

バイオ実験キット Dr.ジーンシリーズ

Dr.ジーン 8
DNA鑑定キット

取扱説明書 第4版

2024年5月改訂

株式会社ニッポンジーン

富士フイルム和光純薬株式会社

目次

1. 本キットについて	3
2. キット内容	
キット構成	4
キット以外に必要なもの	5
3. 使用上の注意	6
4. 実験準備	
1) 氷の準備	7
2) ウォーターバスの準備	7
3) 遺伝子 X の準備	7
4) 電気泳動の準備	8
5. 実験の流れ	10
6. 実験プロトコル	11
1) 実験をはじめる前に	12
2) 実験操作	13
7. データの解析	18

1. 本キットについて

本キットは、制限酵素のはたらき、アガロースゲル電気泳動についての学習を通して、法医学や食品の同定等で行われる DNA 鑑定を模擬的に体験することができます。

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。プラスミド DNA「X」は実験前に選ぶため各班異なる結果にすることができます。

本キットにはアガロースゲル電気泳動を行うための試薬は付いておりません。

電気泳動を行うためには、別売の「Dr.ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット」をご購入ください。「Dr.ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット」は、発がん物質を含まない「CLEAR STAIN Blue」という染色試薬を用いています。核酸は青色に染まり、安全に目視での観察ができます。(UV イルミネーター等特別な装置は必要ありません。)

2. キット内容

1) キット構成(6班分)

内容	容量	数量	保存	チェック
遺伝子 A	10 μ l	16 本	-20°C	<input type="checkbox"/>
遺伝子 B	10 μ l	16 本	-20°C	<input type="checkbox"/>
遺伝子 C	10 μ l	16 本	-20°C	<input type="checkbox"/>
ラベル「遺伝子 X」(※)	—	16 枚	-20°C	<input type="checkbox"/>
制限酵素-バッファー混合液	60 μ l	12 本	-20°C	<input type="checkbox"/>
チューブ立て	—	6 枚	室温	<input type="checkbox"/>
フロート	—	12 枚	室温	<input type="checkbox"/>

(※) ラベルは-20°C品の箱に入っており、実験前に準備が必要です。「4. 実験準備」をご参照ください。

2) キット以外に必要なもの

	補足	チェック
マイクロピペット：～20 μl 用	20 μl 用(P20)のみで実験ができます。	<input type="checkbox"/>
マイクロピペット用チップ	オートクレーブ滅菌済が望ましいですが、未滅菌でも構いません。	<input type="checkbox"/>
ウォーターバス (37℃)	制限酵素反応で使用します。インキュベーターでも構いません。	<input type="checkbox"/>
氷、及び氷を入れる容器	各班 1 つ以上ずつが望ましいです。	<input type="checkbox"/>
油性ペン	極細が便利です。記名に使用します。	<input type="checkbox"/>
滅菌用エタノール (70%程度)	実験台を拭く際に使用します。	<input type="checkbox"/>
廃棄チップ入れ	使用済みチップを入れます。 ビーカーや半分に切ったペットボトルでも代用可能です。	<input type="checkbox"/>
電気泳動に必要な試薬 (Dr.ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット)	アガロース、泳動用バッファー、マーカー DNA、ローディングバッファー、核酸染色用試薬が必要です。	<input type="checkbox"/>
電気泳動装置一式 (電気泳動槽、パワーサプライ、ゲル作製台、ゲルトレイ、コーム)	「Dr. ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット」は MARINE23ST(wako #298-35271)の使用を想定して作られています。Mupid-2plusなどの他の小型電気泳動装置でも使用できます。電気泳動の際は感電しないように十分注意してください。	<input type="checkbox"/>

※ 本キットには PCR 反応後の電気泳動を行うための試薬は付いておりません。別売りの、「Dr.ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット」(1 Kit) で本キット (1 Kit) には必要な電気泳動試薬がそろっています。

3. 使用上の注意

- ◆ 本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用できません。また、試薬についての基本的な知識を十分に理解した上で使用してください。
- ◆ 本品の取扱いは、マニュアルの記載通りに行ってください。マニュアルの記載内容と異なった取り扱いによるトラブル、事故につきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ◆ 本品の仕様は、ご使用になったお客様のご意見等を参考に予告なく変更されることがあります。

