

0. マイクロピペッターの操作

0.1. 目的

マイクロピペッターの機構を理解し、正しく操作することで、正確な容量の溶液を計量できるようにする。

1. ウズラゲノム DNA の調整

1.1. 目的

アルカリ抽出法により、ウズラの血液サンプル（**A と B の二種類**）から、ゲノム DNA を調整する。強アルカリ性の溶液で血球細胞を破壊し、細胞核内のゲノム DNA を溶出させ、PCR に用いることが可能なゲノム DNA 溶液を調整する。

1.2. 材料

- ・ ウズラ血液サンプル（「A」と「B」の 2 種類）
- ・ 1.5 ml サンプルチューブ（「A」と「B」の 2 種類）
- ・ 0.2 N NaOH
- ・ 0.04 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)

1.3. 方法

1. 1.5 ml サンプルチューブに、80 ul の 0.2 N NaOH を入れる。
2. 上のチューブに、2 ul のウズラ血液サンプルを加える。
3. チューブをタッピングしてよく混ぜる。
4. チューブを遠心機でスピンドウンする。
5. 75℃で 20 分間、チューブを反応させる。
6. 上のチューブに、720 ul の 0.04 M Tris-HCl (pH8.0) を加えて中和する。
7. チューブをタッピングしてよく混ぜる。
8. これを「**ウズラゲノム DNA 溶液**」とする。

1.4. 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）

- ・ NaOH で溶出したゲノム DNA の溶液を Tris-HCl で中和するのはなぜか？

2. PCR 反応液の調整

2.1. 目的

ウズラゲノム DNA 溶液を鋳型とし、前回の実習で設計したプライマーで CHD1 遺伝子の、exon 16~intron 16~exon 17 の領域を増幅する。PCR の原理を理解し、PCR 反応液を正しく調整する。

2.2. 材料

- ・ 1.5 ml サンプルチューブ (「Mix」)
- ・ 8 連 PCR チューブ 2 セット (「AX」と「BX」。X はグループ番号)
- ・ 滅菌蒸留水 (「H₂O」)
- ・ 10×PCR 緩衝液 (「10×buf」)
- ・ 2.5 mM dNTP 混合液
- ・ DNA ポリメラーゼ (「ExTaq」)
- ・ ウズラゲノム DNA 溶液 (「A」と「B」の 2 種類)
- ・ 10 uM プライマー (F0~F6, R0~R6 の 14 種類) 別紙参照

誰がどのプライマーを担当するか決める。 自分の担当プライマー : _____

2.3. PCR 反応液の組成

	1 サンプル分	15 サンプル分 (Mix)
滅菌蒸留水 (H ₂ O)	12.3 ul	_____ ul
10×PCR 緩衝液 (10×buf)	2.0 ul	_____ ul
2.5 mM dNTP 混合液	1.6 ul	_____ ul
DNA ポリメラーゼ (ExTaq)	0.1 ul	_____ ul
ウズラゲノム DNA 溶液 (A or B)	2.0 ul	_____ ul
10 uM プライマー (F)	1.0 ul	_____ ul
10 uM プライマー (R)	1.0 ul	_____ ul
合計	20.0 ul	_____ ul

2.4. PCR 反応液 Mix の作成

1. 1.5 ml サンプルチューブに、蒸留水、10×buf、2.5 mM dNTP、ExTaq を、この順番で加える。
2. チューブをタッピングしてよく混ぜる。
3. チューブを遠心機でスピンドウンする。
4. チューブを氷上に置く。

2.5. PCR 反応液の調整**8 連 A _____**

Mix (_____ ul)

ゲノム DNA 2 ul

プライマー-F 1 ul

プライマー-R 1 ul

	0A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	
	+	+	+	+	+	+	+	
	A	A	A	A	A	A	A	
	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	

8 連 B _____

Mix (_____ ul)

ゲノム DNA 2 ul

プライマー-F 1 ul

プライマー-R 1 ul

	0B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	
	+	+	+	+	+	+	+	
	B	B	B	B	B	B	B	
	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	

