

Dr. ジーン7

植物多型解析 PCR キット

補足説明書

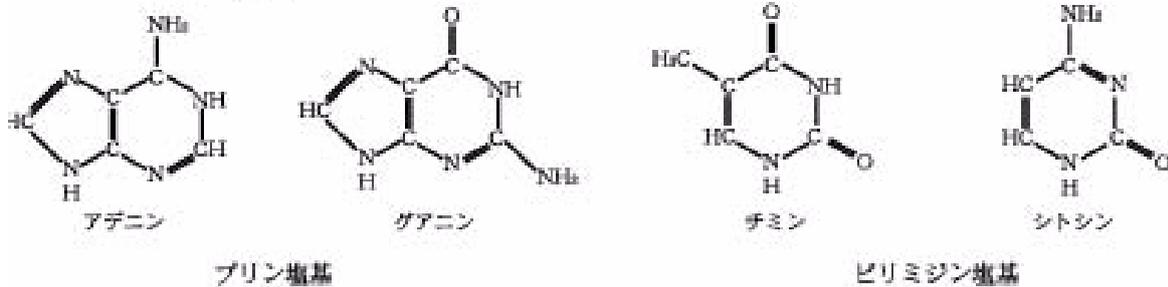
2024年5月改訂

Code No. 311-08461 1 Kit (キット構成 : 6 班分)

- DNA の構造
- PCR の原理
- アガロースゲル電気泳動について
- Dr. ジーン7 電気泳動実験の試薬必要量 (6 班分)
- 関連製品リスト

株式会社ニッポンジーン

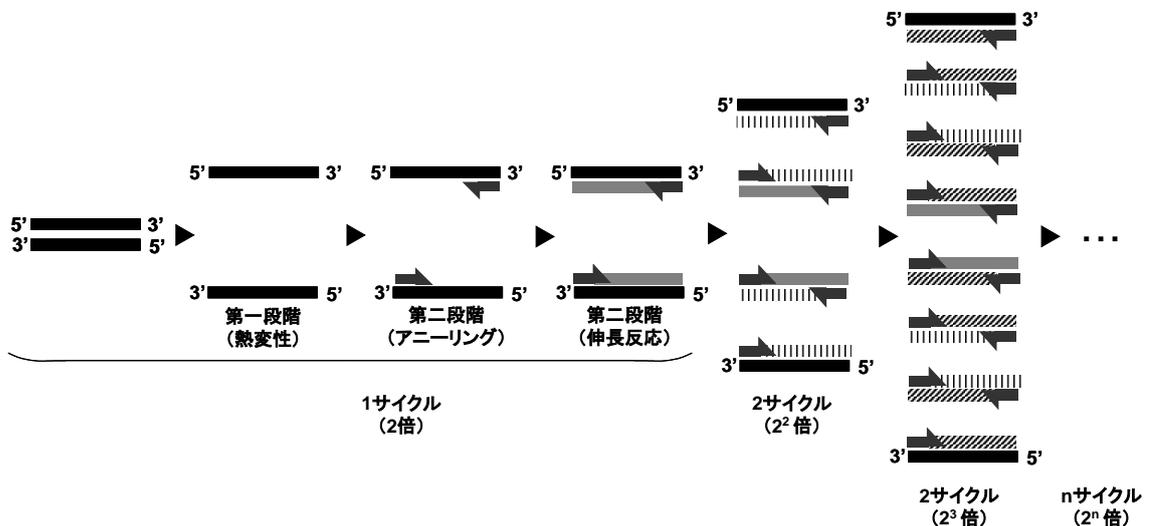
DNA を構成する塩基には A (アデニン)、G (グアニン)、T (チミン)、C (シトシン) の 4 種類あり、A と G がプリン塩基、T と C がピリミジン塩基という構造をしており、プリンとピリミジン塩基間の A と T、G と C が水素結合によって相補的塩基対をつくります。



