

## Dr. ジーン 2

### アガロースゲル電気泳動キット

### 補足説明書

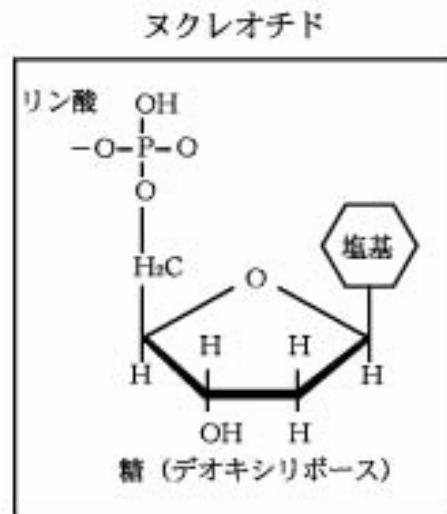
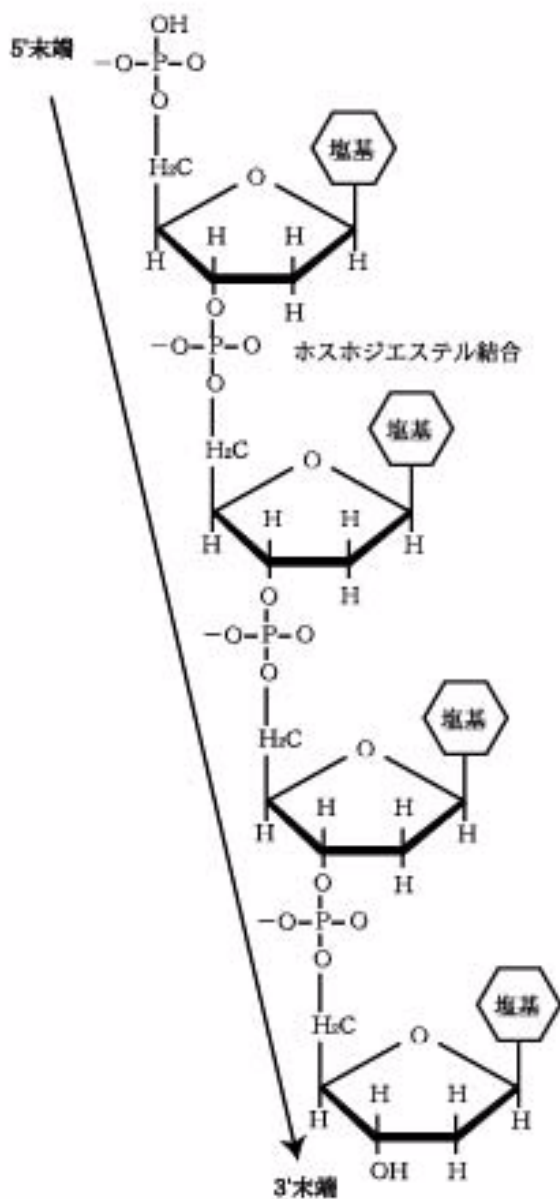
Code No. 318-05431      1 Set (12 反应用、キット構成 : 6 班分)

- DNA の構造
- 制限酵素について
- アガロースゲル電気泳動について
- サブマリン電気泳動装置
- Dr. ジーン 2 電気泳動実験の試薬必要量 (6 班分)
- 用語説明
- 関連製品リスト

