

<実験例 Gene RED PCR Mix Plus による ALDH2 遺伝子型決定 簡易プロトコール>

教育実習用キット ISOHAIR Jr. マニュアルやニッポンジーンホームページでは、PCR 用試薬として Gene Taq NT を使用した実験例を紹介しています。ここではプレミックスタイプの Gene RED PCR Mix Plus を使用して Aさんと Bさんの二人組で実験した場合の一例を紹介いたします。

主に用意するもの

- 抽出したヒト毛根 DNA(一人あたり 2 サンプル使用^{※補足})
- 20pmol/μl に濃度調整したプライマー溶液
 - ・ ALDH2-F プライマー (ALDH2 Forward : 5'-CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3')
 - ・ ALDH2-N プライマー (ALDH2 Reverse-野生型: 5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTC-3')
 - ・ ALDH2-M プライマー (ALDH2 Reverse-変異型: 5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTT-3')
- Gene RED PCR Mix Plus (プレミックスタイプ PCR 用試薬, Code No. 315-07761)
- Distilled Water, Deionized, Sterile (Code No. 316-90101)

プロトコール

<PCR 反応液組成>

正常型(N型)ALDH2 検出用

	1 サンプル分	二人分 5 サンプル Mixture
鋳型 DNA(サンプル 1 or サンプル 2)	2 μl	
Gene RED PCR Mix Plus	25 μl	125 μl
ALDH2-F プライマー(20pmol/μl)	1 μl	5 μl
ALDH2-N プライマー(20pmol/μl)	1 μl	5 μl
Distilled Water, Deionized, Sterile	21 μl	105 μl
Total	50μl	

変異型(M型)ALDH2 検出用

	1 サンプル分	二人分 5 サンプル Mixture
鋳型 DNA(サンプル 1 or サンプル 2)	2 μl	
Gene RED PCR Mix	25 μl	125 μl
ALDH2-F プライマー(20pmol/μl)	1 μl	5 μl
ALDH2-M プライマー(20pmol/μl)	1 μl	5 μl
Distilled Water, Deionized, Sterile	21 μl	105 μl
Total	50μl	

〈PCR マスターMix の調製〉

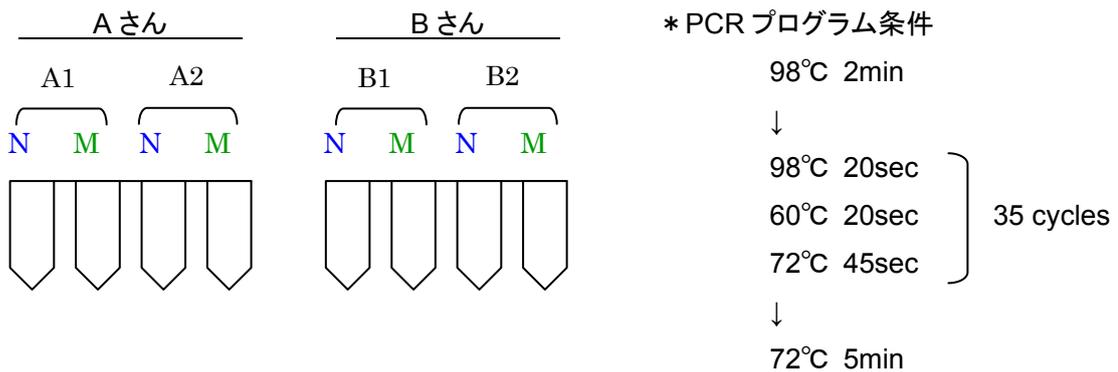
上記反応液組成の 5 サンプル分の Mixture を作製する。

1.5mlチューブに以下の順に溶液を加え、ピペッティングで混合する。

1. **Distilled Water, Deionized, Sterile**
2. ALDH2-F プライマー
3. ALDH2-N または M プライマー
4. **Gene RED PCR Mix Plus**

〈PCR チューブへ反応溶液を分注～PCR 反応〉

1. PCR マスターMix を、一人あたり 4 本の PCR チューブへ下図の様に 48 μ l ずつ分注。
2. 毛根より抽出した鋳型 DNA 2 μ l (サンプル 1 またはサンプル 2) をそれぞれのチューブに添加。
3. サーマルサイクラーにセットし PCR を行う (* PCR プログラムは以下の通り)。