4. 実験準備

以下の操作はあらかじめ実験を指導する方が行ってください。
時間に余裕がある場合は学生が行ってもかまいません。

1) 氷の準備



可能であれば各班の分を準備します。
氷が大きい場合は氷中にチューブを差し込むことができるサイズに砕いてください。
氷水を作ります。氷が少量しか用意できない場合は、水を多くし、フロートでチューブを浮かべて使用してください。

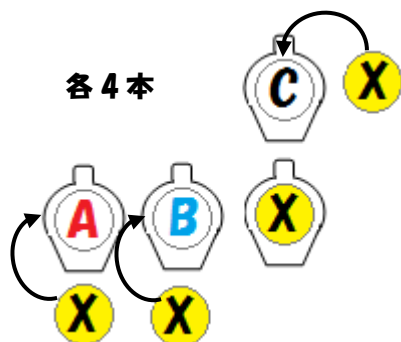
実験中に氷が溶けないように注意してください。

2) ウォーターバスの準備



ウォーターバスに 37°Cのお湯を準備します。実験中、お湯の温度は必ず一定に保ってください。
エアインキュベーターがある場合はそちらを利用して問題ありません。

3) 遺伝子 X の準備



キットには遺伝子 A、遺伝子 B、遺伝子 C のチューブが各 16 本添付されています。16 本の内 4 本を「遺伝子 X」として使用します。実験が始まる前に、付属の「遺伝子 X」のシールを遺伝子 A、遺伝子 B、遺伝子 C のラベルに重ねて張り付けてください。

遺伝子 A～C は各 12 本ずつ必要になります。

チューブの蓋や側面に試薬が飛び散り、チューブの底にない場合があります。卓上遠心機を使用し、チューブの底へ集めてください。卓上遠心機がない場合は、手で振って落とすとしても構いません。

4) 電気泳動の準備

必要な試薬

電気泳動に必要な試薬・装置は以下の通りです。

1 実験あたり 6 レーン (6 ウェル) 使用します。

1 班あたり 2 実験行う場合、6 班で 1%アガロースゲル(12 ウェル)を 6 枚使用します。

	必要数	
電気泳動装置 MARINE23ST (wako#298-35271)	6 台 / 6 班	<input type="checkbox"/>
電気泳動用試薬 Dr.ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット (ニッポンジーン#315-08481)	1 set / 6 班	<input type="checkbox"/>

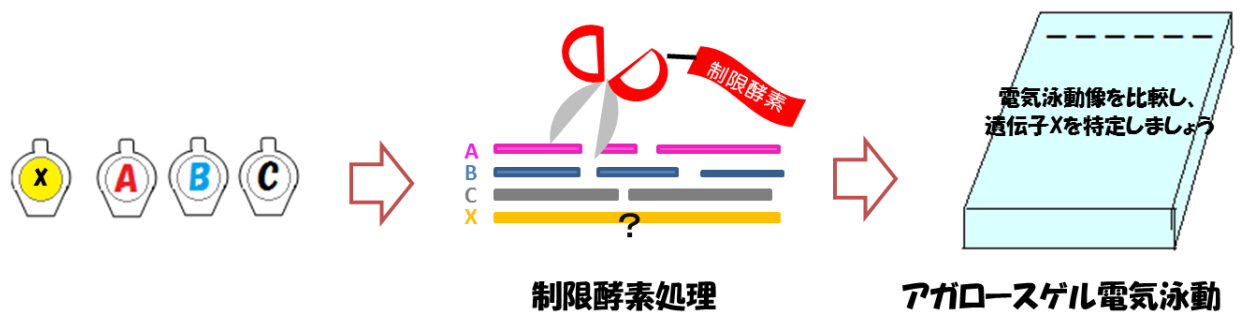
※ 「Dr.ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット」のキット構成は単品でもご購入になれます。詳しくは、ニッポンジーンのホームページより、Dr.ジーン 9 取扱い説明書をご参照ください。

試薬の調製

詳しくは、「Dr. ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット」の取扱説明書をご参照ください。詳細な準備方法が記載されています。

