

# Dr. ジーン 8 DNA 鑑定キット 補足説明書

2024 年 5 月改訂

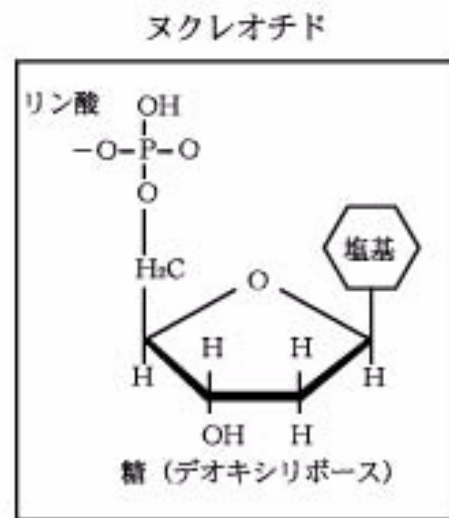
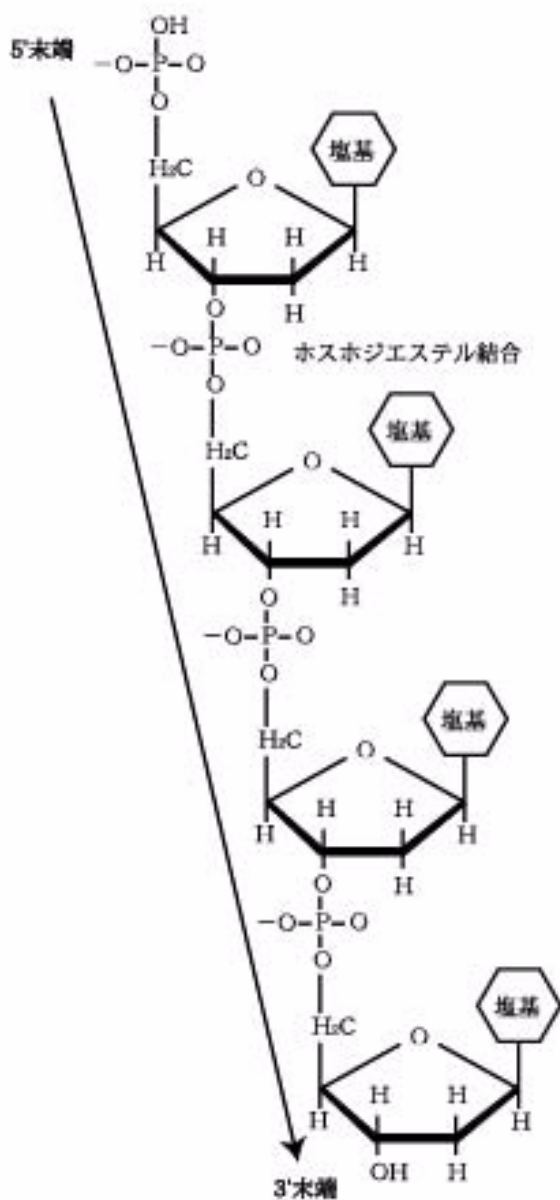
Code No. 318-08471      1 Kit (キット構成 : 6 班分)

