

PCR法を用いた酵母（菌体）のDNA解析（韮崎高校用）

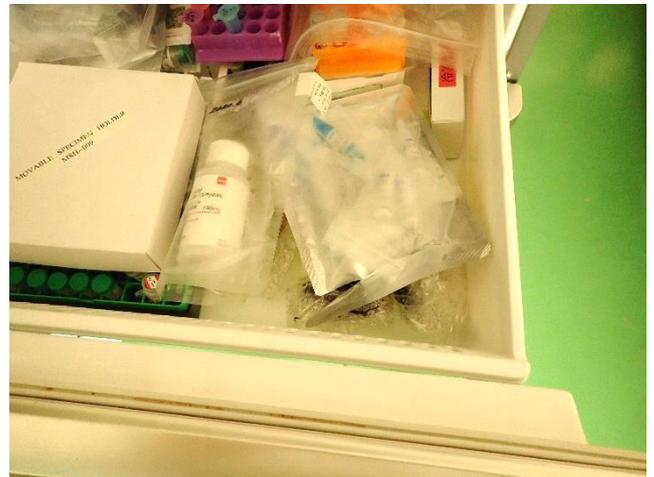
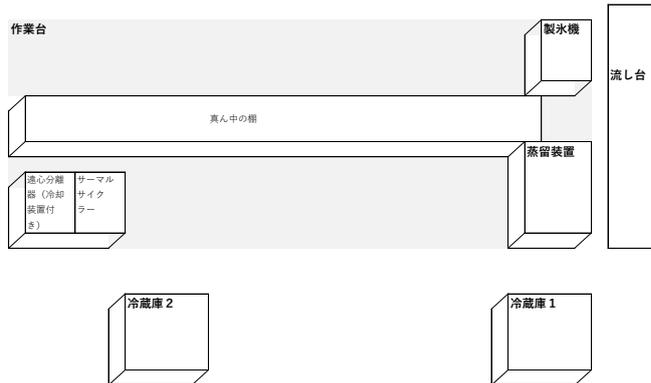
この説明書は韮崎高校の器具の使用を前提として、韮崎高校の生徒が校内で実験をする際、これを見ながら作業をするために作成されたものです。生徒は必ず動画で操作方法をよく理解してから、実験を行ってください。動画は時短のために編集したものと、未編集のものがあります。編集したものは1.3～1.5倍速となっているので、実際の作業速度がどれくらいか、細かく確認する必要がある等、用途に応じて見分けてください。なお、動画は一般には公開していません。校内で視聴してください。

【注意1】手袋をして、アルコール消毒。もし、手袋をしている状態でテーブル等に触れてしまった場合は再度、アルコール消毒。

【注意2】使用後の薬品の処理は、理科の先生とよく相談を

1. 生物準備室配置図と冷凍庫の中身

| | | | | |
|------|------|------|------|------|
| 上段 1 | 上段 2 | 上段 3 | 上段 4 | 食器入れ |
| 下段 1 | 下段 2 | 下段 3 | 下段 4 | |



2. 使用道具一覧

| | |
|--|--|
| <p>① マスターミックス…冷蔵庫2の引き出し（右上写真）。袋に入っている。</p>  | <p>② プライマー…同左</p>  <p>③</p> |
| <p>④ 柄つき針…教員側棚上段3</p> | <p>⑤ 爪楊枝</p> |
| <p>⑥ サランラップ…食器入れ上部</p> | |
| <p>⑦ 金属台…教員側棚上段1</p> | <p>⑧ チップ…教員側棚上段1</p> |

| | |
|---|--|
| <p>⑨ 卓上遠心分離機</p> | <p>⑩ アガロースゲル…冷蔵庫1の扉に</p>  |
| <p>⑪ バッファー…冷蔵庫2の中。アガロースゲルに入れるのも、電気泳動に使うのもこちら。</p>  | <p>⑫ エチルプロマイド…冷蔵庫2の扉のたな 絶対に素手では触らないこと!</p>  |
| <p>⑬ 電気泳動のゲルを固める型</p> | <p>⑭ DNA マーカー…1, 2と同じマイナス10℃の袋の中</p>  |
| <p>⑮ 電気泳動の機械…教員側棚下段1</p> | <p>⑯ トランスイルミネーター</p> |

I DNAの抽出 動画ファイル名：PCR1 (チップに試薬と菌体を入れる)

1. 実験道具の用意

①薬品(表1)の解凍 作業開始1時間以上前に冷凍庫(-10℃)から取り出し、氷を敷き詰めた発泡スチロール容器に入れる。その氷入り発泡スチロール箱はその後の約5時間の作業でも使うので氷は多めに。