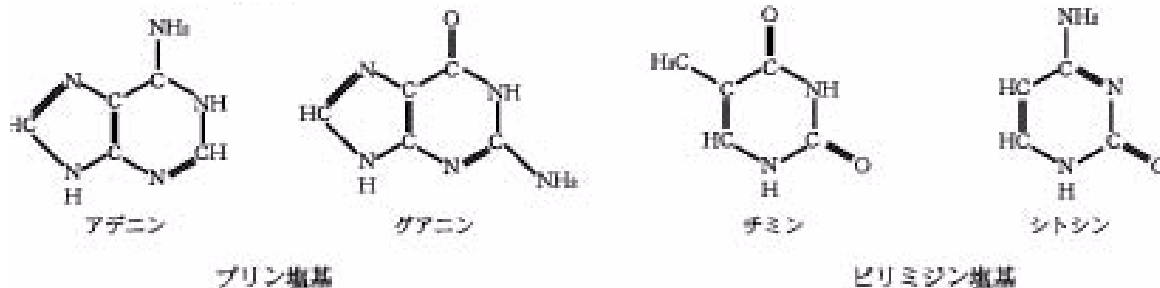
株式会社ニッポンジーン

## DNA の構造

DNA (デオキシリボ核酸) は糖 (デオキシリボース)、リン酸、塩基からなるヌクレオチドがつながってできた長い鎖状の分子です。これはデオキシリボースの 3' の炭素について水酸基 (OH) と 5' の炭素についてリン酸のホスホジエステル結合により、鎖状に長く繋がっています。リン酸の方を 5' 側、水酸基の方を 3' 側と呼んでおり、DNA が複製される際には必ず 5' 側から 3' 側の方向で行われます。



DNA を構成する塩基には A (アデニン)、G (グアニン)、T (チミン)、C (シトシン) の 4 種類あり、A と G がプリン塩基、T と C がピリミジン塩基という構造をしており、プリンとピリミジン塩基間の A と T、G と C が水素結合によって相補的塩基対をつくります。



A と T は二つの水素結合、C と G は三つの水素結合で塩基対を形成しており、これらの塩基によって相補的に結合した二本鎖の DNA は二重らせんと呼ばれる特徴的な構造をとっています。

## 制限酵素について

多くの生物は外部から細胞内に進入してくる DNA に対して自身を守るための防衛機構を持っています。細菌で見つかったこの機構のひとつは制限修飾系とよばれ、進入してきた異種 DNA を認識し分解する酵素（制限酵素）と、自分自身の DNA が切断されるのを防ぐため自身の DNA にメチル基を付けて制限酵素に認識されないようにするメチル化酵素（修飾酵素）から成り立っています。制限酵素は DNA メチル化の有無により自己、非自己の DNA を区別しています。自身の DNA はメチル化酵素によって保護されますが、メチル化されていない外部からの DNA は制限酵素により非自己と認識され、切断されます。

制限酵素はその切断の仕組み、あるいは DNA を切断するのに必要な因子の違いなどから I 型、II 型、III 型の 3 種類に分類されており、その中でも一般的な遺伝子組み換え実験に用いられている制限酵素は II 型と呼ばれている酵素です。II 型の制限酵素は、ある特定の配列を正確に認識し、決まった位置で DNA 鎖を切断します。

制限酵素の名前は一般的に頭の文字から順番に微生物の属名の 1 頭文字、種名の 2 頭文字、株名の 1 文字で表し、最後にローマ数字を付けます。\*1 同一菌株に複数の酵素が存在する場合は見つかった順にローマ数字 I、II、III というように付けることになっています。よく使われる代表的な酵素として EcoRI、HincII というものがあります。これらはそれぞれ *Escherichia coli* R13 株より単離された最初の酵素、*Haemophilus influenzae* c1161 株より二番目に単離された酵素です。酵素の名前の読み方は、そのままアルファベットを読んでもかまいませんが、一般的には酵素の名前をそのまま英語やローマ字読み当てはめて、例えば EcoRI は「エコアールワン」、HincII は「ヒンクツー」というように読むことが多いようです。

\*1 制限酵素の命名法では当初、属名、種名から取ってきた 3 頭文字をイタリック（斜体）で表記することが推奨されていましたが、次の文献で「制限酵素の表記にイタリックを使用しない」という方針が明確化され、現在ではその論文で提案された表記法が主流になりつつあります。

