

1. ImageJ による PCR 産物長の計測

1.1. 目的

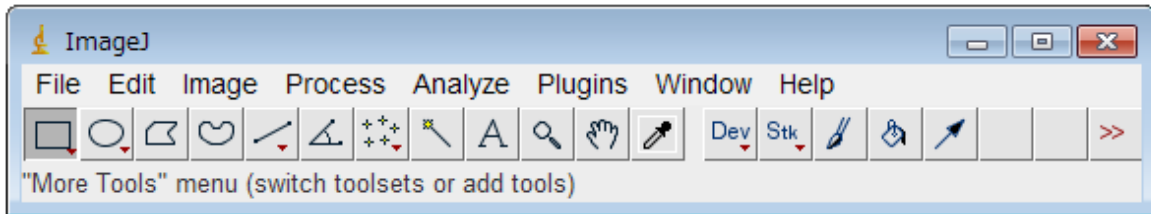
画像解析処理ソフト ImageJ を用い、アガロースゲル電気泳動した PCR 産物の長さを定量する。

1.2. 材料

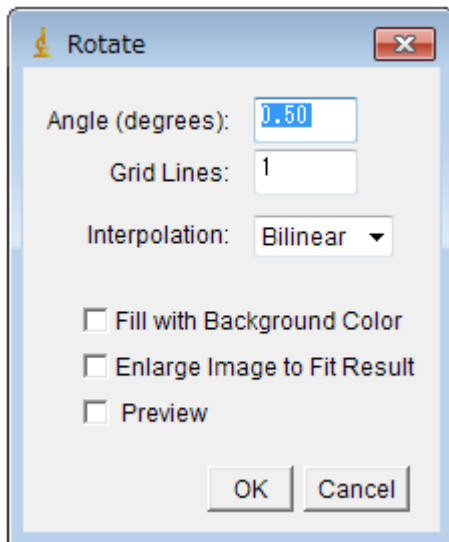
- ・ アガロースゲル電気泳動像
- ・ ImageJ ソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

1.3. 電気泳動像の補正

1. ImageJ を起動する。



2. 「File」 → 「Open...」から電気泳動像の画像ファイルを開く。
3. 「Edit」 → 「Invert」で白黒反転し、背景を白く、バンドを黒くする。
4. 画像内のゲルを水平にする。
「Image」 → 「Transform」 → 「Rotate」を選択する。「Rotate」ウィンドウの「Angle」に角度を入力し、「OK」を押すと画像が回転する。角度は、時計回りなら正の値、反時計回りなら負の値を入力する。

