

遺伝子を理解する分子生物学実験

DNA フィンガープリント(発展編)

大目標 研究活動に必要な測る・計るといことはどのようなことかを考える。

サイエンスの手法を知る。(小さい物質(分子レベルのもの)を可視化し測定する)

目的 プラスミドDNAを制限酵素で切断し、電気泳動によりその解析を行うことで、遺伝子の本体であるDNAの理解と写真と対数グラフを用いたDNA断片の大きさの計測の仕方(測り方)を学習する。

準備 プラスミドDNA(pUC19・phoN)を制限酵素(*Afa* I *Eco*R I)で切断したもの。

Loading buffer(青色) 100bpLadder(緑色) 1.7%アガロースゲル

1×TBE(電気泳動用バッファー) ボルテックスミキサー 遠心分離器 電気泳動槽

簡易トランスイルミネーター 撮影用カメラ マイクロピペッター チップ 手袋 ゴミ入れ

遺伝子 DNA(分子)

19A プラスミドDNA pUC19を制限酵素 *Afa* I で切断したもの(10 μLが小さなチューブに入っている)

19E プラスミドDNA pUC19を制限酵素 *Eco*R I で切断したもの(10 μLが小さなチューブに入っている)

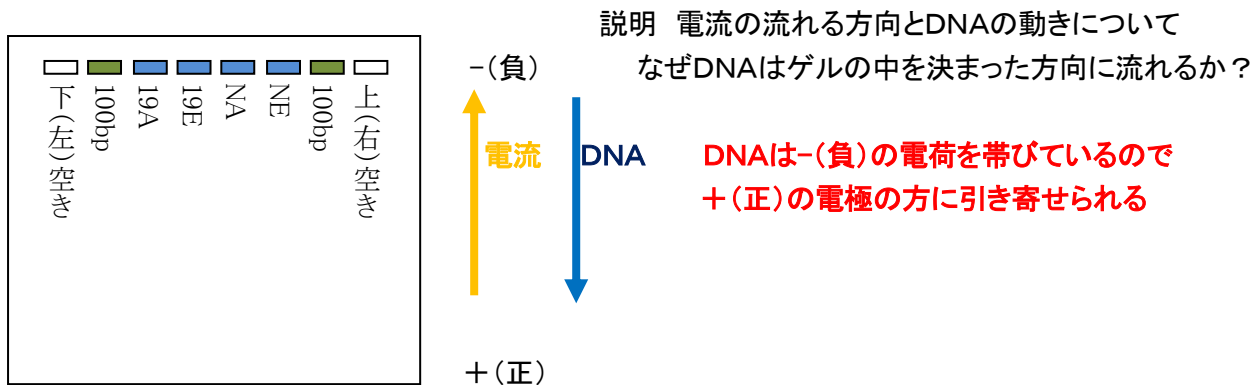
NA プラスミドDNA phoNを制限酵素 *Afa* I で切断したもの(10 μLが小さなチューブに入っている)

NE プラスミドDNA phoNを制限酵素 *Eco*R I で切断したもの(10 μLが小さなチューブに入っている)

実験

- 1 それぞれ10 μLのDNA溶液が入ったチューブに5 μLのLoading buffer(青色色素)を入れる。
- 2 軽くタッピングして攪拌する。
- 3 遠心器でDNAの入った青色溶液をチューブの底に落とす。
- 4 計15 μLをマイクロピペッターで吸い取る。

(プラスミドDNAを制限酵素で切ったもの10 μL+Loading buffer5 μL)



注) 青色は、DNAの色ではありません。DNA溶液は透明です。

青色色素はDNAがどこまで流れたか透明で見えないので、目印のためにDNAに混ぜている色素です。

- 5 1.7%アガロースゲルのウェル(ゲルの穴)にゆっくり流し込む。(ゲルを壊さぬように慎重に入れること)
- 6 100bpLadder(緑色)を5 μLずつ2カ所に入れる。
- 7 ふたを閉めて電源を入れる。泳動槽を揺らしたりしない。(電流の方向確認する)
- 8 約30分~40分間泳動

解説 プラスミドとは 原核生物内にある自立的に複製できる環状 DNA 遺伝子を運ぶベクターとして利用

制限酵素とは 特定の塩基配列の部分でDNAを切断する酵素

制限酵素*Afa* I *Eco*R I の認識する塩基配列(AGTC)は?

