

10.DNA 実験の基礎

担当：神川（阪口）

目的

地球上の細胞は例外なく、その遺伝情報を DNA：デオキシリボ核酸（アデニン・チミン・グアニン・シトシン）の中に蓄積している。通常、ゲノム DNA は二本鎖分子で存在し、その配列は水素結合を介した相補的な関係になっている。DNA を解析することによって、様々な情報を得る事が可能である。ある生物における種内多様性の調査など保全生物学や、遺伝病の有無や病原微生物の同定など我々の社会・生活に密接した調査・研究に必要不可欠なツールとなっている。すなわち、近年の医学・生物学において、DNA 実験を避けて行うことは基本的に不可能である。本実習を通じて、ピペットの操作などの基本的な事項から、DNA 抽出、DNA 増幅、DNA 増幅結果の観察、データの評価における手法と原理について学ぶ。

内容

アセトアルデヒド脱水素酵素（ALDH）遺伝子増幅実験

アセトアルデヒド脱水素酵素遺伝子とはアセトアルデヒド脱水素酵素をコードする遺伝子である。体内では摂取したアルコール（例：エタノール）から、アルコール脱水素酵素の働きによってアセトアルデヒド（頭痛や二日酔いの原因）が産生される。ALDH は、アセトアルデヒドをアセチル CoA に変換する。アセチル CoA とは生体内において重要な中間代謝物質であり、例えば解糖系とクエン酸回路を結ぶ。

日本人は、通常型ホモ接合体（NN 型）、ヘテロ接合体（NM 型）、変異型ホモ接合体（MM 型）に分かれると言われている（Takeshita et al. 1994）。NN 型は ALDH 活性が NM 型と比較して高く、MM 型は本活性を持たない。そのため、遺伝型の違いによってお酒を飲んだ後の症状に個人差が生まれる。そこで本実習では、各人の遺伝子型を調べ、アルコールから産生されたアルデヒドに対する耐性について考えてもらう。

ALDH 活性の強さ

NN 型 >> NM 型 >> MM 型

方法

まず各自の毛髪から DNA を抽出する。抽出した DNA を用いて、N 型遺伝子特異的 DNA 増幅（Polymerase Chain Reaction：PCR）および M 型遺伝子特異的 PCR を行う。この

際、調べたいサンプル DNA に加え、必ずネガティブコントロールと（できれば）ポジティブコントロールを使用することを忘れてはならない。今回は滅菌水をネガティブコントロールとして用いる。

参照

細胞の分子生物学 NEWTON PRESS ; Takeshita et al. (1994) Hum Genet 94:217-223

使用するもの

- ・ はさみ
- ・ ピンセット
- ・ エタノール（消毒用）
- ・ 滅菌済み 1.5 mL チューブ
- ・ ゴム手袋（必要な人だけ）
- ・ ピペット 100-1000 μ L
- ・ ピペット 20-200 μ L
- ・ ピペット 2-20 μ L
- ・ ブルーチップ（100-1000 μ L ピペット用）
- ・ イエローチップ（20-200 μ L ピペット用）
- ・ ウォーターバス（55°C）
- ・ 遠心機
- ・ サーマルサイクラー
- ・ 青色励起光照射装置
- ・ 抜きたての毛髪（毛根付）
- ・ エタノール（実験試薬）
- ・ DNA 抽出バッファー
- ・ 酵素液
- ・ クロロフォルム/イソアミルアルコール（24:1）
- ・ 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)
- ・ 99.5% エタノール
- ・ 70% エタノール
- ・ Tris-EDTA バッファー
- ・ PCR 用チューブ
- ・ 滅菌水
- ・ dNTP
- ・ 10×PCR バッファー
- ・ アルコール脱水素酵素遺伝子プライマー F

- ・通常型アルコール脱水素酵素遺伝子プライマー NR
 - ・変異型アルコール脱水素酵素遺伝子プライマー MR
 - ・DNA 増幅酵素 ExTaq
 - ・DNA 染色試薬 サイバーゴールド
 - ・ローディングバッファー
 - ・パラフィルム
 - ・アガロースゲル
- *TA に使用してもらうもの