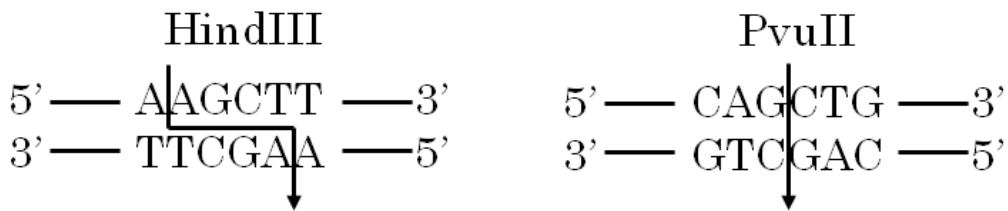
Roberts, R. J. *et al.* A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1805-1812 (2003).

制限酵素の多くは 3~8 個の特異的な塩基配列を認識し、またその多くがパリンδροームと呼ばれる配列になっています。パリンδροームとは、次の図のように二本鎖 DNA の制限酵素認識部位をそれぞれ 5' 側から見たときに全く同じ配列になっていて、その認識配列の中心から見てちょうど点対称になるような構造をしているもののことをいいます。例えば EcoRI は 5' 側から GAATTC という 6 つの塩基配列を認識し、次の図の矢印の場所で DNA を切断します。



切断後は図の右のように 5' 側の TTAA の配列が一本鎖で飛び出した構造になります。制限酵素の種類によってこのように 5' 末端が突き出した形になるものや、3' 末端が突き出した形になるもの、あるいは二本鎖が同じ箇所切断されて末端が平らな形になるものがあります。また、制限酵素の中にはまったくパリンδροームでない数塩基を認識し、その認識配列から数塩基離れた箇所を切断するものもあり、遺伝子工学の実験では、こういった酵素の特徴をうまく利用してさまざまな組換え体が作られています。

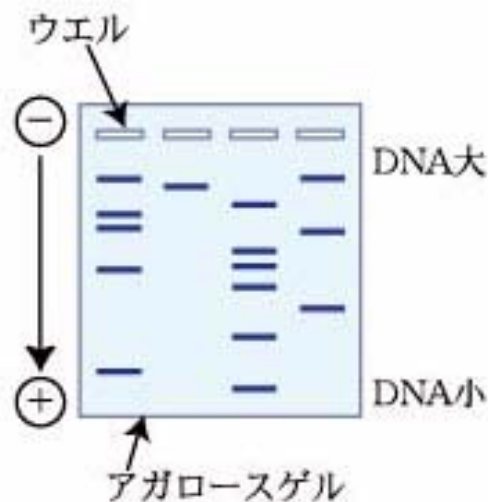
本キットには HindIII (ヒンディースリー)、PvuII (ピーブイエーツー、あるいはプブツー) という二つの制限酵素が入っています。これらはそれぞれ *Haemophilus influenzae* Rd 株、*Proteus vulgaris* 株という菌株由来の酵素で、HindIII は 5' 側から AAGCTT、PvuII は CAGCTG という配列を認識して DNA を切断します。



上の図のように HindIII は 5' 側に 4 塩基飛び出した形、PvuII は末端が平らになった形で DNA を切断します。

## アガロースゲル電気泳動について

DNA は自身の持つリン酸の影響で負に荷電しているため、アガロースゲルに DNA サンプルをのせて電圧をかけると一極から+極に移動します。DNA がアガロースゲルの中を移動する際に、アガロースゲルの網目構造がふるいの役目を果たし、分子量の小さいものほど速く、大きいものほど遅く移動します。この移動度の差によって異なる大きさの DNA 断片をアガロースゲル中で分離することができます。電気泳動後は Stains-All などの色素や EtBr (臭化エチジウム) などの蛍光色素でゲルを染色して DNA を検出します。



本実験では 1% の濃度のアガロースゲルを使用します。この濃度のアガロースゲルは約 500 bp (base pairs : 塩基対) から 5,000 bp の間にある DNA を分離するのに適しています。