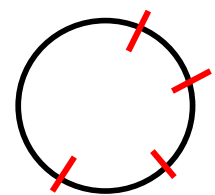
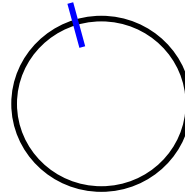
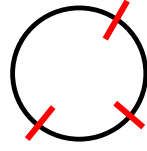
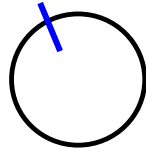


塩基配列(AGTCの並び方)が異なる遺伝子DNAでは、切れ方が異なる。→指紋(フィンガープリント)

Afa I と*Eco*R I でどちらがDNAを切断しやすいだろうか?

大きさの違う2種類のプラスミドDNA

同じもの(プラスミド)がたくさん入っている



制限酵素で切ると
同じ切れ方をしたものが
たくさんできる

1カ所で切れると

3カ所で切れると

1カ所で切れると

4カ所で切れると

同じものがたくさんあれば、小さいDNAでも目視できる。

電気泳動でDNAの大きさ(ヌクレオチドの数)がなぜわかるのか?

同じ条件(同じ寒天ゲル)であらかじめ大きさがわかっているDNA断片と一緒に泳動し比較する。

測定とは

実験

- 電気泳動を終了しゲルを、サララップを敷いたトランスイルミネーター(LEDライトか紫外線)上に運ぶ。
危険はないが必ず手袋使用 紫外線を使う場合紫外線防御用安全メガネ着用
- 写真撮影(白黒モードでデジカメで撮影) 印刷(プリンター)
携帯・スマートフォンでも撮影可能

写真の解析

- それぞれのプラスミドDNAは何カ所で切断されたか?
 プラスミドDNA名(pUC19) 制限酵素名 (*Afa*I) 3カ所で切断された
 (*Eco*R I) 1カ所で切断された
 プラスミドDNA名(phoN) 制限酵素名 (*Afa*I) 4カ所で切断された
 (*Eco*R I) 1カ所で切断された
- DNA断片の長さ(何bp)をLadderと比較して推察する。
- プラスミドDNA(輪っか)は何bpか? 予想してみよう。

電気泳動すると

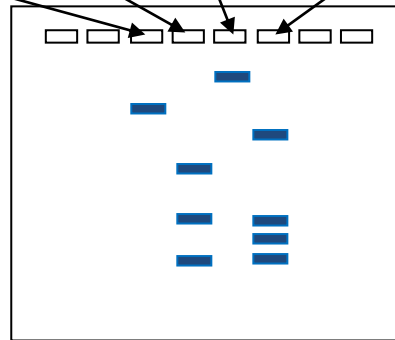
長いDNA

短いDNA

移動速度

移動が遅い

移動が早い



電気泳動写真を貼り付ける。

必要事項を記入しよう

実験した日

どのウェル(ゲルの穴)に何をいれたか。

DNA名 使った酵素名 入れた量(μl)など

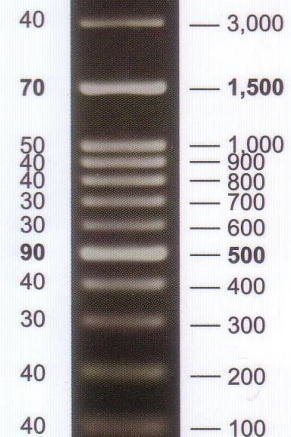
100bpLadder とその量など

アガロースゲルの濃度と電気泳動用バッファーの種類

予想されるバンドの長さ などを書こう

DNA Mass
(ng/5μl)