1 日目

1. 毛髪を抜く。
 - ・毛根がついていることを確認すること
2. 毛髪を洗淨する。
 - ・毛根から約 1 cm 切り取る。
 - ・エタノールが 1 mL 入ったチューブに毛根付毛髪をピンセットで入れる。
 - ・ふたを閉めたチューブを数回転倒混和する。
 - ・ピンセットで毛髪を取り出し、キムワイプの上に置く（エタノールの除去）。
3. 新しいチューブに毛髪を入れ、ピンセットとはさみを使用して 5 mm に切る。
4. DNA 抽出バッファーを 213 μ L 加え、55°C・20 分インキュベートする。
 - ・DNA 抽出バッファーにはタンパク質変性剤が含まれているので、取扱いには十分に注意する。目に入ったり、手に付着した場合は直ちに多量の水で十分に洗い流す。
5. 酵素液 5 μ L 加え、55°C・10 分インキュベートする。
6. クロロフォルム/イソアミルアルコール (CI, 24:1) 200 μ L を加え、ふたをしっかりと閉めて 5 分間おだやかに転倒混和する。
 - *CI の添加は TA にドラフト内で行ってもらう。
7. 11,000 \times g 室温 5 分で遠心分離する。
8. 水層（上層）をピペットで吸い、別のチューブに移す。
 - ・ピペットの数字を 300 に合わせる（約 200 μ L の水層がとれる）。
 - ・有機溶媒層（下層）および境界層（白い膜：タンパク質等）を吸い取らないようにする。
9. DNA を含む水層に 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)を 20 μ L、Ethachinmate 2 μ L 加えて混合する。
10. 99.5% エタノール 400 μ L 加え、チューブのふたを閉めて転倒混和する。
11. 11,000 \times g 室温 15 分で遠心分離する。

12. 液層を捨てる。
13. 70% エタノールを 1 mL 加える。
14. 11,000×g 室温 5 分で遠心分離する。
=====以降 TA に作業してもらう=====
15. 液層を捨て、乾燥させる。
16. Tris-EDTA バッファー (pH 8.0) 20 μL 加え、DNA を溶解させる。
17. 以下の試薬を混合する。
(N 型遺伝子用 PCR)

滅菌水	5.16
dNTP	0.8
10×PCR バッファー	1
プライマー F	1
プライマー NR	1
DNA (または水)	1
ExTaq	0.04
計	10 μL

(M 型遺伝子用 PCR)

滅菌水	5.16
dNTP	0.8
10×PCR バッファー	1
プライマー F	1
プライマー MR	1
DNA (または水)	1
ExTaq	0.04
計	10 μL
18. サーマルサイクラー-DNA 増幅反応を行う
96°C 2分
*DNA 増幅酵素の活性化
[30 サイクル]
96°C 30 秒 (2 本鎖 DNA のかい離)

60°C 30 秒 (プライマーと DNA のアニーリング)

72°C 30 秒 (DNA 増幅)

2 日目

1. ローディングバッファー (LB) をパラフィルムの上に 1 μ L ずつ、4 つ離して置く。
2. PCR 溶液 10 μ L をピペットで採取し、LB と混ぜる。
3. 青くなった PCR 溶液をアガロースゲルのウェル (穴) にゆっくりと入れる。
・チップの先を深く入れなくても LB で重くなった PCR 溶液はウェルの底に沈む。

レーン 1 N 型用 PCR 反応液 10 μ L (DNA 使用)

レーン 2 N 型用 PCR 反応液 10 μ L (ネガティブコントロール)

レーン 3 M 型用 PCR 反応液 10 μ L (DNA 使用)

レーン 4 M 型用 PCR 反応液 10 μ L (ネガティブコントロール)