短い DNA (数百 bp 程度) を分離したいときには、アガロース濃度を濃くします。アガロース濃度が濃くなるとアガロース中の網目構造の密度が高くなり、大きな DNA はあまり移動できなくなり、小さな DNA がよりきれいに分離できるようになります。逆に大きな DNA を分離するときにはもっと薄い濃度のアガロースを使用します。どの濃度のアガロースを使用するかは実験の目的によって変える必要があります。また、目的別に専用のアガロースが市販されています。

本キットで使用するラムダ DNA は大腸菌に感染するラムダファージ由来の DNA です。ラムダファージとは大腸菌に感染して増殖するバクテリオファージの一種で、約 48 kbp (kilobase pairs: 正確には 48,502 bp) の二本鎖 DNA を持ちます。

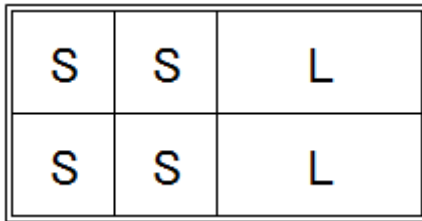
制限酵素処理したラムダ DNA は、アガロースゲル電気泳動を行うことにより、切断によって生じたいろいろな大きさの DNA 断片として分離することができます。本キットにはあらかじめラムダ DNA を HindIII で切断してある DNA がマーカー DNA として入っていますので、キットを使ってラムダ DNA を HindIII で切断したときのコントロールとなります。HindIII で切断した際の断片の大きさはすでに分かっているので、それをもとに検量線を描き、同時に電気泳動した未知のサンプルの大きさをその検量線から推測することもできます。

## サブマリン電気泳動装置

### Mupid-2plus (株式会社ミューピッド)

サブマリン電気泳動装置 (付属品: ゲルメーカースタンド-L、ゲルトレイ、コーム)

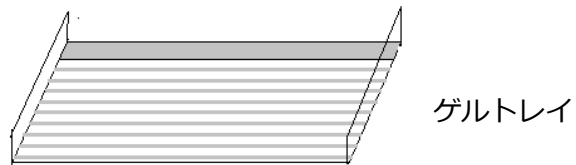
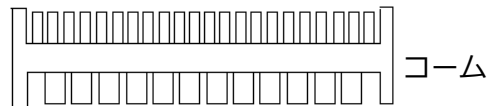
ゲルメーカースタンド-L (ゲル作製台)



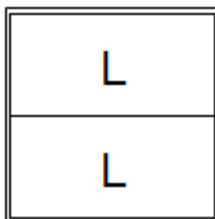
- \* 付属のゲルメーカースタンド-Lに、Lサイズ用トレイを2個と、Sサイズ用トレイを4個セットできます。
- \* 200mL の 1×TAE にアガロースを溶かしたゲル溶解液を、Lサイズ用に 30~50mL ずつ、Sサイズ用に 15~25mL ずつ流し入れると、Lサイズのアガロースゲル2枚とSサイズのアガロースゲル4枚が作製できます。

### MARINE23ST (富士フイルム和光純薬株式会社 Code No. 298-35271)

サブマリン電気泳動装置 (付属品: ゲル作製台、ゲルトレイ、コーム)



ゲル作製台



- \* 付属のゲル作製台に、Lサイズ用ゲルトレイを2個セットできます。
- \* 100mL の 1×TAE にアガロースを溶かしたゲル溶解液を 30~50mL ずつ流し入れるとLサイズのアガロースゲルを2枚作製できます。



## Dr. ジーン 2 電気泳動実験の試薬必要量 (6 班分)

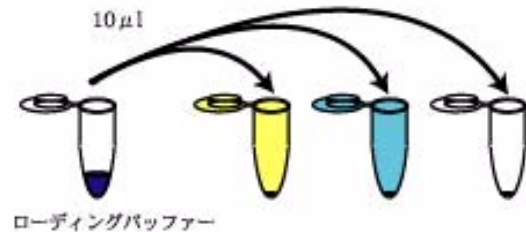
Dr. ジーン 2 の実験では、ラムダ DNA を二種類の制限酵素 (HindIII と PvuII) でそれぞれ切断し、生じた DNA 断片を電気泳動で分離します。

