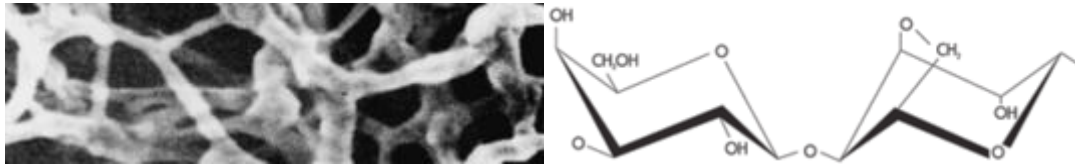


1. アガロースゲルの作成

1.1. 目的

PCR 産物の電気泳動に用いるアガロースゲルを作成する。

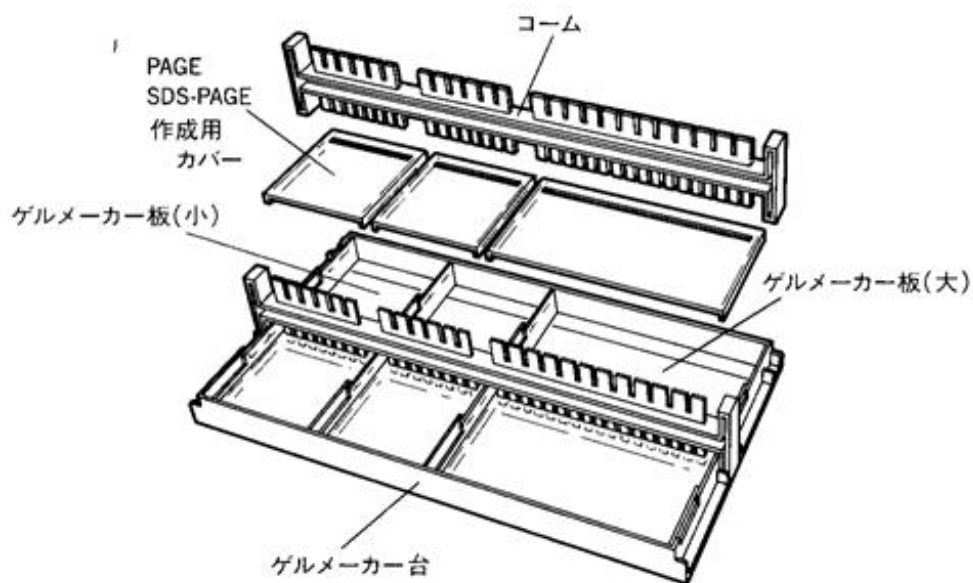
アガロース (agarose) は、寒天生産性を有する海藻から抽出された画分で、寒天のゲル化において大きな役割を担う。アガロースは、融解温度とゲル化温度の差 (Hysteresis) が大きく、分子生物学および生化学の分野で、電気泳動のような分離作業に最適である。一般的なアガロースは、ゲル化の温度範囲が 32~45℃で、融解温度は通常 80~95℃である。アガロースには毒性がないことも、便利であることの大きな理由である。



多糖類の構造はガラクトサンで、図のようにアガロビオース 1-3、1-4 結合によって形成される。この化学構造により、アガロースは低濃度でも非常に耐久性のあるゲルを形成することができる。アガロースゲルの網状構造の形成は水素結合によるもので、このことが「加熱すれば溶解する」という熱可逆性につながっている。イオン性基が存在しないためにゲルは中性で、ゲルの網状構造を通して移動する親水性高分子との相互作用がない。以上のことから、アガロースゲルは粒子にとっての効率的な「ふるい」となる。

1.2. 材料

- ・ アガロース
- ・ TAE バッファー (Tris, Acetic acid [酢酸], EDTA)
- ・ 臭化エチジウム (エチジウムブロマイド、EtBr) (10 mg/ml)
- ・ アガロースゲル作成器一式