- DNA の構造
- 制限酵素
- アガロースゲル電気泳動について
- Dr. ジーン 8 電気泳動実験の試薬必要量 (6 班分)
- 関連製品リスト

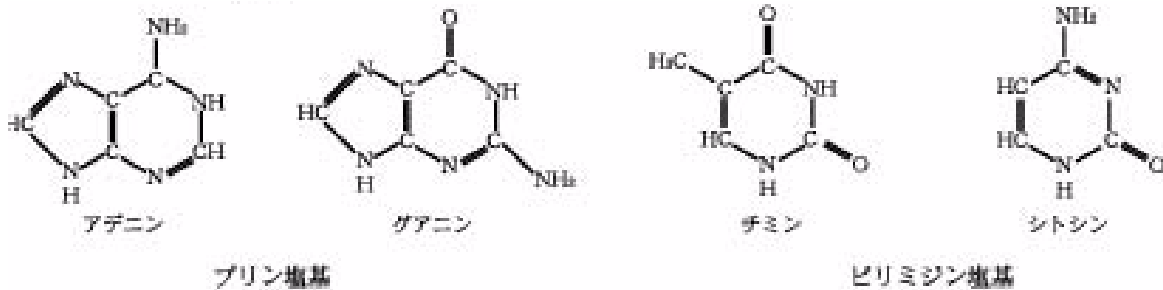
株式会社ニッポンジーン

## 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。

## 制限酵素

多くの生物は外部から細胞内に進入してくる DNA に対して自身を守るための防衛機構を持っています。細菌で見つかったこの機構のひとつは制限修飾系とよばれ、進入してきた異種 DNA を認識し分解する酵素（制限酵素）と、自分自身の DNA が切断されるのを防ぐため自身の DNA にメチル基を付けて制限酵素に認識されないようにするメチル化酵素（修飾酵素）から成り立っています。制限酵素は DNA メチル化の有無により自己、非自己の DNA を区別しています。自身の DNA はメチル化酵素によって保護されますが、メチル化されていない外部からの DNA は制限酵素により非自己と認識され、切断されます。

制限酵素はその切断の仕組み、あるいは DNA を切断するのに必要な因子の違いなどから I 型、II 型、III 型の 3 種類に分類されており、その中でも一般的な遺伝子組み換え実験に用いられている制限酵素は II 型と呼ばれている酵素です。II 型の制限酵素は、ある特定の配列を正確に認識し、決まった位置で DNA 鎖を切断します。

制限酵素の名前は一般的に頭の文字から順番に微生物の属名の 1 頭文字、種名の 2 頭文字、株名の 1 文字で表し、最後にローマ数字を付けます。<sup>\*1</sup> 同一菌株に複数の酵素が存在する場合は見つかった順にローマ数字 I、II、III というように付けることになっています。よく使われる代表的な酵素として EcoRI、HincII というものがあります。これらはそれぞれ *Escherichia coli* R13 株より単離された最初の酵素、*Haemophilus influenzae* c1161 株より二番目に単離された酵素です。酵素の名前の読み方は、そのままアルファベットを読んでもかまいませんが、一般的には酵素の名前をそのまま英語やローマ字読みに当てはめて、例えば EcoRI は「エコアールワン」、HincII は「ヒンクツー」というように読むことが多いようです。

\*1 制限酵素の命名法では当初、属名、種名から取ってきた 3 頭文字をイタリック（斜体）で表記することが推奨されていましたが、次の文献で「制限酵素の表記にイタリックを使用しない」という方針が明確化され、現在ではその論文で提案された表記法が主流になりつつあります。

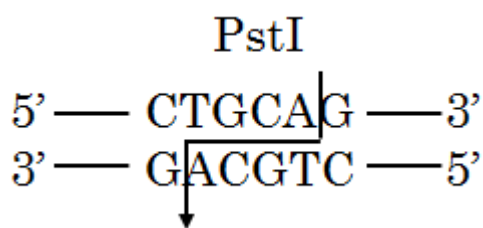
Roberts, R. J. *et al.* A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1805-1812 (2003).

制限酵素の多くは 3~8 個の特異的な塩基配列を認識し、またその多くがパリンδροームと呼ばれる配列になっています。パリンδροームとは、次の図のように二本鎖 DNA の制限酵素認識部位をそれぞれ 5' 側から見たときに全く同じ配列になっていて、その認識配列の中心から見てちょうど点対称になるような構造をしているもののことをいいます。例えば EcoRI は 5' 側から GAATTC という 6 つの塩基配列を認識し、次の図の矢印の場所で DNA を切断します。



切断後は図の右のように 5' 側の TTAA の配列が一本鎖で飛び出した構造になります。制限酵素の種類によってこのように 5' 末端が突き出した形になるものや、3' 末端が突き出した形になるもの、あるいは二本鎖が同じ箇所切断されて末端が平らな形になるものがあります。また、制限酵素の中にはまったくパリンδροームでない数塩基を認識し、その認識配列から数塩基離れた箇所を切断するものもあり、遺伝子工学の実験では、こういった酵素の特徴をうまく利用してさまざまな組換え体が作られています。

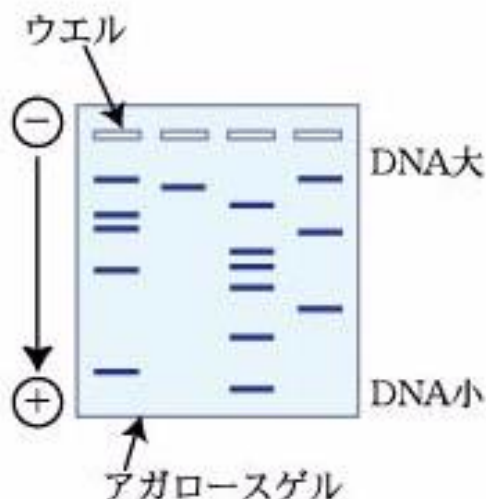
本キットには PstI (ピーエステーワン、あるいはプストワン) という制限酵素が入っています。これは *Providencia stuartii* 164 株という菌株由来の酵素で、CTGCAG という配列を認識して DNA を切断します。