〈アガロースゲル電気泳動〉

■ アガロースゲルの作製

2% Agarose 21 大(12 レーン)2 枚

1. 1×TAE 100 ml に Agarose21 2g を加え混合し、電子レンジで溶かす。
2. 様子を見ながら沸騰し始めたら電子レンジから出し攪拌する。
3. 再び電子レンジへ入れ、沸騰したゲルがあふれ出さないか確認しながら完全に溶解する。
4. レンジから出し EtBr Solution (0.33 mg/ml) 2 滴添加し、混和。
5. 手で持てるぐらいに冷めたら、ゲルトレーにゲル溶液を注ぎ込む。
6. ゲルが固まったら、コームを抜き、泳動槽にセットする。

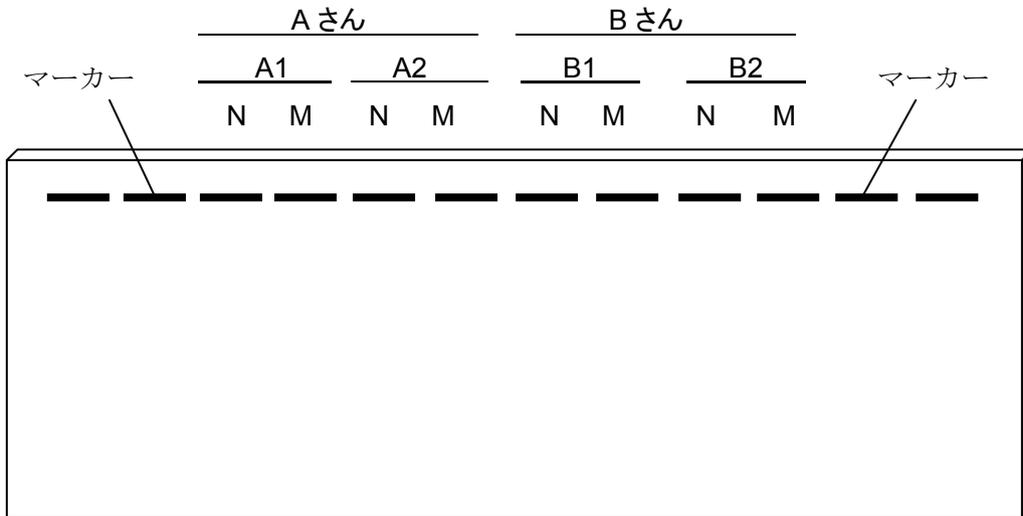
* レンジから出してすぐに攪拌すると突沸してゲルがあふれ出すことがある。やけどに十分注意する。

■ アガロースゲル電気泳動 (2% Agarose 21)

ミューピッド電気泳動槽に 1×TAE Buffer を入れる。(～300 ml)

マーカーとして Gene Ladder 100 5 µl を泳動サンプルの両脇に泳動する。

PCR 産物 10 µl をそのまま電気泳動に使用する。



100V 20-30 分 (黄色の色素が先端まで、赤い色素がゲルの真ん中あたりに来るまで)
泳動後、ゲル撮影装置で電気泳動像確認。

〈結果の解析〉

1. **N 型**のみ増幅…………… NN 型(お酒が飲めるタイプ 飲み過ぎ注意)
2. **N 型 M 型**両方増幅…………… NM 型(お酒は飲めるが、すぐ顔が赤くなるタイプ)
3. **M 型**のみ増幅…………… MM 型(お酒が全く飲めないタイプ)

※補足

毛髪から得られる DNA 量は、個人の髪質によって差があり、たとえ同一人物でも毛髪 1 本 1 本によって差があります。そのため、上記では PCR 鋳型 DNA の調整検討用に一人あたり 2 サンプルで実験する例を載せています(例えばサンプル 1 とサンプル 2 で、抽出した DNA 溶液とそれを 10 倍に希釈した溶液で比較したり、DNA 抽出方法をそれぞれ変えてみたり、など試すことができます)