	必要量	
1%アガロースゲル	L サイズゲル(12 ウェル) 6 枚 / 6 班	<input type="checkbox"/>
1×TAE	4L / 6 班	<input type="checkbox"/>
染色液	1200 ml / 6 班	<input type="checkbox"/>

7. 実験の流れ



【模擬 DNA 鑑定】

3種類の DNA (A・B・C) と、DNA (A・B・C) のいずれかと同じ配列を持つ DNA「X」があります。DNA「X」は A・B・C のどれにあたるかを特定しましょう。

制限酵素処理、アガロースゲル電気泳動を行い、模擬 DNA 鑑定を行います。

制限酵素は 2 本鎖 DNA 中の特定の塩基配列を認識し、切断する酵素です。

本実験で使用する制限酵素 *Pst* I が 3 種類の DNA (A・B・C) の特定の塩基配列を認識し、切断します。3 種類の DNA (A・B・C) の配列はそれぞれ異なるため、切断のパターンも異なります。そのため、異なる大きさの DNA 断片が得られます。

アガロースゲル電気泳動は、異なる大きさの DNA 断片を目視で確認する方法です。アガロースゲル上では DNA 断片の大きさによって泳動速度が異なるため、DNA 断片を分離することができます。

5. 実験プロトコル

実験の流れ

	内容	温度	時間
実験準備			
<input type="checkbox"/>	必要なものがそろっているか確認	室温	5分
<input type="checkbox"/>	チューブ、プレートへの記名、準備		
制限酵素反応			
<input type="checkbox"/>	試薬の調製	氷水上	10分
<input type="checkbox"/>	37°Cでインキュベート	37°C	15分
電気泳動			
<input type="checkbox"/>	サンプルのアプライ	室温	10分
<input type="checkbox"/>	電気泳動		30分
染色・脱色			
<input type="checkbox"/>	染色	室温	30分
<input type="checkbox"/>	脱色	37°C	15分~2時間
観察		室温	—

※時間は目安です。実験に慣れた人であれば短くなります。

※下線部分については、時間を厳守してください。

1) 実験をはじめる前に

実験を行う際は、実験室の窓および扉は閉めておいてください。

- ①石鹸で手を洗います。
- ②ティッシュペーパーやペーパータオル等に滅菌用 70%エタノールを含ませ、実験台を拭きます。
- ③以下の試薬が実験台にあるか確認してください。(一つの班に必要な試薬です。) 一つの班で、2 実験行うことができます。

内容	容量	数量	保存	チェック
遺伝子 A	10 μ l	2 本	-20 $^{\circ}$ C	<input type="checkbox"/>
遺伝子 B	10 μ l	2 本	-20 $^{\circ}$ C	<input type="checkbox"/>
遺伝子 C	10 μ l	2 本	-20 $^{\circ}$ C	<input type="checkbox"/>
遺伝子 X	10 μ l	2 本	-20 $^{\circ}$ C	<input type="checkbox"/>
制限酵素ーバッファー混合液	60 μ l	2 本	-20 $^{\circ}$ C	<input type="checkbox"/>
チューブ立て	—	1 個	室温	<input type="checkbox"/>
フロート	—	2 個	室温	<input type="checkbox"/>