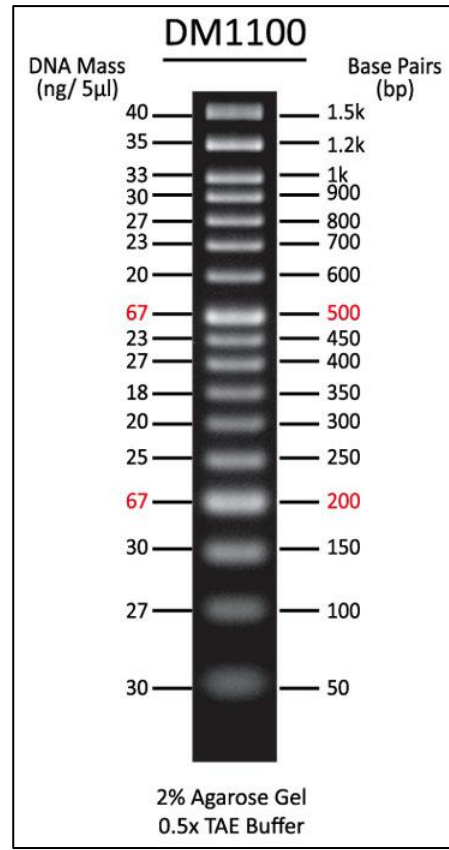


5. 加工した画像を別名で保存する。
「File」 → 「Save As」 → 「TIFF...」を選択し、適当な名前を付けて保存する。

1.4. 検量線の作成

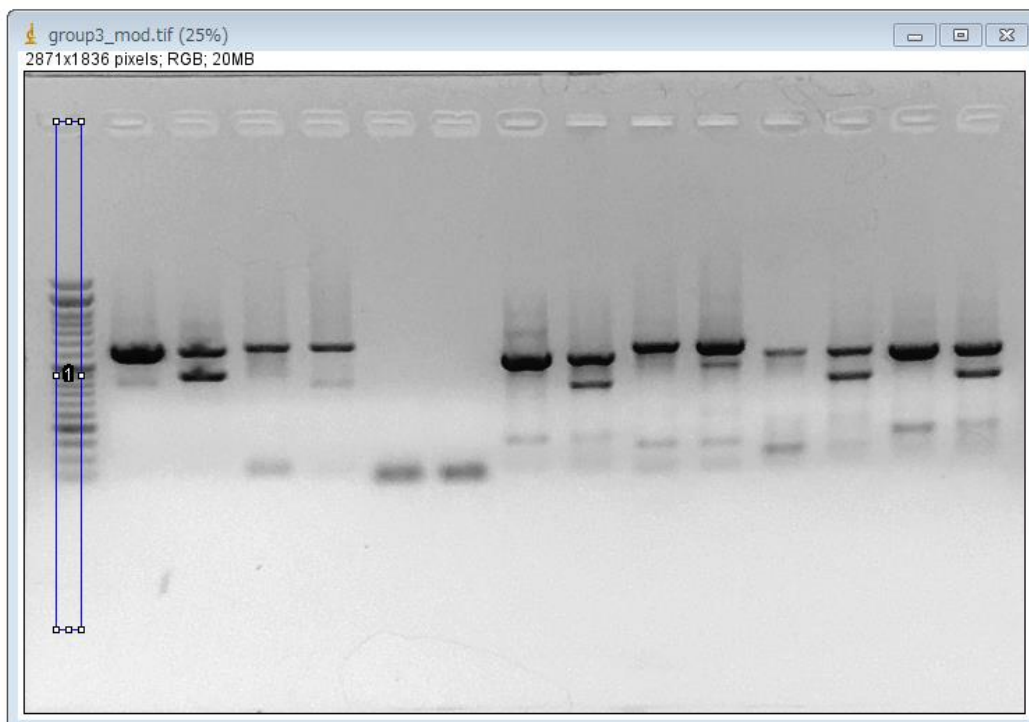
1. Excel を起動し、以下の表を作成する。

泳動距離	ラダー (bp)
	1500
	1200
	1000
	800
	700
	600
	500
	450
	400
	350
	300
	250
	200
	150
	100
	50

