

Dr. ジーン 7

植物多型解析 PCR キット

補足説明書

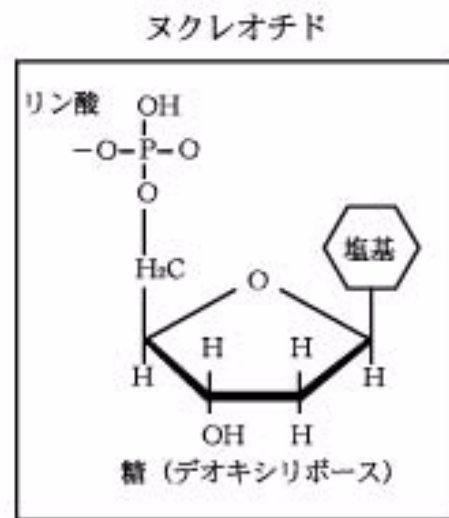
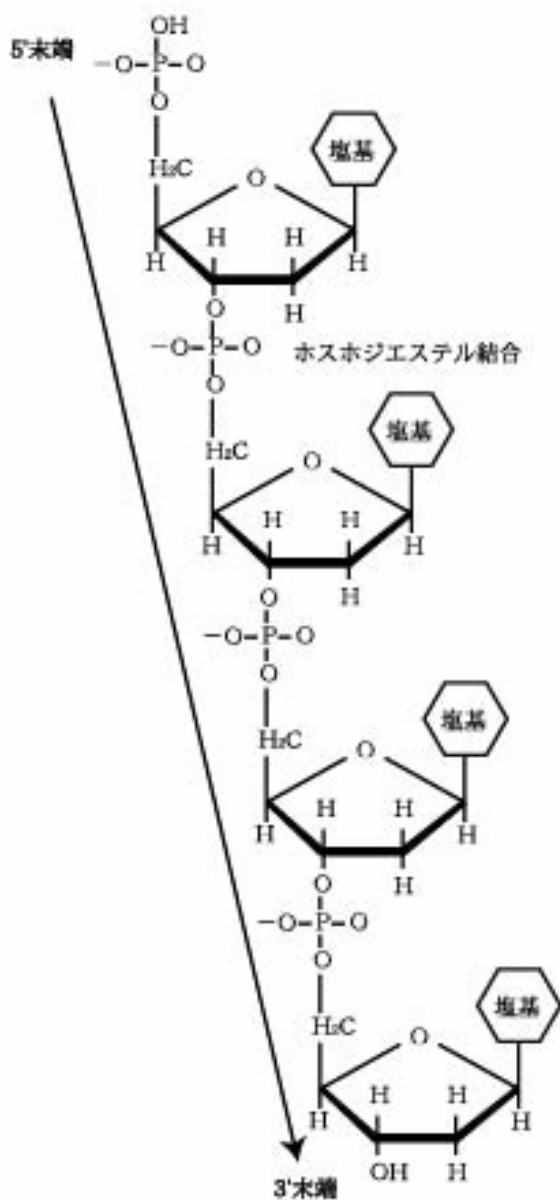
Code No. 311-08461 1 Kit (キット構成 : 6 班分)

- DNA の構造
- PCR の原理
- アガロースゲル電気泳動について
- Dr. ジーン 7 電気泳動実験の試薬必要量 (6 班分)
- 関連製品リスト

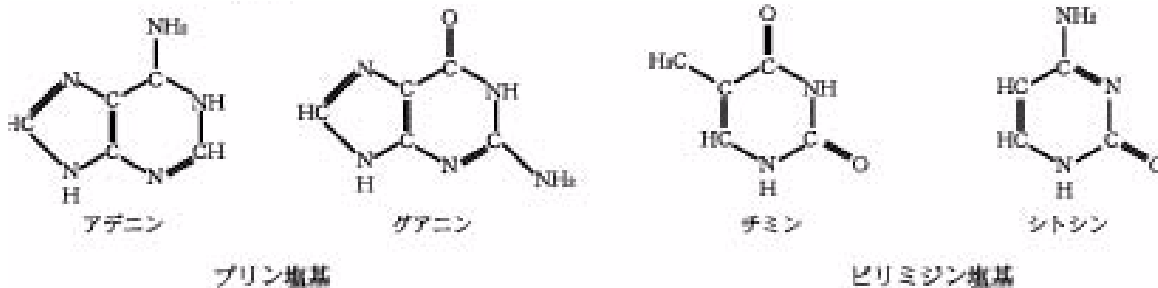
株式会社ニッポンジーン

DNA の構造

DNA (デオキシリボ核酸) は糖 (デオキシリボース)、リン酸、塩基からなるヌクレオチドがつながってできた長い鎖状の分子です。これはデオキシリボースの3'の炭素について水酸基 (OH) と5'の炭素についてリン酸のホスホジエステル結合により、鎖状に長く繋がっています。リン酸の方を5'側、水酸基の方を3'側と呼んでおり、DNA が複製される際には必ず5'側から3'側の方向で行われます。