### 1 テストあたりアガロースゲルの 4 レーンを使用

(1 班あたり 2 テスト実施する場合、1 班で L サイズのゲルを 1 枚使用します)

#### Dr. ジーン 2 の制限酵素反応後の 3 本のチューブ (3 本×1 テスト)

- H : 制限酵素 HindIII 反応液
- P : 制限酵素 PvuII 反応液
- C : コントロール反応液 (Negative Control)



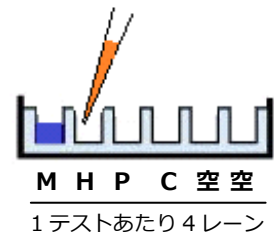
反応液 50 µl にローディングバッファー 10 µl を混合

分子量マーカー 10 µl をアガロースゲルのウェルにアプライ

- M : 分子量マーカー (ラムダ DNA/HindIII digest)

酵素反応液を 10 µl ずつアガロースゲルのウェルにアプライ

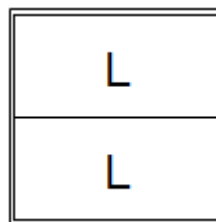
- 空 : 5 番目 (もしくは 1 番目) と 6 番目のウェルは  
予備のため空けておく



<Dr. ジーン 2 で 6 班分を同時に電気泳動する場合に使用する試薬の最低必要量>

例) 6 班あたり L サイズの 1% アガロースゲル (12 ウェル) を 6 枚電気泳動

- ・小型電気泳動装置 6 台
- ・ゲル作製台 3 個
- ・L サイズ用ゲルトレイ 6 個
- ・12 ウェル用コーム 6 本



\* 付属のゲル作製台に、L サイズ用トレイを 2 個セットできます。

◆ 50×TAE 100mL を 50 倍に希釈して、1×TAE を 5L 調製

以下の通り用意した場合、6 班あたり必ず使用する 1×TAE の量は 3L です。

◆ L サイズの 1%アガロースゲルを 6 枚用意

アガロース (Agarose S)	3g
1×TAE	300mL
<hr/>	
1%溶解液	30~50mL×6 枚

◆ サブマリン電気泳動装置を 6 台用意

1×TAE	1,700mL
<hr/>	
泳動槽に注ぐ	230~280mL×6 台

◆ アプライして電気泳動 (1 班あたり 1 枚の L サイズゲル使用 : 2 テスト分の 8 レーン)

マーカーDNA	120 μl (10 μl×2 テスト×6 班)
ローディングバッファー	360 μl (30 μl×2 テスト×6 班)
1%アガロースゲル	6 枚 (1 枚×6 班)

泳動槽に蓋をし、100V で 30~40 分間ほど泳動



◆ Stains-All 溶解液を 1200mL まとめて用意し、200mL ずつ小分け

ホルムアミド	120mL (付属品全量、遮光保存)
イソプロパノール	300mL (付属品全量)
1×TAE	780mL
<hr/>	
Stains-All 溶解液	200mL×6 本 (遮光保存)

◆ 染色専用容器 (タッパー) を 6 個用意

Stains-All (粉末)	10mg×6 本 (遮光保存)
Stains-All 溶解液	200mL×6 本 (遮光保存)
<hr/>	
Stains-All 染色液	200mL×6 本 (遮光保存)