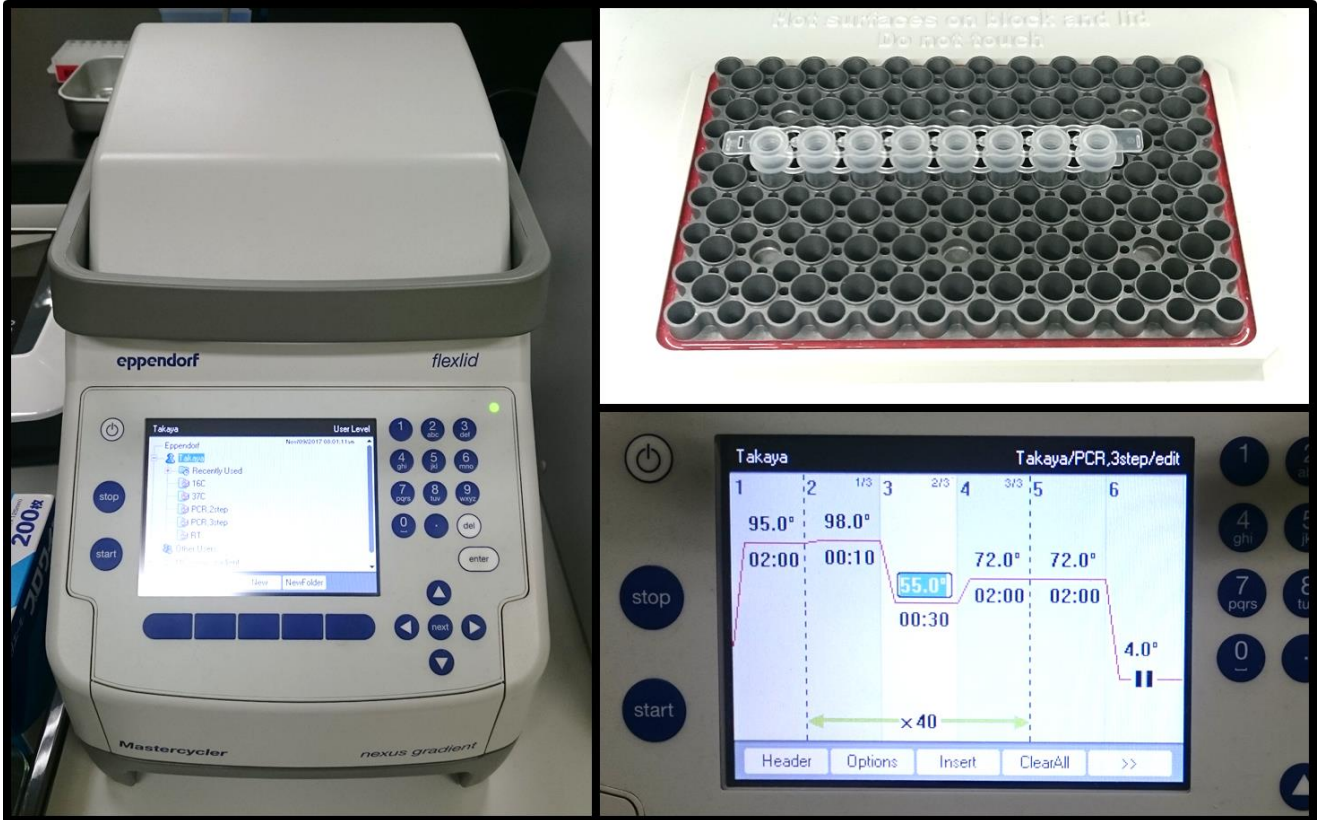
1. 8 連 PCR チューブに、_____ ul の PCR 反応液 Mix を入れる。
2. 上のチューブに、2 ul のウズラゲノム DNA 溶液を入れる。
* チップの先を PCR 反応液 Mix の中に差し込み、ウズラゲノム DNA 溶液を確実に PCR 反応液 Mix に加える。
3. 上のチューブに、1 ul のプライマー-CHD-F__を入れる。
* ウズラゲノム DNA 溶液と同様に、確実にプライマーを加える。
4. 上のチューブに、1 ul のプライマー-CHD-R__を入れる。
5. 全てのチューブに全ての溶液を加え終わったら、チューブキャップを取り付ける。
6. チューブをタッピングしてよく混ぜる。
7. チューブを遠心機でスピンドウンする。
8. 8 連チューブを氷上に置く。

2.6. 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)

- ・ PCR 反応液 Mix を作成するとき、蒸留水、10×buf、2.5 mM dNTP、ExTaq の順番で加えるのはなぜか？
- ・ Taq が入っているチューブを氷上に置くのはなぜか？

3. PCR 反応

サーマルサイクラーを用い、以下の条件で PCR 反応を行う。



予備変性	95°C, 2分	ゲノム DNA を完全に解離する
変性	98°C, 10秒	
アニーリング (for F1-6/R1-6)	55°C, 30秒	×15 サイクル
伸長 (1 kb/min)	72°C, 30秒	
変性	98°C, 10秒	
アニーリング (for F0/R0)	50°C, 30秒	×15 サイクル
伸長 (1 kb/min)	72°C, 30秒	
最終伸長	72°C, 2分	
冷却	4°C	

PCR 反応が終了したら、チューブを-20°Cで保存する。