実験操作における注意点

チップは使い捨てです。


一度チューブ内へ入れたチップは捨て、毎回新しいチップを使用してください。

コンタミネーションを防止します。

コンタミネーションとは、不必要なものが混入することを意味します。

各遺伝子が混ざると予想される結果と異なる結果がおきます。

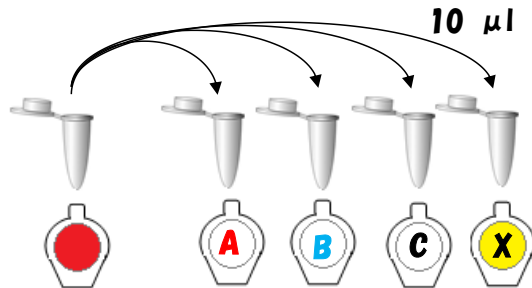
2) 実験操作

実験手順	注意点
＜実験の準備＞	
<p>1. 遺伝子 X を選びます。</p> <p>2. 各チューブの蓋に油性ペンで名前、班名等を記入します。</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>3. 「制限酵素－バッファー混合液」を氷上に置き融解していることを確認します。(*1)</p> <p>「制限酵素－バッファー混合液」、「遺伝子 A」、「遺伝子 B」、「遺伝子 C」、「遺伝子 X」内の溶液がチューブの側面や蓋に飛び散り、チューブの底にない場合があります。チューブの底へ集めてください。</p>	<p>1つの班で2実験行うことができます。</p> <p>1実験あたり4本(各遺伝子1本)のチューブを使用します。</p> <p>氷上で操作してください。</p> <p>卓上遠心機を使うと便利です。卓上遠心機がない場合は、手で振って落としても構いません。</p>

- (*1) 「制限酵素－バッファー混合液」には、制限酵素 PstI と制限酵素反応を行う際に必要なバッファーが含まれています。通常の制限酵素反応では、制限酵素、バッファー、H₂O を用い「制限酵素液」を自分で調製してから行います。

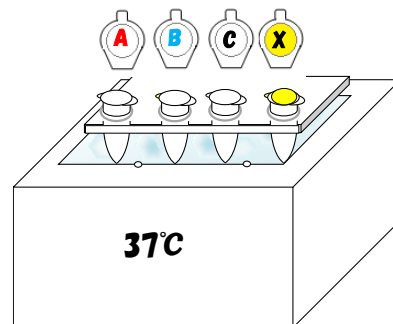
<酵素反応>

4. 遺伝子 A・B・C、遺伝子 X のチューブへ「制限酵素-バッファー混合液」10 μ l を添加します。ピペッティングでよく混和します。



制限酵素-バッファー混合液

5. 反応液の入ったチューブを 37°C のインキュベーターまたはウォーターバスに入れ、15 分間インキュベートします。(*3)



15 分間以上インキュベート

ピペッティングの際、気泡が発生しないように気をつけてください。(*2)

反応時間は必ず 15 分以上行ってください。(*4)

(*2) 制限酵素が空気に触れることにより酸化し、制限酵素の劣化の原因になります。

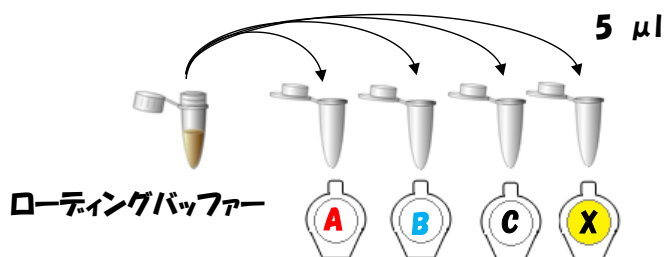
(*3) インキュベーター：機器内を一定の温度に保つことができる培養機です。制限酵素 *Pst*I の酵素活性の至適温度は 37°C です。酵素の至適温度で保温し、DNA を切断します。

(*4) 酵素は十分量入っていますが、反応時間が短すぎると酵素反応が不十分になり DNA が完全に切断されないことがあります。

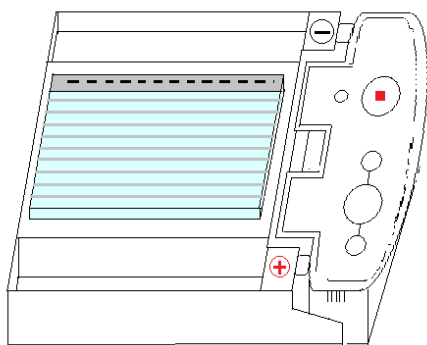
ここからは、1枚の1%アガロースゲル(12ウェル)を使用して、2実験分の電気泳動を行います。電気泳動の操作について詳細は、「Dr. ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット」取扱説明書をご参照ください。

＜アガロースゲル電気泳動＞ (Dr.ジーン 9の使用を想定しています。他社の試薬を使用する場合は適宜変更してください。)