## 用語説明

アガロース	アガロースは多糖類の一種で、寒天の主要成分です。
50×TAE	使用条件の 50 倍濃度になっているトリス酢酸緩衝液です。化学や生物の実験ではいろいろな緩衝液が利用されています。
マーカーDNA	サイズが分かっている DNA 断片を電気泳動することで、その DNA 断片を目じるしに同時に電気泳動した DNA サンプルの大きさを推測することができます。このような DNA 断片のことをマーカー (Marker : 標識、目印) と呼びます。
ローディングバッファ	アガロースゲルの穴の中に入れた DNA サンプルが浮き上がらないように、ローディングバッファには、比重を増やすための物質 (フィコールやグリセリン) が入っています。また、電気泳動の進行を観察できる色素 (Orange G やブロモフェノールブルー、キシレンなど) も含まれています。
核酸染色用試薬	キット構成品の Stains-All は、アガロースゲル中の DNA を青色に染めるため、目視で DNA を確認することができます。臭化エチジウム (EtBr) のような変異原性がないため安全です。
臭化エチジウム (EtBr)	エチジウムブロマイド、エチブロとも呼ばれ、紫外線を当てると蛍光を發します。EtBr は、DNA に結合して強く蛍光を發するため、核酸を検出するための核酸染色用試薬として良く利用されています。ただし、DNA に結合する性質から、変異原性があると考えられており、取り扱いには注意が必要です。
サブマリン電気泳動	電気泳動バッファ (緩衝液) を入れた泳動槽の中に、アガロースゲルを水平に沈めた状態で行う電気泳動を、潜水艦 (submarine) に例えてサブマリン電気泳動と呼ばれます。
コーム	櫛型 (comb) をしており、アガロースゲルに試料を入れるための穴 (ウェル : well) を形成します。
レーン	ウェルごとの泳路 (lane) で、レーンの幅はコームの櫛歯の横幅で変えられます。
アプライ	試料を目的の場所に注入する操作をアプライ (apply) と呼んでいます。
ピペッティング	マイクロピペットで溶液を吸ったり出したりして溶液を混和する操作のことです。

## Dr.ジーン 2 関連製品リスト

Dr.ジーン 2 キット構成品の関連製品はこちらです。※1

品名	Code No.	容量
<a href="#">Agarose S</a> (アガロース)	316-01191	5 g
<a href="#">50×TAE</a> (電気泳動バッファー)	313-90035	500 mL
<a href="#">Lambda DNA</a> (ラムダ DNA)	318-00414	360 µg
<a href="#">HindIII</a> (制限酵素、反応バッファー付き)	311-01163	12,000 units
<a href="#">PvuII</a> (制限酵素、反応バッファー付き)	311-00281	2,000 units
<a href="#">OneSTEP Marker 1</a> (λ/HindIII digest、分子量マーカー)	310-05251	1,500 µl
<a href="#">CLEAR STAIN Blue</a> (核酸染色用試薬)	312-08491	120 mL
<a href="#">6×Loading Buffer Triple Dye</a> (ローディングバッファー) ※2	314-90261	1 ml×3

※1 Dr.ジーン 2 キット構成品とは仕様が異なります。

※2 Loading Buffer (313-90111) は SDS を含むため CLEAR STAIN Blue と一緒に使用できません。

### 教育用バイオ実験

教育用バイオ実験キット「Dr. ジーン」	Code No.	容量
Dr.ジーン 1 ver. 2 (大腸菌形質転換キット・LacZ 発現系)	310-06351	12 反应用(6 班用)
Dr.ジーン 2 (アガロースゲル電気泳動キット)	318-05431	12 反应用(6 班用)
Dr.ジーン 6 (大腸菌形質転換キット・GFP 発現系)	314-08451	1 Kit (6 班用)
Dr.ジーン 7 (植物多型解析 PCR キット)	311-08461	1 Kit (6 班用)
Dr.ジーン 8 (DNA 鑑定キット)	318-08471	1 Kit (6 班用)
Dr.ジーン 9 (アガロースゲル電気泳動セット)	315-08481	1 Set (6 班用)
ISOHAIR Jr.	Code No.	容量
ISOHAIR Jr.	314-04431	30 回用
(毛髪からの DNA 抽出試薬、PCR 用試薬、電気泳動試薬のセット)	310-04433	60 回用