4. 150 V 20 分電気泳動を行う。
5. サイバーゴールド溶液にアガロースゲルを入れ、10 分インキュベートする。
6. 蒸留水でゲルを洗浄する

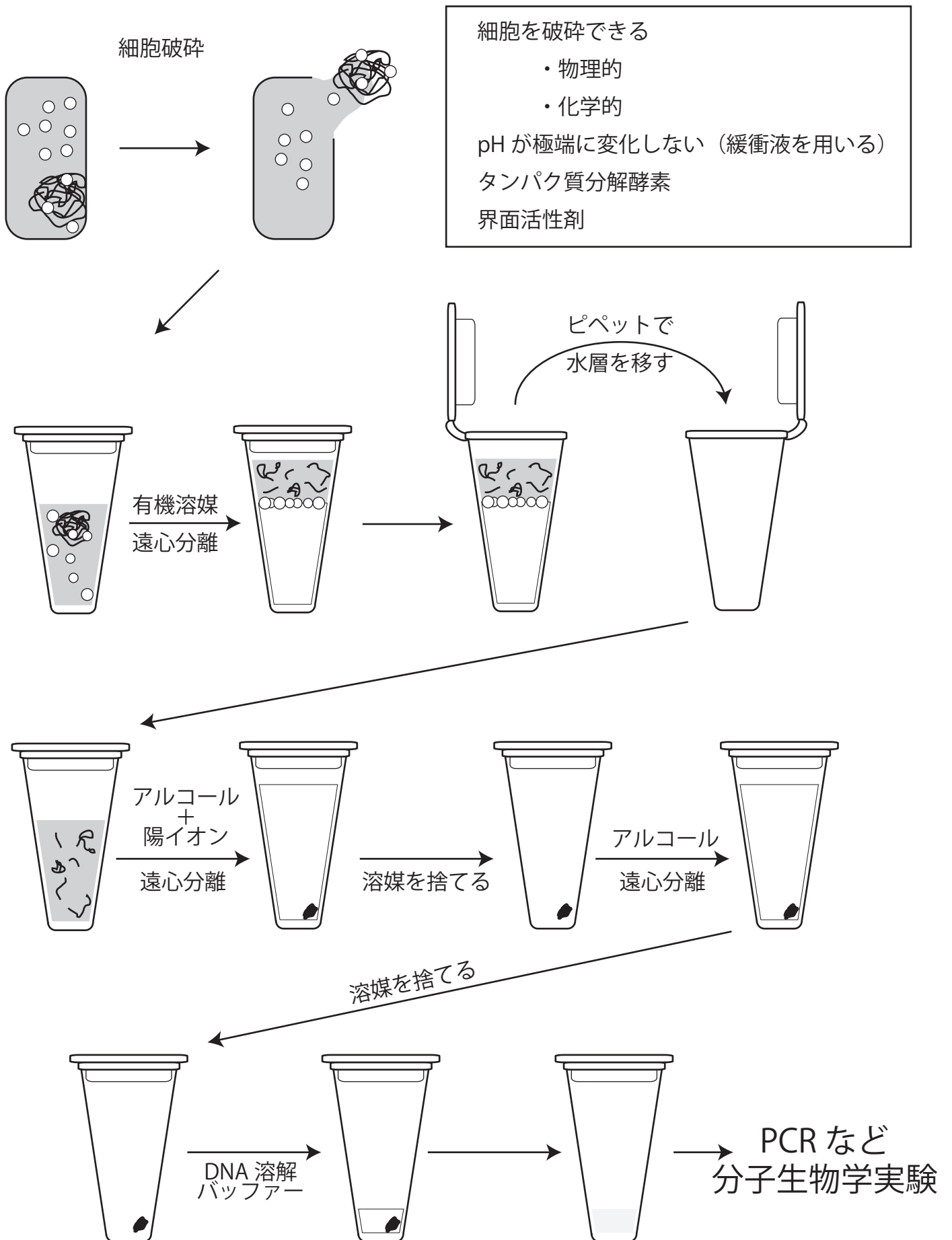
=====以降 TA に作業してもらう=====

7. アガロースゲルを青色光照射装置上で観察し、写真撮影をする。

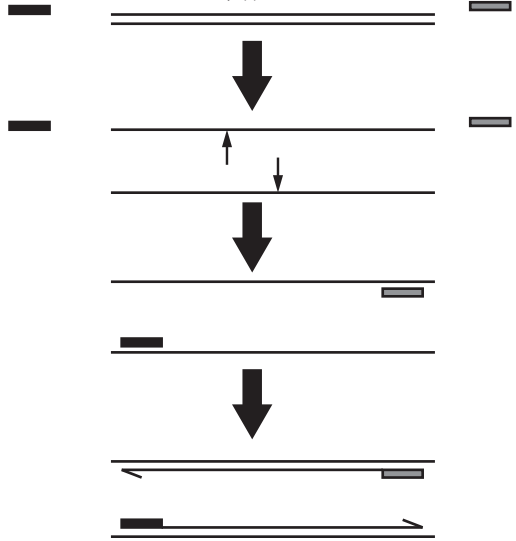
-
8. TA から写真を受け取る。

9. データの評価を行う。

DNA 抽出のフローチャート



プライマー1 2本鎖 DNA プライマー2