1.3. 実験に必要なアガロースゲル

- ・ PCR 産物 14 サンプル (ゲノム A,B の 2 種 × プライマー 0~6 の 7 種) + マーカーで、**15 レーン**が必要。
- ・ 15 レーンのアガロースゲルは、ゲルメーカー板 (大) で作成する。**容量 : 40 ml**
- ・ 予想される PCR 産物の長さ : 382~643 bp。
比較的短い (< 1 kb) ので、**1.5% (w/v)** のアガロースゲルを作成する。
- ・ 1.5% のアガロース溶液 40 ml に必要なアガロースは _____ g である。

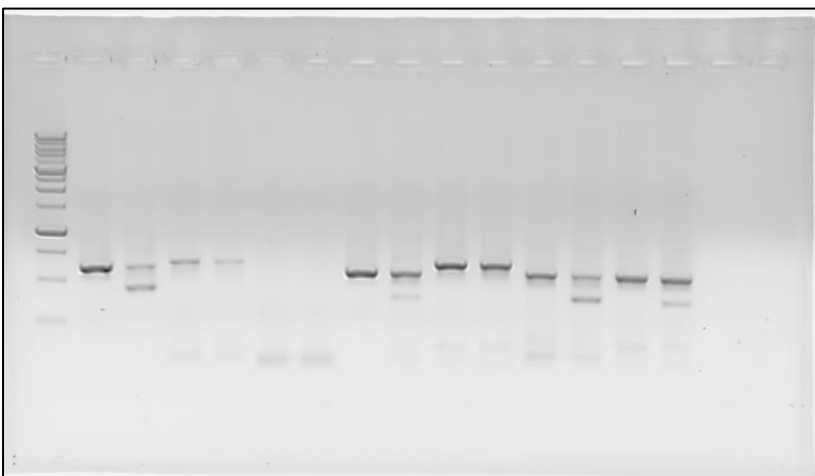
1.4. 方法

1. 50 ml チューブで、40 ml の TAE バッファーを計量する。
2. 上で計量した TAE バッファーをフラスコに入れる。
3. 電子天秤で、_____ g のアガロースを計量する。
4. 上で計量したアガロースをフラスコに入れ、ゆるやかに回して TAE バッファーと混合する。
5. フラスコを電子レンジに入れ、加熱する。**軍手を着用すること!**
6. TAE が沸騰し出したら、電子レンジの扉を開けて加熱を止める。
7. フラスコをゆるやかに回してアガロースを溶かす。
8. 5-7 を繰り返し、アガロースを完全に溶解する。
9. アガロース溶液に 2 ul の EtBr を加え、ゆるやかに回して TAE バッファーと完全に混合する。
10. ゲルメーカー台にゲルメーカー板 (大) をセットする。
11. ゲルメーカー板の上にアガロース溶液を静かに流し込む。気泡ができた場合はチップで除去する。
12. 17 レーンのコームを差し込む。
13. ゲルメーカー台全体にサララップをかぶせ、ゲルが完全に固まるまで室温で静置する (20 分程度)

1.5. 課題 (最終レポートに、以下の設問に対する解答を盛り込むこと)

- ・ EtBr は**発がん性物質**である。扱いには十分気を付けること!
- ・ EtBr が発がん性を示すのはなぜか?

(参考 : 電気泳動写真の例)