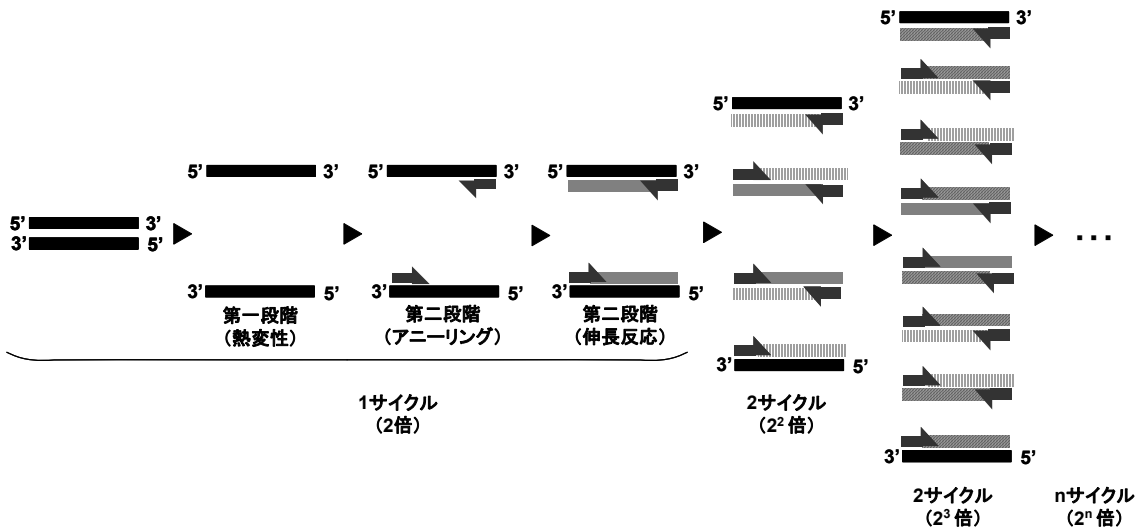
DNA を構成する塩基には A (アデニン)、G (グアニン)、T (チミン)、C (シトシン) の 4 種類あり、A と G がプリン塩基、T と C がピリミジン塩基という構造をしており、プリンとピリミジン塩基間の A と T、G と C が水素結合によって相補的塩基対をつくります。



A と T は二つの水素結合、C と G は三つの水素結合で塩基対を形成しており、これらの塩基によって相補的に結合した二本鎖の DNA は二重らせんと呼ばれる特徴的な構造をとっています。

PCR の原理

PCRとは、Polymerase Chain Reaction の略で、文字通り DNA ポリメラーゼを用いて連鎖反的的に DNA を増幅する方法です。PCRの原理は、増幅しようとする DNA とその両端の配列に相補的な一対の DNA プライマー及び耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて、3段階の温度変化をnサイクル繰り返すことによって標的 DNA を 2^n 倍に増幅するものです。温度変化の第1段階(94~96℃)で標的二本鎖 DNA を熱変性して一本鎖 DNA にアニーリングさせ、第3段階(72~74℃)で伸長反応を進めます。1サイクルで標的 DNA は2倍になります。従って、理論的には n サイクルの反応で標的 DNA は 2^n 倍に増幅されるので、20 サイクルでは約 100 万倍に増幅されることとなります。実際には数百万倍まで増幅することができます。



Dr.ジーン 7 実験の PCR サイクル

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------------------|
| 94℃ 2分 | <u>最初の熱変性</u> は、鋳型 DNA の変性を十分に行うため、長めに行う |
| ↓ | |
| 1) 94℃ 10秒間 | <u>熱変性</u> : 二本鎖 DNA を熱によって一本鎖 DNA の状態にする |
| ↓ | |
| 2) 52℃ 10秒間 | <u>アニーリング(対合)</u> : 一本鎖 DNA にプライマーが結合する |
| ↓ | |
| 3) 72℃ 30秒間 | <u>伸長反応</u> : DNA ポリメラーゼにより DNA 鎖が伸長する |
| ↓ | |
| 1)、2)、3)の三段階の温度サイクルを 35 回繰り返す | |
| ↓ | |
| 72℃ 2分間 | <u>最後の伸長反応</u> は長めに行う(省略してもよい) |