常温

96°C

60°C

72°C

× 30 サイクル

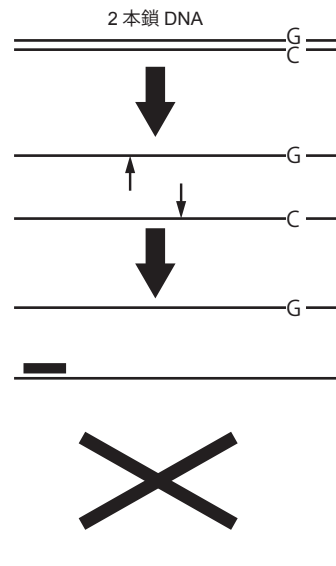
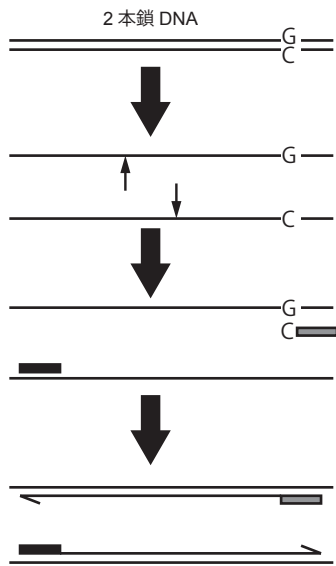
PCR 反応の概略図

遺伝子型特異的 PCR 反応の概略図

プライマー1

プライマー2 プライマー1

プライマー3



常温

96°C

60°C

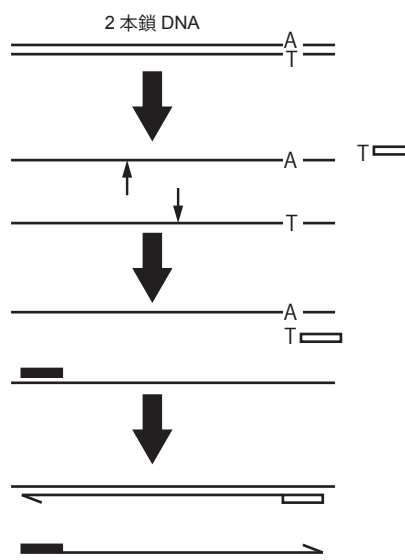
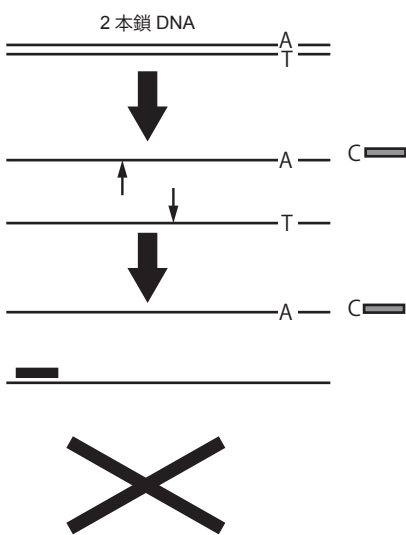
72°C