表1 冷凍されているもの

| | 1つ分 | 8つ分 |
|------------|--------------|-------------|
| ① マスターミックス | 25 μ L | 200 μ L |
| ② プライマー | 0.25 μ L | 2.0 μ L |
| ③ プライマー | 0.25 μ L | 2.0 μ L |
| 滅菌水 | 4.5 μ L | 36 μ L |

※プライマーは熱に弱いのでチューブの側面は触らない。体温で壊れてしまうから。

※マスターミックスは菌体の鋳型 DNA とプライマーを加えれば、簡単に電気泳動ができる(会社HPより)

②滅菌水を作っておく。

ピーカーに蒸留水を入れ、ラップをして、爪楊枝等で穴をあけてオートクレーブ、もしくはクリーンベンチ。今回は冷凍されていた滅菌水を使う。

③ ⑤爪楊枝か④柄つき針を滅菌しておく。

⑥サランラップでぐるぐる巻きにして、オートクレーブもしくはクリーンベンチへ。ただし、④柄つき針は

オートクレーブは使えない。

④発泡スチロールの中に金属台を入れ、チップをセット。チップは金属台にちょうどハマる大きさのものを使用（作業が楽になるため）。チップのフタに油性ペンで番号をかく。（動画では消毒したアルミ箔を敷いて、その上に柄つき針を置いている）

【以下、すべての作業は氷上の金属台の上で】

⑤チップに滅菌水 36 μ L と①マスターミックス 200 μ L, ②③プライマー 2 μ L \times 2 を入れる。

（動画に出てくる OB の研究ノートにはこの後、再度滅菌水 20 μ L 入れるとあったが、体感的にここで滅菌水を追加しない方が成功率が高いことから途中から入れなくなっただけらしい。）

⑥8本のチップに⑤の混合液を移していく。1つ当たり 29.75（約 30） μ L

プライマーの量が少ないので一度大きい量を作ってしまうと 8 等分した方が、しっかり入る。

⑦柄つき針で8つの培地からそれぞれ菌体をほんの少しだけ取り（目で見えないほど）、8つのチップに入れる（入れるときはしっかり針を振る）

II PCR(サーマルサイクラー使用)

動画ファイル名：PCR2（サーマルサイクラーとゲル作成）

②⑨遠心分離に一瞬かける。（卓上遠心分離）放射状になるように配置。

③サーマルサイクラーのスイッチを入れる

チップをセットする

前使った人が終わった段階で電源を落としていたら、ストップ→OK→Runが出てきたら、OK を押して KABUTO にして OK→スタート（詳細は動画で確認を）

約 1 時間

III 電気泳動

※ 遠心分離機（冷却装置付き）の電源を入れて冷やしておく

【ゲルの作成】

①⑩アガロース粉末 3g はかる

②⑪バッファー液を 50 倍に希釈して入れる（バッファー液 2mL, 蒸留水 98mL とにかく 50 倍になっていけばよい）（黄色いラベル）

③レンジで沸騰させる。

断熱手袋を必ず使う。温めボタンをおし、覗きながら感覚で止め、ちょっと振る。しばらくしたら開けてちょっと振る。

動画ファイル名：PCR3（電気泳動）

④手で触れるくらい冷えてから、⑫エチルブロマイドを 5 μ L 加え、混ぜるように少し振る。

⑤⑬型にシキイを刺してアガロースゲルを流す。サランラップをかけて冷蔵庫で 5～10 分冷やして固める。

- ⑥サーマルサイクラーが終わったらチップを取り出す。
画面の一番右に白いセルが来ていたら終わったというコト。
ストップ→OK→Run の画面にしてから電源を切る

☆もし2日間で作業をするなら、ここで1日目終了。

2年が⑤⑥校時にスカラーでPCRをするのであれば、③④の間の休み時間に準備室に来てマスターミックスやプライマーなど冷凍庫で保管している薬品を解凍しておく必要がある。

【電気泳動】

- ①⑩バッファー原液（黄色いラベル）6mLを50倍に希釈して300mLにして（メスシリンダー）、少し振って混ぜて、装置に入れる。
- ②バッファー液の中に浸った状態でゲルから型（枠）を外して、装置の穴の位置でゲルを固定する。
- ③DNAマーカー（藍色）。タッピングして（溶液が上に行ったら遠心分離器にかける）を端に5 μ L入れる。
- ④ナンバリングしたチップから1つずつ5 μ Lずつ入れる。
- ⑤100Vで泳動。蓋をしてスイッチオン
10～20分？ かけすぎるとゲルを飛び越えて移動してしまい失敗となる。
- ⑥電気泳動ができている様なら、トランスイルミネーターをセット。
- ⑦⑬トランスイルミネーターにサララップを敷き、その上にゲルを乗せて、蓋をしてスイッチオン。
DNAが移動しているのが分かる。

IV DNAの精製

いずれ更新します