用語説明

プライマー：増幅したい DNA 領域の両端に相補的な塩基配列をもつ 15～35 塩基の一本鎖 DNA (オリゴヌクレオチド) で、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の起点となります。**フォワードプライマー (Fw)** は、鋳型 DNA の 5'→3'と同じ方向 (Forward) に伸長する足掛かりとなります。**リバースプライマー (Rv)** からは、逆方向 (Reverse) に進みます。

伸長← GGGTTTAAACCC---5'

(鋳型) 5'---AAATTTGGGCCCAAATTTGGG · · · AAATTTGGGCCCAAATTTGGGCCCAA---3'

増幅したい DNA 領域

(鋳型 ') 3'---TTTAAACCCGGGTTTAAACCC · · · TTTAAACCCGGGTTTAAACCCGGGTTT---5'

5'---GGGCCCAAATTT →伸長

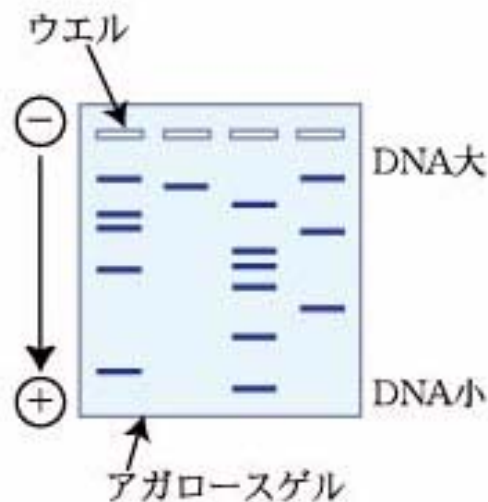
DNA のアニーリング：DNA 分子は塩基間の水素結合 (塩基対合 : base pairing) で二重らせん構造を有しますが、水溶液中で加熱していくと、ある温度で一本鎖ずつに分かれます。この溶液の温度を下げていくと一本鎖 DNA は再結合して二本鎖になります。

DNA ポリメラーゼ：鋳型 DNA に対合したプライマーを起点として、5'から 3'の方向に dNTP を結合させて DNA を合成する酵素です。多くの酵素 (タンパク質) は熱に弱いため、PCR 法では 100℃に近い高熱でも酵素活性を維持し、至適温度が 72℃である耐熱性 DNA ポリメラーゼを使用します。

dNTP：dATP、dTTP、dGTP、dCTP の 4 つの DNA を構成する基質 (デオキシリボヌクレオチド) です。

アガロースゲル電気泳動について

DNA は自身の持つリン酸の影響で負に荷電しているため、アガロースゲルに DNA サンプルをのせて電圧をかけると一極から+極に移動します。DNA がアガロースゲルの中を移動する際に、アガロースゲルの網目構造がふるいの役目を果たし、分子量の小さいものほど速く、大きいものほど遅く移動します。この移動度の差によって異なる大きさの DNA 断片をアガロースゲル中で分離することができます。電気泳動後は CLEAR STAIN Blue などの色素や臭化エチジウム (EtBr) などの蛍光色素で染色して DNA を検出します。



「Dr. ジーン 7 植物多型解析 PCR キット」を用いた実験では 1.5% の濃度のアガロースゲルを使用します。この濃度のアガロースゲルは約 200 bp (base pairs : 塩基対) から 4,000 bp の間にある DNA を分離するのに適しています。

短い DNA (数百 bp 程度) を分離したいときには、アガロース濃度を濃くします。アガロース濃度が濃くなるとアガロース中の網目構造の密度が高くなり、大きな DNA はあまり移動できなくなり、小さな DNA がよりきれいに分離できるようになります。逆に大きな DNA を分離するときにはもっと薄い濃度のアガロースを使用します。どの濃度のアガロースを使用するかは実験の目的によって変えなければなりません、それぞれの用途のために専用のアガロースが市販されています。

Dr. ジーン 7 電気泳動実験の試薬必要量 (6 班分)

Dr. ジーン 7 では、植物サンプルの DNA の一部を PCR 法で増幅し、増幅した DNA 断片のサイズをアガロースゲル電気泳動で確認します。アガロースゲル電気泳動実験で必要となる試薬量について、以下をご参照ください。