2. PCR 産物の電気泳動

2.1. 目的

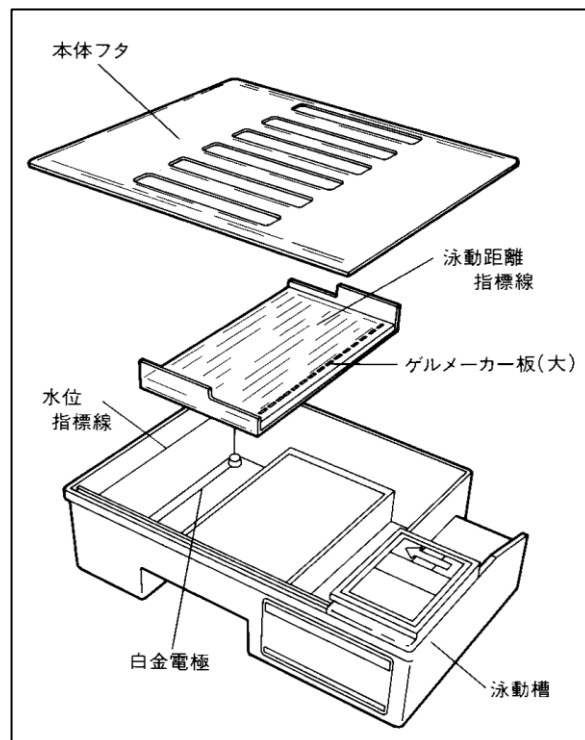
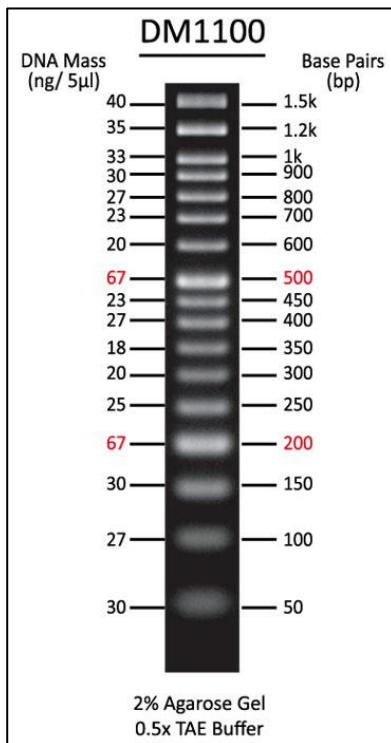
PCR 産物（二本鎖 DNA）の電気泳動を行い、DNA を分子量ごとに分離する。

電気泳動とは、物質の電気的な性質を利用し、DNA やタンパク質を分離するための方法である。アガロースゲル電気泳動では、TAE バッファーに沈めたゲル中にマイナスに荷電した DNA を置く。DNA のヌクレオチドは、リン酸結合の部分でマイナスに荷電している（資料参照）。

ゲル中に DNA 断片を置いたら、ゲルに直流電気を流す。すると、マイナスに荷電している DNA は、プラス極の方向に移動する。これを「泳動」という。泳動の際には、DNA の長さによって、DNA 断片の移動スピードに違いが生じる。DNA が移動するときにゲルが抵抗となるため、長い DNA よりも、短い DNA の方が速く移動する。この現象を利用して、異なる長さの DNA を分離することができる。