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。

PCR の原理

PCRとは、Polymerase Chain Reaction の略で、文字通り DNA ポリメラーゼを用いて連鎖反動的に DNA を増幅する方法です。PCRの原理は、増幅しようとする DNA とその両端の配列に相補的な一対の DNA プライマー及び耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて、3段階の温度変化をnサイクル繰り返すことによって標的 DNA を 2^n 倍に増幅するものです。温度変化の第1段階(94~96℃)で標的二本鎖 DNA を熱変性して一本鎖 DNA にアニーリングさせ、第3段階(72~74℃)で伸長反応を進めます。1サイクルで標的 DNA は2倍になります。従って、理論的にはnサイクルの反応で標的 DNA は 2^n 倍に増幅されるので、20 サイクルでは約 100 万倍に増幅されることとなります。実際には数百万倍まで増幅することができます。



Dr.ジーン7 実験の PCR サイクル

- | | |
|-------------------------------|---|
| 94℃ 2分 | <u>最初の熱変性</u> は、鋳型 DNA の変性を十分に行うため、長めに行う |
| ↓ | |
| 1) 94℃ 10秒間 | <u>熱変性</u> : 二本鎖 DNA を熱によって一本鎖 DNA の状態にする |
| ↓ | |
| 2) 52℃ 10秒間 | <u>アニーリング(対合)</u> : 一本鎖 DNA にプライマーが結合する |
| ↓ | |
| 3) 72℃ 30秒間 | <u>伸長反応</u> : DNA ポリメラーゼにより DNA 鎖が伸長する |
| ↓ | |
| 1)、2)、3)の三段階の温度サイクルを 35 回繰り返す | |
| ↓ | |
| 72℃ 2分間 | <u>最後の伸長反応</u> は長めに行う(省略してもよい) |

用語説明

プライマー：増幅したい DNA 領域の両端に相補的な塩基配列をもつ 15～35 塩基の一本鎖 DNA (オリゴヌクレオチド) で、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の起点となります。**フォワードプライマー (Fw)** は、鋳型 DNA の 5'→3'と同じ方向 (Forward) に伸長する足掛かりとなります。**リバースプライマー (Rv)** からは、逆方向 (Reverse) に進みます。

伸長← GGGTTTAAACCC---5'

(鋳型) 5'---AAATTTGGGCCCAAATTTGGG・・・AAATTTGGGCCCAAATTTGGGCCCAA---3'

増幅したい DNA 領域

(鋳型') 3'---TTTAAACCCGGGTTTAAACCC・・・TTTAAACCCGGGTTTAAACCCGGGTTT---5'

5'---GGGCCCAAATTT →伸長

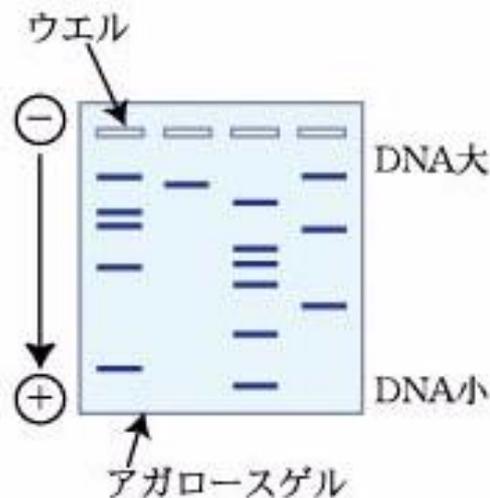
DNA のアニーリング：DNA 分子は塩基間の水素結合 (塩基対合：base pairing) で二重らせん構造を有しますが、水溶液中で加熱していくと、ある温度で一本鎖ずつに分かれます。この溶液の温度を下げていくと一本鎖 DNA は再結合して二本鎖になります。

DNA ポリメラーゼ：鋳型 DNA に対合したプライマーを起点として、5'から 3'の方向に dNTP を結合させて DNA を合成する酵素です。多くの酵素 (タンパク質) は熱に弱いため、PCR 法では 100℃に近い高熱でも酵素活性を維持し、至適温度が 72℃である耐熱性 DNA ポリメラーゼを使用します。

dNTP：dATP、dTTP、dGTP、dCTP の 4 つの DNA を構成する基質 (デオキシリボヌクレオチド) です。

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 CLEAR STAIN Blue などの色素や臭化エチジウム (EtBr) などの蛍光色素で染色して DNA を検出します。