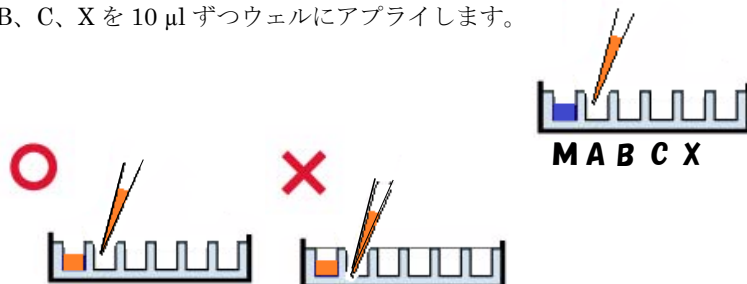
6. ローディングバッファーを 5 μ l ずつ反応液の入ったチューブに加え、ピペティングを数回行い、反応液を混合します。



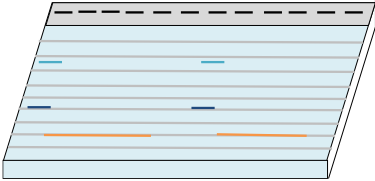
7. あらかじめ作製しておいた泳動用バッファー (1×TAE) を泳動槽に約 230 ml (目安) 注ぎ、アガロースゲルを泳動槽に置きます。ゲルはウェル (コームで作った DNA サンプルを入れるための穴) がある方がマイナス(-)極側になるようにしてください。



8. マーカーDNA を 5 μ l、ローディングバッファーを添加したサンプル A、B、C、X を 10 μ l ずつウェルにアプライします。



このとき、チップの先をゲルに突き通さないように注意してください。

<p>9.</p>	<p>泳動槽に蓋をし、100V で約 30～40 分、あるいは 50V で 60 分～90 分程泳動します。泳動時間は使用する電気泳動槽によって異なります。低い電圧で流すと時間はかかりますが、きれいな泳動像が得られます。</p> <p><u>電気泳動中は泳動槽のバッファー内に手や指などを入れないでください。感電する恐れがあり危険です。</u></p> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 20px;">  <div data-bbox="715 611 1082 790"> <p>オレンジ色の色素がゲルの末端(+極側)から 2 cm 程度まできたら、泳動を止めてください。</p> </div> </div>	<p>電気が流れると電極の白金線より泡が発生します。</p>
-----------	--	--------------------------------

＜染色・脱色＞		
10.	<p>ゲルをゲルトレイからはずし、染色用容器（タッパーなど）へ入れます。</p> <p>以下に「Dr. ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット」の染色方法の一例を示します。</p> <p>染色例)</p> <p>①染色液に 30 分間つけます。</p> <p>②染色液から取り出し、55℃以下のお湯につけ脱色します。</p> <p>約 15 分程度でバンドを確認することができます。</p>	<p><u>アガロースゲルは壊れやすいので、取り扱いには十分注意してください。熱湯は使わないでください。</u></p>
11.	<p>写真等で記録を残す場合は、常温の水に 2 時間つけます。</p>	<p><u>デジタルカメラよりも、スマートフォン、コピー機をお勧めします。</u></p>

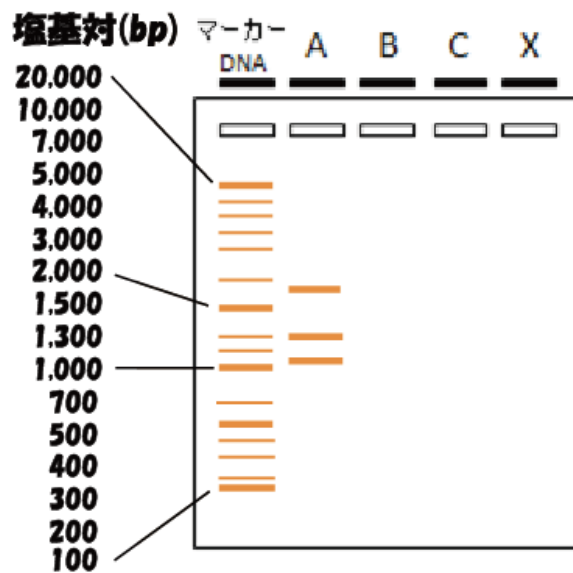
7.データの解析

結果の考察

<考察>

1. 遺伝子 X は遺伝子 A・B・C のどれですか？ ()
2. 各断片の長さは何塩基対(base pair、bp)ですか？

(下の図を完成させて推測してみよう)