× 30 サイクル

プライマー1

プライマー2 プライマー1

プライマー3



常温

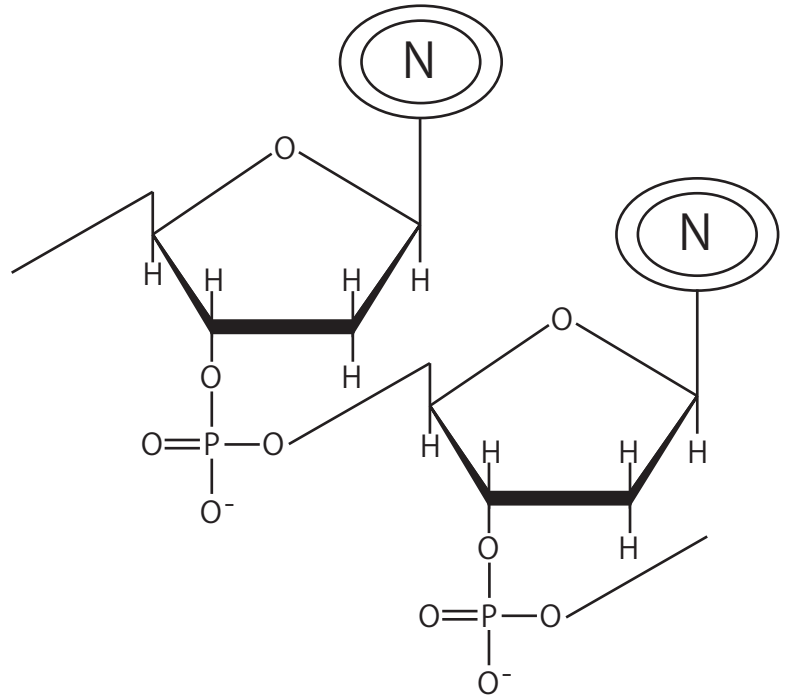
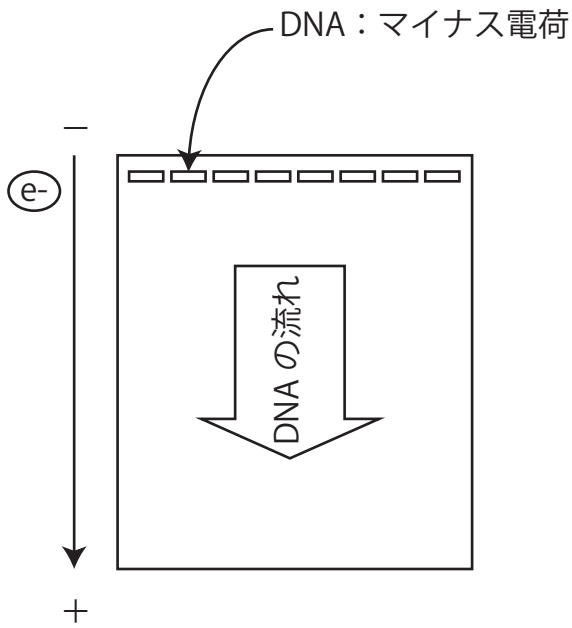
96°C

60°C

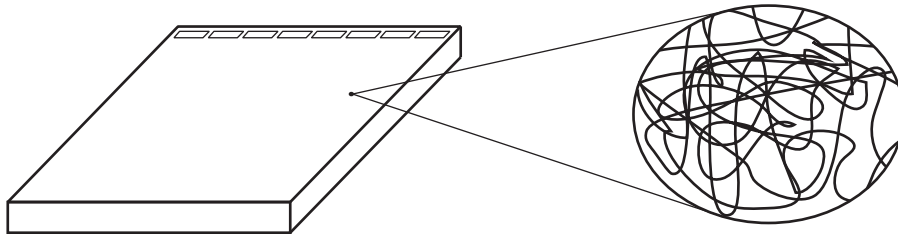
72°C

× 30 サイクル

アガロースゲル電気泳動



DNA 分子 : 大 = 流れにくい
小 = 流れやすい



DNA 分子

