

平成 12 年度東海・北陸地区国立学校等教室系技術職員合同研修

永田陽子*

名古屋大学工学部・工学研究科技術部

はじめに

平成 12 年 7 月 26 日から 28 日まで岡崎国立共同研究機構内：基礎生物学研究所にて行われた平成 12 年度東海北陸地区国立学校等教室系技術職員合同研修(生物コース)に参加しました。研修は講義・実験実習・施設見学といった構成内容でした。講義は「服務」、「研究室を支える技官」といった行政的な講義の他に、「雄と雌 - 性の分化 - 」、「内分泌攪乱物質の生物影響」、「神経活動と遺伝子発現」、「花の咲かない植物で花の進化を探る」、「細胞のサイクル機構 - オトファジ - の分子機構 - 」、「ゲノム解析と生物情報科学」等の専門分野まで様々な講義があり、施設見学では分子化学研究所の電子蓄積リング、生理学研究所の脳計測センター、クライオ電顕、計算機センターを見学し、各講師の先生方から現在の研究の最先端のお話を伺うことができ大変興味深いものでした。また実験実習として「DNA の基礎実験」をおこないました。

「DNA の基礎実験」は、キャピラリー電気泳動で DNA の配列を決定し、そしてプラスミド DNA をアガロース電気泳動で分析し、それらの結果からその DNA が何の DNA か解析する実験を行った。

1. 実験目的

DNA の配列を決定することによって、もし欲しい DNA があれば Primer を設計し、同じ動物の DNA を用いてその設計した Primer を用い、サイクルシーケンス法によって欲しい DNA を手に入れることができる。もしくは調べたい DNA があつたときに DNA 配列を調べ一致する DNA 配列を持つものを検索し特定することができる。今回は後者の目的でこの方法を用いた。

2. 実験

DNA の配列決定

I. シーケンス反応を行う

1. 反応液を調整する

DNA(0.1 μg/μl)	2.0 μl
Primer (4 μM)	0.5 μl
H ₂ O	3.5 μl
Premix	4.0 μl

この Premix には DNA ポリメラーゼ、dNTPs、蛍光標識された ddNTPs が含まれる
この反応液をこの順に氷上で穏やかに混合する。
軽く遠心し、反応液をチューブの底に集める。

* 分析・物質技術系

2. PCR マシン Gene Amp 9600 (PERKIN ELMER) という恒温槽で反応を行う。(サイクルシーケンス法)

95 - 10分

< 95 - 10

25 サイクル

72 - 10分

4 forever

II. キャピラリー電気泳動を行う

キャピラリー電気泳動にかけるためにエタノール沈殿を行った。DNA はアルコールには不溶なので塩として析出する。

1. I の 2 . で得られた反応液に対し以下のものを混合する

3M 酢酸ナトリウム(pH5.0) 1.1 μ l (反応液の 1 / 9 倍量)

エタノール 25 μ l (塩を加えた反応液の 2 倍量)

2. 氷上にて 10 分静置
3. 微量冷却遠心器で 20 分遠心し、DNA を沈殿させる
4. 上澄みを捨てて、3 M 酢酸ナトリウムを除くため 70%エタノールで 100 μ l を加える
5. 微量冷却遠心器で 5 分遠心し、DNA を沈殿させる
6. 上澄みを捨てる
7. DNA 沈殿を乾燥させる (真空ポンプで減圧乾燥 5 分)

シーケンサーにかけるためにサンプルを準備した

1. 12 μ l の TSR にエタノール沈殿を行って得られた DNA を溶解した
2. PCR マシンで 95 2 分加熱しその後すぐに氷冷する。この操作により DNA は 1 本鎖のままている。
3. キャピラリー電気泳動用チューブに DNA 溶液を移す
4. キャピラリー電気泳動装置 (Genetic Analyser 310(PERKIN ELMER)) にて電気泳動を行う。

III. 配列データ解析とデータベース・サーチを行った

1. アプリケーション Factura、AutoAssembler を用いてベクター部分とインサート部分の区別、データの信頼性の評価、両鎖配列の比較と確認、コンセンサス配列の作成を行う。
2. インターネットを通じて検索プログラム BLAST を使用し、データベース・サーチを行った。

IV. プラスミドを組み込んだ DNA をアガロース電気泳動で確認した

プラスミドを制限酵素を用いて切断した

1. DNA を切断するため以下の反応液を調整した。制限酵素には EcoRI と HindIII を用いた。

DNA(0.1 μ g / μ l) 3 μ l(300ng)

EcoRI(20U / μ l) 0.4 μ l (8 U)

HindIII(20U / μ l) 0.4 μ l(8U)

Buffer M 3 μ l (全反応溶液量の 1 / 10 量)

H2O 23.2 μ l

2. 37 で 1 時間反応させた

アガロースゲル電気泳動を行う

1. 以下のサンプルをならべて 1.5%アガロースゲルで電気泳動させた

切断前のプラスミド 0.5 μ l(50 ng)

切断後の DNA 溶液 15 μ l(150 ng)

DNA のサイズマーカー 1kb Ladder

2. デジカメを用いて写真を撮り、プラスミド DNA の長さを調べる。

3. 結果

結果では F も R もちゃんと Primer 切断され、ピークがはっきりと見えた。キャピラリー電気泳動によって DNA の配列を見ることが出来たが、F と R の DNA の配列が合わなかった。われわれの試料は 4 番で F が 2 番のものと同じ結果が出た。

また、アガロース電気泳動によってプラスミドに組み込んだ DNA を見た。その結果 344 と 4072 付近に出、よい一致となったが、ピペッタの扱いに馴れていなかったため量が不安定となり 344 付近の方は蛍光の発色が薄かった。従ってあまり電気泳動しない結果となった。

結論：R の DNA 配列と一致したのは GAT67 (モンキーの DNA) であった。

F と R が AutoAssembler を用いても一致しなかったのは、2 番の試料との入れ間違いと考える。

謝辞

実験実習では不馴れなせいもあり、予定終了時刻をかなりオーバーし、担当の方々にはご迷惑をおかけしたが、日頃行ったことのない DNA 実験は面白く大変有意義であった。

参考

アガロースゲルの作り方

1. ピンに今回使用した Buffer である TAE Buffer を入れる
2. 1. に粉末アガロースを加える
3. 様子を見ながら電子レンジで加熱して溶かすまたはオートクレーブを使う。電子レンジのほうが簡便であるがオートクレーブを用いたほうが弾力性の高いアガロースゲルになる
4. 60 くらいに冷ます
5. 10mg / ml の EtBr を 2 万分の 1 量加える
6. 型に流し込む
7. 冷えて固まったら電気泳動に使用する

EtBr：エチジウムブロマイド、DNA と結合する。UV を照射するとオレンジ色の蛍光を発する。