1 班あたりアガロースゲルの 6 レーンを使用

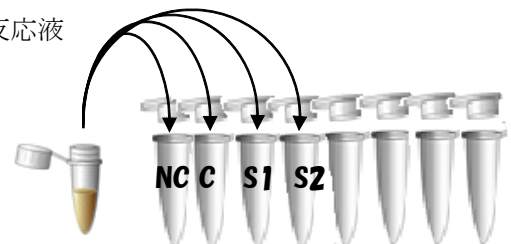
Dr. ジーン 7 の PCR 反応後の 8 連チューブ

NC : ネガティブコントロールとして、DNA の代わりに水を入れた反応液

C : コントロール DNA (ホウレンソウ DNA) を入れた反応液

S1 : 植物サンプル抽出 DNA を入れた反応液

S2 : 植物サンプル抽出 DNA を入れた反応液



反応液 50 μ l にローディングバッファ 5 μ l を混合 **ローディングバッファ 8 連チューブ**

マーカー DNA 10 μ l をアガロースゲルのウェルにアプライ

M : マーカー DNA (Gene Ladder Wide 1)

PCR 反応液を 5 μ l ずつアガロースゲルのウェルにアプライ

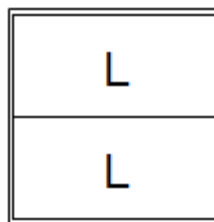
空 : 6 番目のウェルは予備のため空けておく



<Dr. ジーン 7 で 6 班分を同時に電気泳動する場合に使用する試薬の最低必要量>

6 班あたり L サイズの 1.5% アガロースゲル (12 ウェル) を 3 枚電気泳動

- ・ 電気泳動装置 (Wako #298-35271) 3 台
- ・ ゲル作製台 2 個*
- ・ L サイズ用ゲルトレイ 3 個
- ・ コーム L (12 ウェル用) 3 本



* 付属のゲル作製台に、L サイズ用トレイを 2 個セットできます。

◆ 50×TAE 100mL を 50 倍に希釈して、1×TAE を 5L 調製

以下の通り用意した場合、6 班あたり必ず使用する 1×TAE の量は 2.2L です。

◆ L サイズの 1.5%アガロースゲルを 4 枚 (3 枚+予備 1 枚) 用意

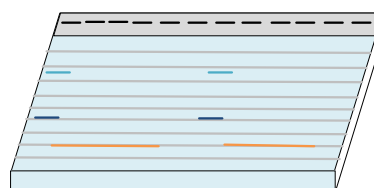
アガロース (Agarose S)	3g
1×TAE	200mL
1.5%溶解液	30~50mL×4 枚

◆ サブマリン電気泳動装置を 3 台用意

1×TAE	850mL
泳動槽に注ぐ	230~280mL×3 台

◆ アプライして電気泳動 (1 班あたり 6 レーン、2 班で 1 枚の L サイズゲルを使用)

マーカーDNA	30 μ l (5 μ l×6 班)
ローディングバッファー	120 μ l (20 μ l×6 班)
1.5%アガロースゲル	3 枚 (1/2 枚×6 班)
泳動槽に蓋をし、100V で 30~40 分間ほど泳動	



1 班あたり 6 レーン

◆ 染色専用容器 (タッパー) を 3 個用意

核酸染色用試薬 (10 倍濃度)	120mL (20mL×6 班)
1×TAE	1,080mL (180mL×6 班)
染色液	200mL×3 + 予備 (200mL×6 班)

Dr.ジーン 7 関連製品リスト

教育用バイオ実験

教育用バイオ実験キット「Dr. ジーン」	Code No.	容量
Dr.ジーン 1 ver. 2 (大腸菌形質転換キット・LacZ 発現系)	310-06351	12 反応用(6 班用)
Dr.ジーン 2 (アガロースゲル電気泳動キット)	318-05431	12 反応用(6 班用)
Dr.ジーン 6 (大腸菌形質転換キット・GFP 発現系)	314-08451	1 Kit (6 班用)
Dr.ジーン 7 (植物多型解析 PCR キット)	311-08461	1 Kit (6 班用)
Dr.ジーン 8 (DNA 鑑定キット)	318-08471	1 Kit (6 班用)
Dr.ジーン 9 (アガロースゲル電気泳動セット)	315-08481	1 Set (6 班用)
ISOHAIR Jr.	Code No.	容量
ISOHAIR Jr.	314-04431	30 回用
(毛髪からの DNA 抽出試薬、PCR 用試薬、電気泳動試薬のセット)	310-04433	60 回用