基対からなる2回回転対称構造(回文構造)を認識して、塩基配列特異的に2本鎖 DNA を切断する。例えば、制限酵素の一つ BamHI は、2本鎖 DNA の 5'-GGATCC-3'配列を認識して G-G 間を切断する。



(1) 目的— DNA の制限酵素消化法や DNA の取扱法を習得する。

(2) 操作—

プラスミド DNA 溶液を制限酵素を用いて、下記の 2 種類の組み合わせで消化する。

①なし ②BamHI

1.5mL マイクロチューブの中で混合

↓プラスミド DNA(1 で精製) 3  $\mu$  L

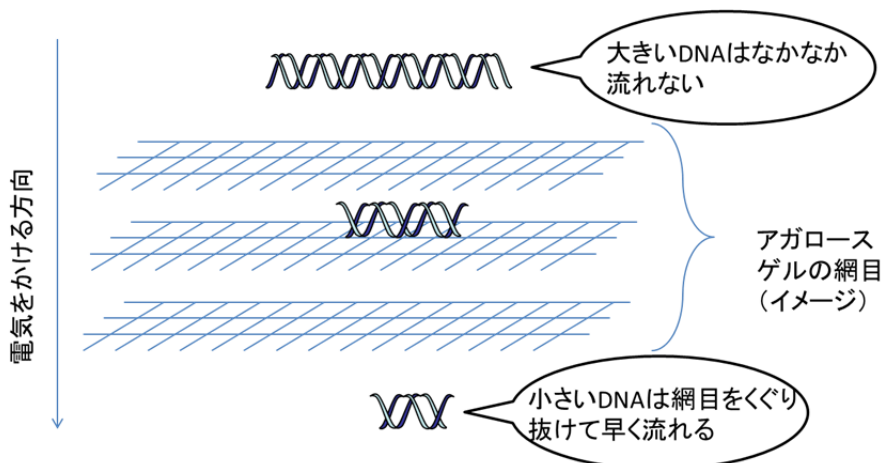
↓制限酵素 Mix (BamHI) 17  $\mu$  L ①なしでは代わりに水を添加

計 20  $\mu$  L

↓37°C、10分

### 3 アガロースゲルの作製と DNA の泳動・染色・検出

アガロースゲル電気泳動法は、アガロースゲルを担体とする電気泳動で、大きさに応じて DNA 断片を分離することができる。DNA は長さに応じた電荷を持っているため、泳動距離は長さ(分子量)の大きいものほど流れにくく、小さいものほど流れやすい。この実験では、これ以前の実験で調製した DNA 試料を分析することでアガロースゲル電気泳動の原理と実際を学ぶ。



(1) 目的—実験 1 および 2 で調製した DNA 試料をアガロースゲル電気泳動で分離し、染色後、DNA を検出する。

(2) 操作—

1.5mL マイクロチューブ		
↓	DNA	20 $\mu$ L
↓	色素液	2 $\mu$ L
	計	20

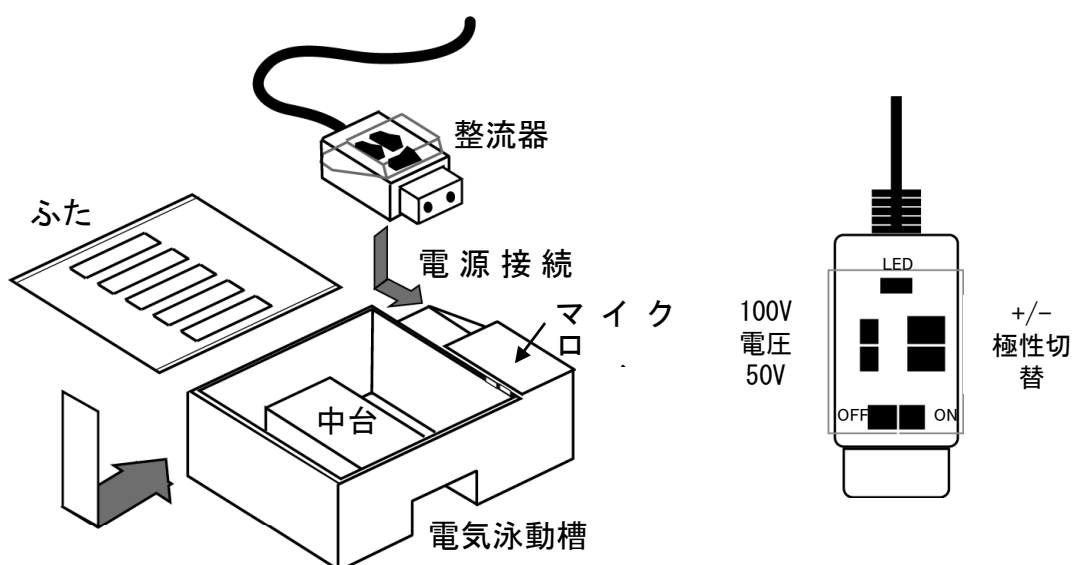
**確認！：**アガロースゲル電気泳動に使用する DNA の試料は全部で 3 種類

- ・  $\lambda$  / EcoT14I マーカー (こちらで用意) 1 種
- ・ プラスミド DNA / 制限酵素消化 1 種と未切断 1 種

【操作】アガロースゲル電気泳動

(i) 50x の泳動緩衝液 6mL を蒸留水 300mL に希釈し泳動槽に注ぐ。緩衝液は泳動槽の中台が少し沈む程度まで注ぐこと。

- (ii) ゲルメーカーからコームを静かに抜く。
- (iii) エッジを持ってゲルを取り出す。ゲル板の底や側面についた余分なゲルを取り除き、気泡が入らないように中台に乗せる(試料溝が電源部に近い方向)。
- (iv) 泳動槽に緩衝液をさらに注ぎ、ゲルを完全に沈める(泳動槽内側の線まで)。
- (v) 泳動槽のふたをはずしたまま、整流器を泳動槽本体に差し込む。プラグを差し込み、電源スイッチを ON にし、電源ランプが点灯するか確認する(この状態ではまだ通電されていない)。一度 OFF にし、電圧を 100 V に、極性を(+ -)に(電圧切替と同じ向き)あわせる。
- (vi) 試料溝に緩衝液をピペットで勢いよく入れて試料溝を洗浄する。



- (vii) 調製した試料 10  $\mu$ L をしずかに試料溝にピペッターで注入する。  
λ マーカー 4  $\mu$ L、①、②の順に入れる
- (viii) 注入し終わったら、電源スイッチを ON にし、ふたをスライドさせながらセットする(通電が始まる)。
- (ix) 泳動槽の中の電極から気体が発生しているのを確認する。また、試料に含まれた色素(BPB)が陽極側に移動することを確認する。
- (x) BPB がゲル板の4本目の線に達したら泳動をやめる。
- (xi) 電源を切り、ふたを外してゲルを静かにスチロールケースに取り出す。