上の図のように PstI は 3' 側に 4 塩基飛び出した形で DNA を切断します。

## 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 8 DNA 鑑定キット」を用いた実験では 1%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 400 bp (base pairs : 塩基対) から 8,000 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る必要があります。また、目的別に専用のアガロースが市販されています。

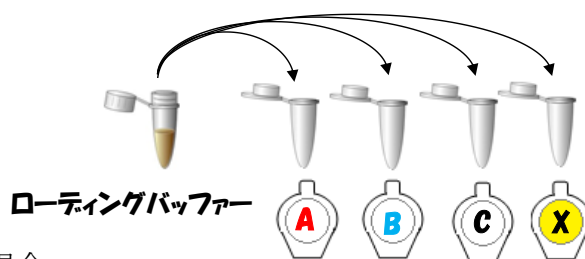
## Dr. ジーン 8 電気泳動実験の試薬必要量 (6 班分)

Dr. ジーン 8 では、3 種類の異なるプラスミド DNA 「A」「B」「C」と、この 3 種類のうちのどれかと同じ配列を持つプラスミド DNA 「X」を用いて模擬 DNA 鑑定を行います。実験では、プラスミド DNA を制限酵素で切断し、生じた DNA 断片を電気泳動で分離します。次に、分離した DNA 断片を比較し、プラスミド DNA 「X」が「A」「B」「C」のどれにあたるか鑑定します。

### 1 班あたりアガロースゲルの 12 レーンを使用 (1 班あたり 2 テスト実施)

#### Dr. ジーン 8 の制限酵素反応後の 8 本のチューブ (4 本×2 テスト)

- A : 遺伝子「A」反応液
- B : 遺伝子「B」反応液
- C : 遺伝子「C」反応液
- X : 遺伝子「X」反応液



反応液 20  $\mu$ l にローディングバッファー 5  $\mu$ l を混合

マーカー DNA 5  $\mu$ 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)

酵素反応液を 10  $\mu$ l ずつアガロースゲルのウェルにアプライ

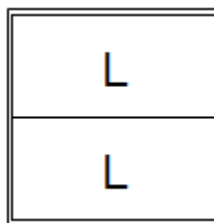
空 : 6 番目のウェルは予備のため空けておく



<Dr. ジーン 8 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% アガロースゲル (12 ウェル) を 6 枚電気泳動

- ・電気泳動装置 (Wako) 6 台
- ・ゲル作製台 3 個\*
- ・L サイズ用ゲルトレイ 6 個
- ・12 ウェル用コーム 6 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 2.1L (~3.1L) です。

◆ L サイズの 1%アガロースゲルを 6 枚用意

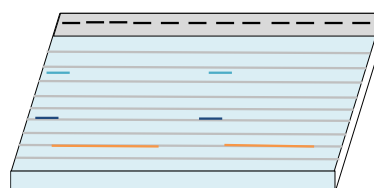
|                   |             |
|-------------------|-------------|
| アガロース (Agarose S) | 3g          |
| 1×TAE             | 300mL       |
|                   |             |
| 1.5%溶解液           | 30~50mL×6 枚 |

◆ サブマリン電気泳動装置を 6 台用意

|        |               |
|--------|---------------|
| 1×TAE  | 1,700mL       |
|        |               |
| 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 1 枚の L サイズゲル使用 : 2 テスト分の 12 レーン)

|                             |                    |
|-----------------------------|--------------------|
| マーカーDNA                     | 60 μl (10 μl×6 班)  |
| ローディングバッファー                 | 240 μl (40 μl×6 班) |
| 1%アガロースゲル                   | 6 枚 (1 枚×6 班)      |
|                             |                    |
| 泳動槽に蓋をし、100V で 30~40 分間ほど泳動 |                    |



1 テストあたり 6 レーン

◆ 染色専用容器 (タッパー) を 6 個用意

|                  |                       |
|------------------|-----------------------|
| 核酸染色用試薬 (10 倍濃度) | 120mL (20mL×6 班)      |
| 水 (または 1×TAE)    | 1,080mL (180mL×6 班)   |
|                  |                       |
| 染色液              | 200mL×6 個 (200mL×6 班) |



## Dr.ジーン 8 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        |