Base Pairs



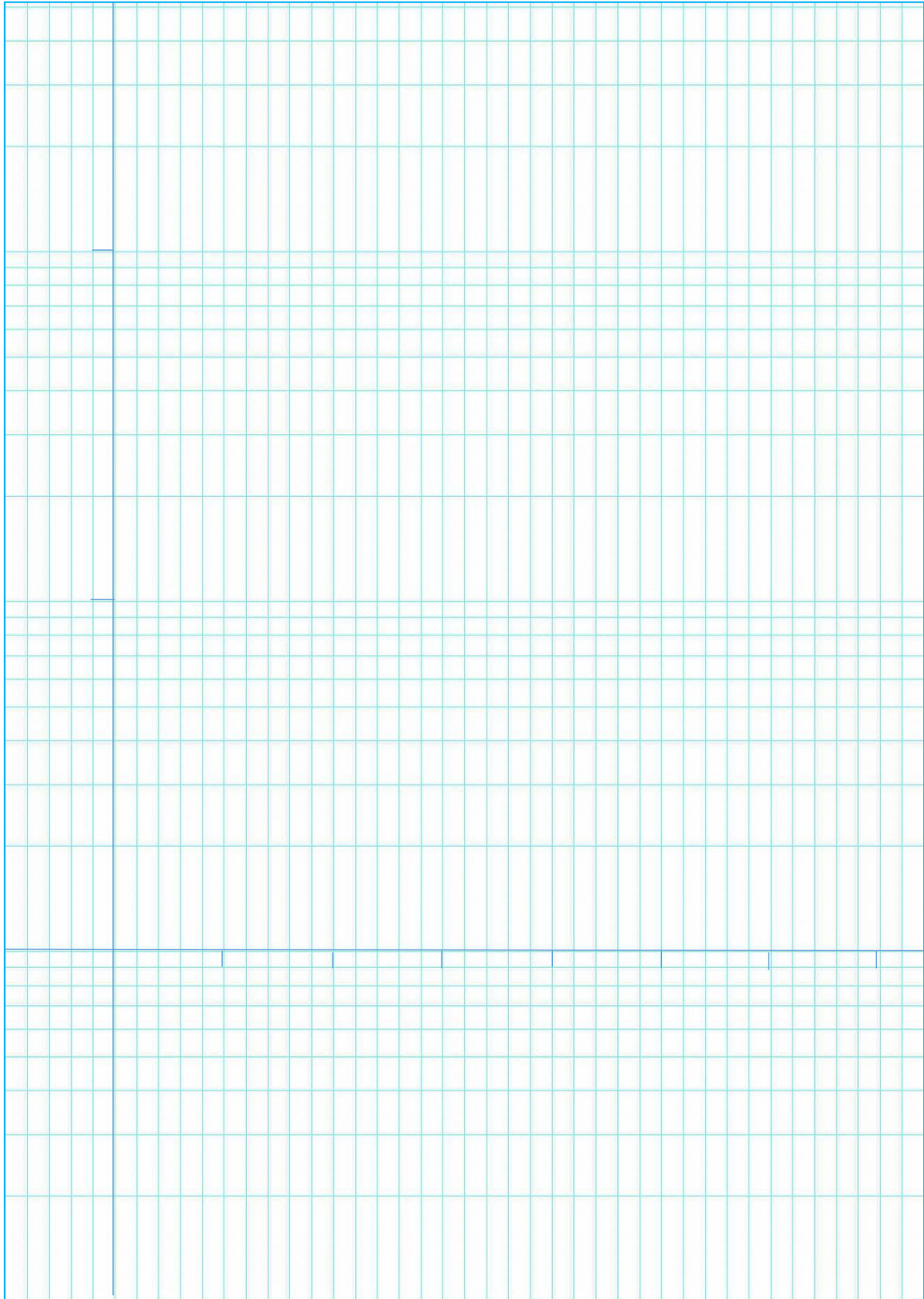
1.5% TAE agarose gel

復習1: 目に見えないくらい小さい遺伝子DNA→同じものをたくさん集めて見れば見ることができる。

復習2: DNAの大きさを測るには→あらかじめ大きさがわかっているDNAを同じ条件で泳動し比べて測る。

練習用 100bpLadder の資料をプロットせよ

ラダーの各バンドの大きさを縦軸に 3000bp を基準(0mm)と, 3000bpからの各バンドまでの距離を横軸にとる



個人の写真解析用

最初に写真の 100bpLadder をグラフ化する。

作成したグラフ上に写真のプラスミド断片のデータをプロット、各断片が何 bp か求める。