(ヒント)

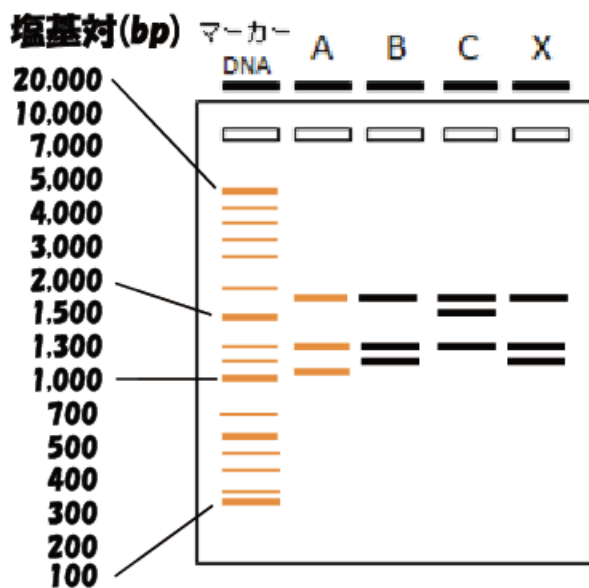
遺伝子 A の各断片の長さは、上からおよそ 2,700 bp、1,500 bp、1,100 bp です。

結果の解説

<解答例>

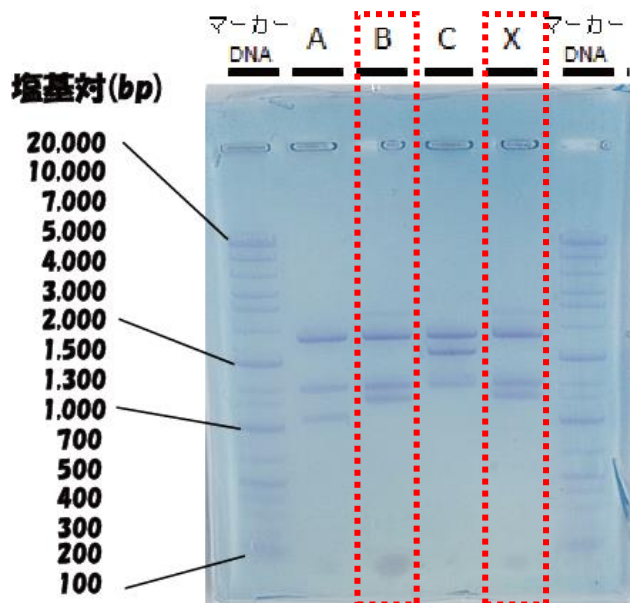
1. 遺伝子 X は遺伝子 A・B・C のどれですか？ (**B**)
2. 各断片の長さはおおよそ何塩基対(base pair、bp)ですか？

(下の図を完成させて推測してみよう)



(ヒント)

遺伝子 A の各断片の長さは、上からおおよそ 2,700 bp、1,500 bp、1,100 bp です。



(実際の各断片の長さ)

A : 2,680 bp、1,500 bp、1,093 bp

B : 2,680 bp、1,500 bp、1,300 bp

C : 2,680 bp、2,140 bp、1,500 bp

X の電気泳動像は、B と同じとなり、X は B となる。

8. 廃棄物の処理

1) 実験後の培地、器具等の廃棄について

電気泳動バッファー(TAE 廃液)は産業廃棄物として処理してください。

染色液 (CLEAR STAIN Blue と 1×TAE の混合液) は、活性炭に色素を吸着させろ過します。活性炭は可燃物、ろ液(TAE 廃液)は産業廃棄物として処理してください。

アガロースゲルは可燃物として廃棄してください。

製品についてのお問い合わせ先

富士フイルム和光純薬株式会社

フリーダイヤル: 0120-052-099

フリーファックス: 0120-052-806

株式会社ニッポンジーン

TEL: 076-451-6548

ホームページ: <http://www.nippongene.com/siyaku/>