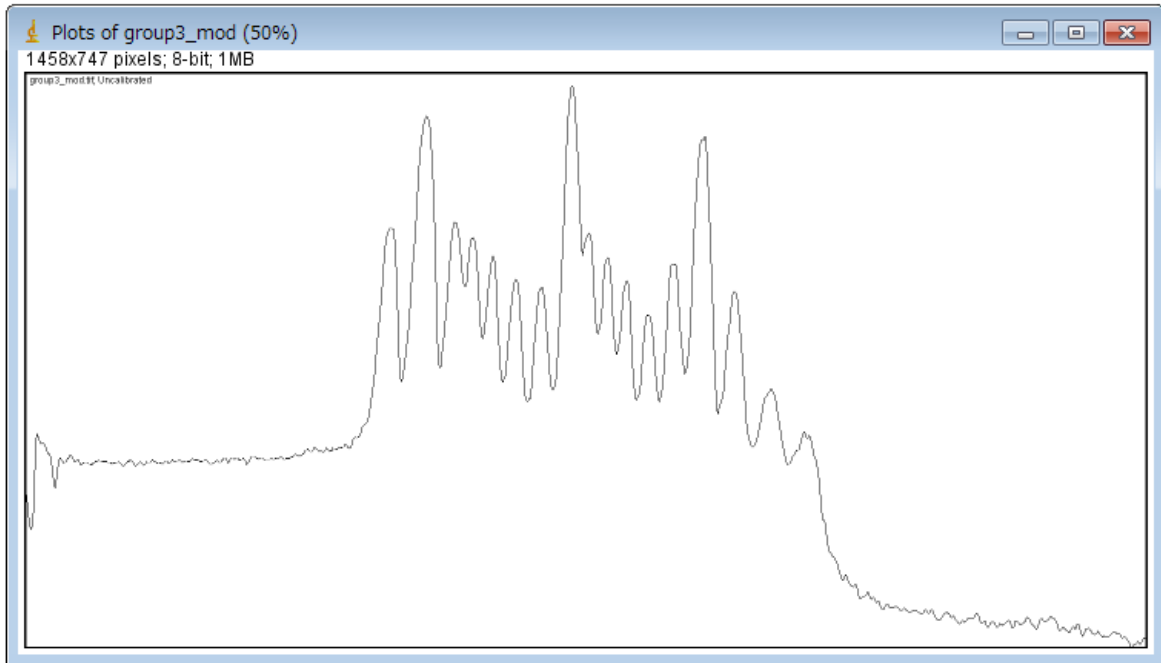


2. Image]に戻る。「File」の下にある四角のツールを選択する。

3. マーカーのレーンを四角で囲う。このとき、四角の上辺がウェル (泳動開始点) となるようにする。



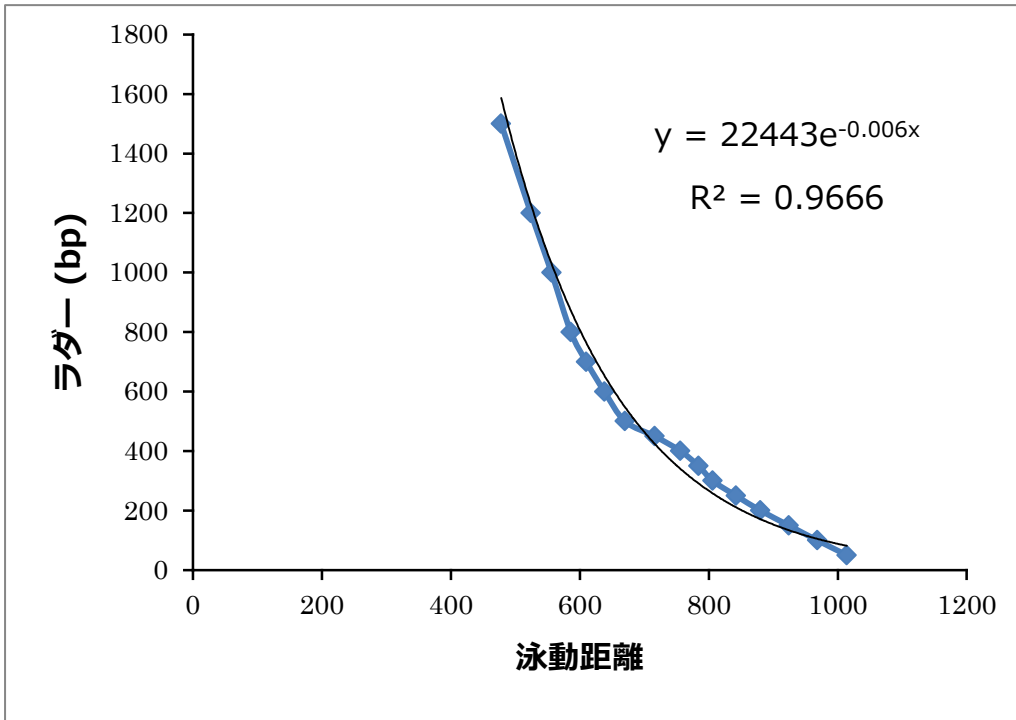
4. 「Analyze」 → 「Gels」 → 「Select First Lane」を選択する。
5. 「Analyze」 → 「Gels」 → 「Plot Lanes」を選択する。