「Dr. ジーン 7 植物多型解析 PCR キット」を用いた実験では 1.5% 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 200 bp (base pairs : 塩基対) から 4,000 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なければなりません、それぞれの用途のために専用のアガロースが市販されています。

Dr. ジーン7 電気泳動実験の試薬必要量 (6 班分)

Dr. ジーン7 では、植物サンプルの DNA の一部を PCR 法で増幅し、増幅した DNA 断片のサイズをアガロースゲル電気泳動で確認します。アガロースゲル電気泳動実験で必要となる試薬量について、以下をご参照ください。

1 班あたりアガロースゲルの 6 レーンを使用

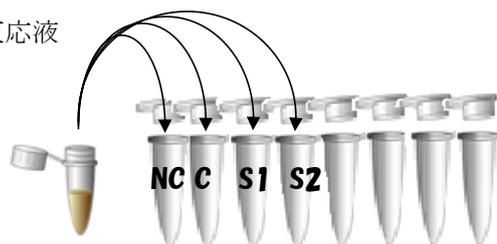
Dr. ジーン7 の PCR 反応後の 8 連チューブ

NC : ネガティブコントロールとして、DNA の代わりに水を入れた反応液

C : コントロール DNA (ホウレンソウ DNA) を入れた反応液

S1 : 植物サンプル抽出 DNA を入れた反応液

S2 : 植物サンプル抽出 DNA を入れた反応液



反応液 50 μ l にローディングバッファー 5 μ l を混合

ローディングバッファー 8 連チューブ

マーカー DNA 10 μ l をアガロースゲルのウェルにアプライ

M : マーカー DNA (Gene Ladder Wide 1)

PCR 反応液を 5 μ l ずつアガロースゲルのウェルにアプライ

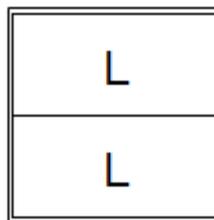
空 : 6 番目のウェルは予備のため空けておく



<Dr. ジーン7 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>

6 班あたり L サイズの 1.5% アガロースゲル (12 ウェル) を 3 枚電気泳動

- ・ 電気泳動装置 (Wako #298-35271) 3 台
- ・ ゲル作製台 2 個*
- ・ L サイズ用ゲルトレイ 3 個
- ・ コーム L (12 ウェル用) 3 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 1.2L (～2.2L) です。

◆ L サイズの 1.5%アガロースゲルを 4 枚 (3 枚+予備 1 枚) 用意

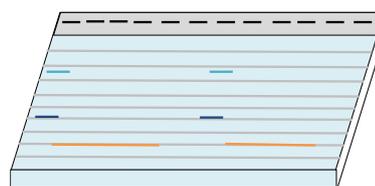
アガロース (Agarose S)	3g
1×TAE	200mL
1.5%溶解液	30～50mL×4 枚

◆ サブマリン電気泳動装置を 3 台用意

1×TAE	850mL
泳動槽に注ぐ	230～280mL×3 台

◆ アプライして電気泳動 (1 班あたり 6 レーン、2 班で 1 枚の L サイズゲルを使用)

マーカーDNA	30 μl (5 μl×6 班)
ローディングバッファー	120 μl (20 μl×6 班)
1.5%アガロースゲル	3 枚 (1/2 枚×6 班)
泳動槽に蓋をし、100V で 30～40 分間ほど泳動	



1 班あたり 6 レーン

◆ 染色専用容器 (タッパー) を 3 個用意

核酸染色用試薬 (10 倍濃度)	120mL (20mL×6 班)
水 (または 1×TAE)	1,080mL (180mL×6 班)
染色液	200mL×3 + 予備 (200mL×6 班)

Dr.ジーン 7 関連製品リスト

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 反応用(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 反応用(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