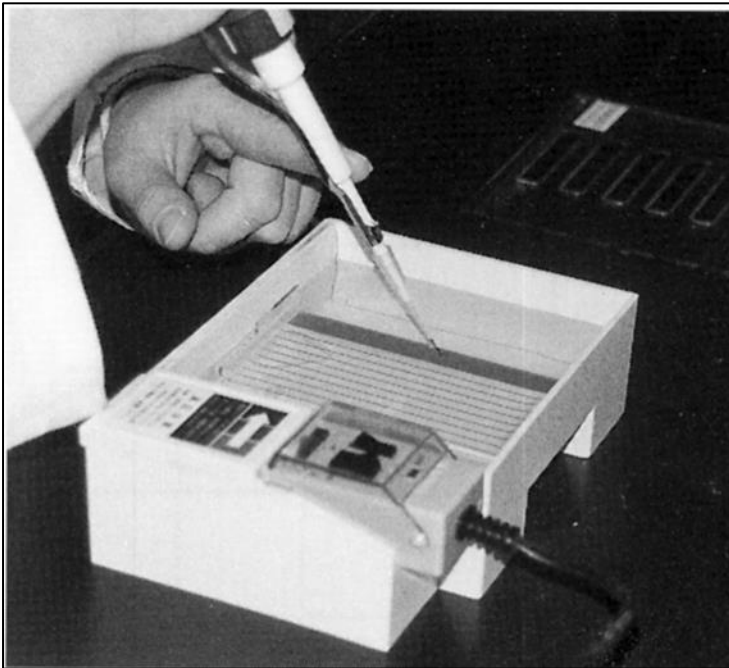
2.2. 材料

- ・ PCR 産物 14 サンプル（20 ul/サンプル）
- ・ DNA ラダー
- ・ 6 x Dye（グリセロール、EDTA、プロモフェノールブルー）
- ・ 作成した 1.5% アガロースゲル
- ・ TAE バッファー
- ・ 電気泳動槽



2.3. 方法

1. 8連チューブ内のPCR産物 20 ul に、____ul の 6 x Dye を加える。
2. 8連チューブをタッピングしてよく混ぜる。
3. 8連チューブを遠心機でスピンドウンする。
4. アガロースゲルから静かにコームを引き抜く。
5. ゲルメーカー台から、ゲルメーカー板（大）ごとアガロースゲルを取り出す。
6. 上のアガロースゲルを電気泳動槽にセットする。**ゲルの方向を間違えないこと！**
7. アガロースゲルが完全に浸されるよう、電気泳動槽の水位指標線まで TAE バッファーを注ぐ。
8. アガロースゲルのウェル（穴）に 20 ul の PCR 産物+Dye を注入する（下の写真を参照）
9. 最後に 5 ul の DNA ラダーをゲルの端のウェルに注入する。
10. 100V で電気泳動を開始する。
11. Dye のプロモフェニルブルーがゲルの中央付近に来たら（20分程度）電気泳動を停止する。



左手でマイクロピペッターを押さえ、チップが震えないようにし、慎重にサンプルをウェルに注入する。
ウェルには以下の順番でサンプルを注入する。

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| ラ | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | ゲノム |
| ダ | F0 | F0 | F1 | F1 | F2 | F2 | F3 | F3 | F4 | F4 | F5 | F5 | F6 | F6 | プライマー |
| ー | R0 | R0 | R1 | R1 | R2 | R2 | R3 | R3 | R4 | R4 | R5 | R5 | R6 | R6 | |

3. 電気泳動像の撮影

3.1. 目的

アガロースゲル電気泳動像の写真を撮影し、泳動した DNA を可視化する。

3.2. 材料

- ・ 電気泳動したアガロースゲル
- ・ UV トランスイルミネーター
- ・ サランラップ
- ・ 暗箱



UV トランスイルミネーター

3.3. 方法

1. UV トランスイルミネーターの上にサランラップを敷く。
2. 電気泳動槽からアガロースゲルを取り出す。
3. アガロースゲルをゲルメーカー板（大）から取り外し、サランラップの上に置く。
サランラップにしわが寄らないようにする。
4. 暗箱をかぶせる。
5. UV トランスイルミネーターのスイッチを入れる。
6. スマートフォンのカメラで電気泳動像を撮影する。

* EtBr を含む TAE バッファーを廃液タンクに捨てる。アガロースゲルは燃えるゴミとして処分する。

次回 11/24（金）は、撮影した電気泳動像の画像解析（泳動した DNA 断片長の計測）を行う。

- ・ 電気泳動像を撮影した者は、グループ内の全員に写真を送ること。
- ・ 電気泳動像を撮影した者は、高谷に写真を送ること。 **ttakaya@shinshu-u.ac.jp**
- ・ 以下のアドレスから、画像解析ソフト「ImageJ」をダウンロードし、インストールしておくこと。
<https://imagej.nih.gov/ij/>
- ・ 次回 11/24（金）の実習には**パソコンを持参**すること。
細かい操作もするので、必要があればマウスも持参すること。
白衣は不要。

*** 電気泳動像をよく観察し、泳動結果についてもよく考えてみて下さい。**