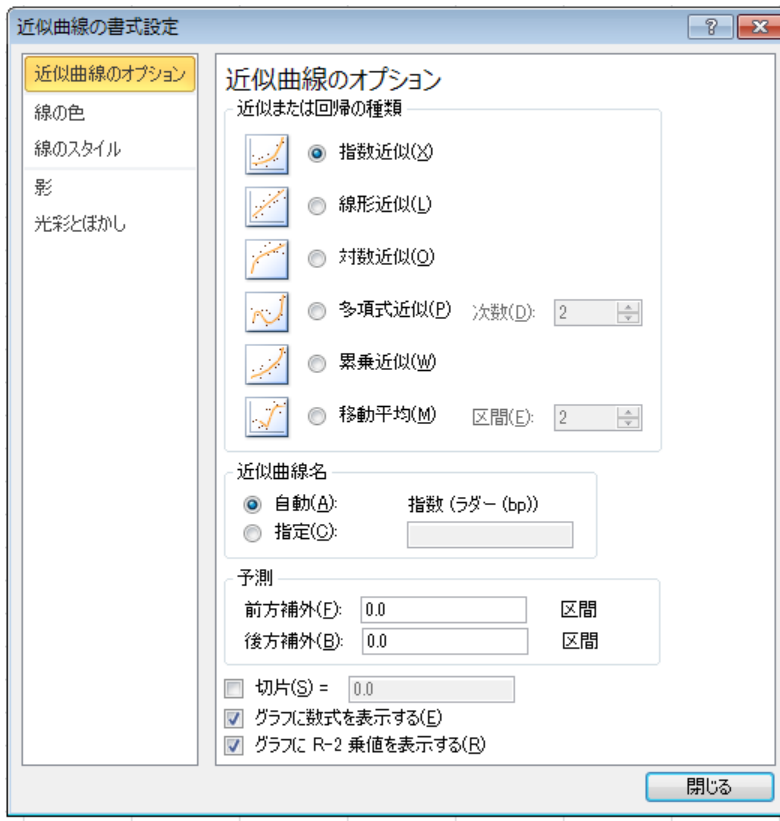
6. 「Process」の下にある丸いツールを選択する。
7. プロットのピーク (= ラダーのバンド) を選択する。16 個のピークがあるはずである。
8. ピークを選択し終わったら、「M」キーを押す。「Results」ウィンドウに計測結果が表示される。

	Area	Mean	Min	Max	X	Y
1	0	255	255	255	478	206
2	0	0	0	0	524	62
3	0	255	255	255	556	202
4	0	255	255	255	586	214
5	0	255	255	255	610	236
6	0	255	255	255	638	272
7	0	255	255	255	670	284
8	0	255	255	255	716	28
9	0	255	255	255	756	248
10	0	255	255	255	784	280
11	0	255	255	255	806	316
12	0	255	255	255	842	252
13	0	255	255	255	880	96
14	0	0	0	0	924	286
15	0	255	255	255	968	408
16	0	0	0	0	1014	468

9. 「X」の値が、プロットの左端からピークまで、すなわち泳動写真でいえば、ウェルからバンドまでの距離である。
10. ラダーのバンドの泳動距離（「X」の値）を Excel に入力する。
11. Excel のデータを選択し、「散布図」のグラフを作成する。



12. 「レイアウト」 → 「近似曲線」 → 「その他の近似曲線オプション...」を選択する。
13. 「指数近似」「グラフに数式を表示する」「グラフに R-2 乗値を表示する」を選択する。



14. 検量線の方程式と相関係数が得られる。この資料の例では、

方程式 : $y = 22443e^{-0.006x}$

相関係数 : $R^2 = 0.9666$

15. 上の式に、計測したい PCR 産物のバンドの泳動距離 x を代入すると、PRC 産物の長さ y (bp) が得られる。

f_x	=22443*EXP(-0.006*820)	
	4	5
バンドの泳動距離	バンドの長さ (bp)	
	820	163.8143936

1.5. PCR 産物の長さの計測

- 各レーンのバンドの泳動度は、「1.4. 検量線の作成」の作業 1~8 を繰り返すことで得られる。
- 各レーンの PCR 産物の長さを計測し、下の表を完成させよ。
 バンドが複数ある場合は全て計測し、全ての計測値を記入せよ。
 次頁に同じ表があるので、同様に記入して提出しなさい。

プライマー	PCR 産物の長さ (bp)			
	Z 染色体		W 染色体	
	理論値	計測値	理論値	計測値
F0/R0	614		446	
F1/R1	644		476	
F2/R2	643		475	
F3/R3	550		382	
F4/R4	629		461	
F5/R5	557		389	
F6/R6	552		384	

次回 12 月 1 日 (金) は、実験結果について議論し、レポートに書くべき課題について説明します。

*** パソコンを持参すること。**

学籍番号： _____

氏名： _____

プライマー	PCR 産物の長さ (bp)			
	Z 染色体		W 染色体	
	理論値	計測値	理論値	計測値
F0/R0	614		446	
F1/R1	644		476	
F2/R2	643		475	
F3/R3	550		382	
F4/R4	629		461	
F5/R5	557		389	
F6/R6	552		384	

* 自分が PCR 反応、電気泳動を担当したプライマーに○を付けなさい。