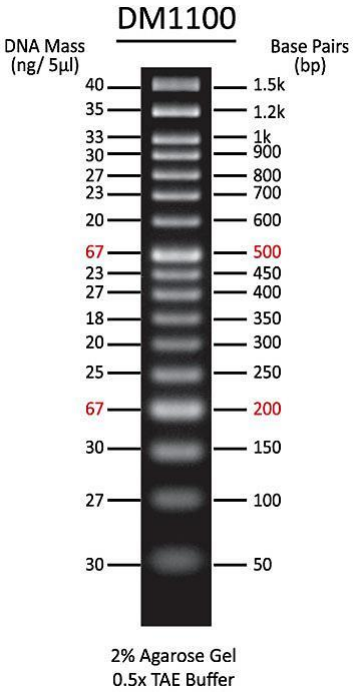
動物生命機能学実験

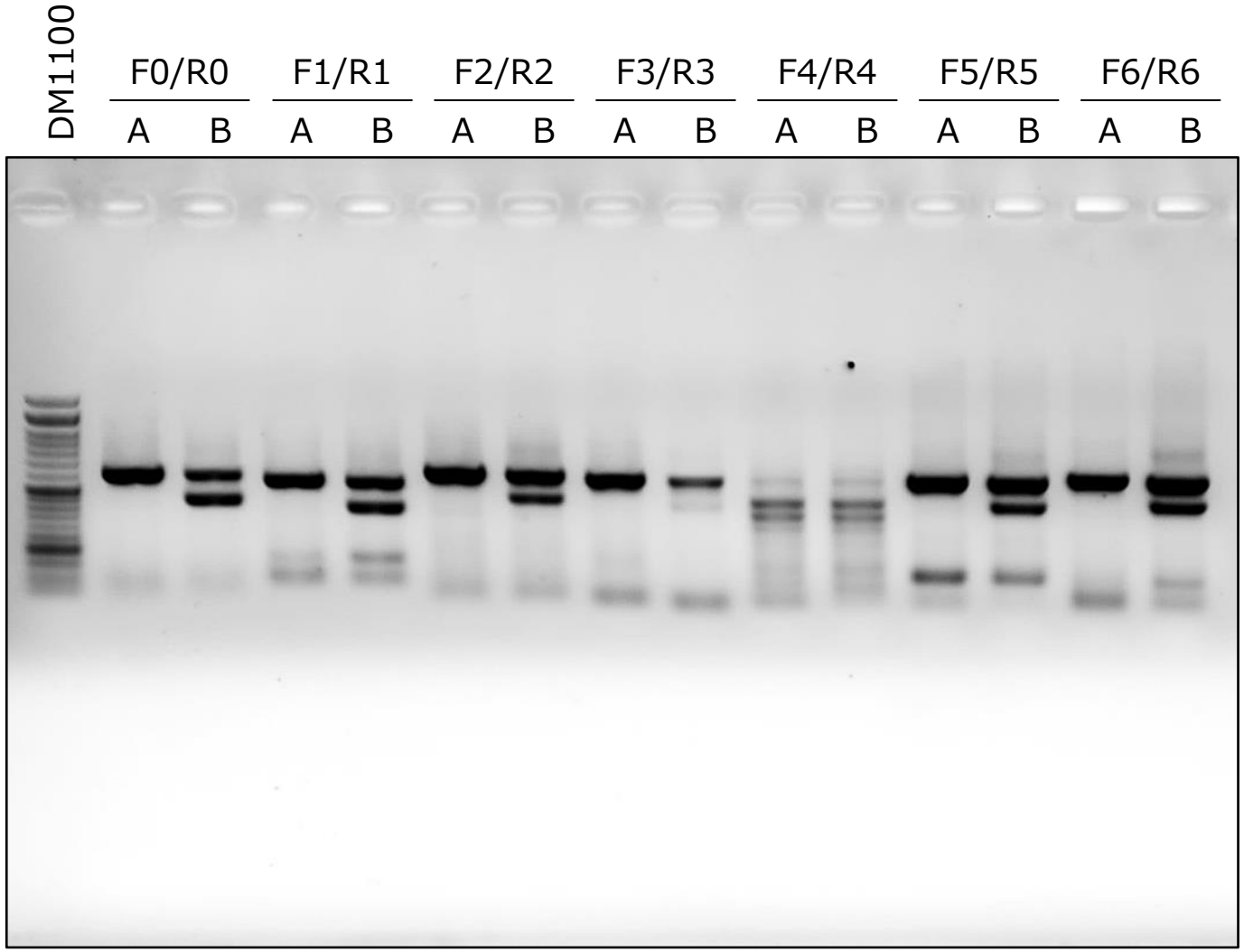
PCR による genotyping: 鳥類の雌雄鑑別

高谷 智英
t-takaya.net

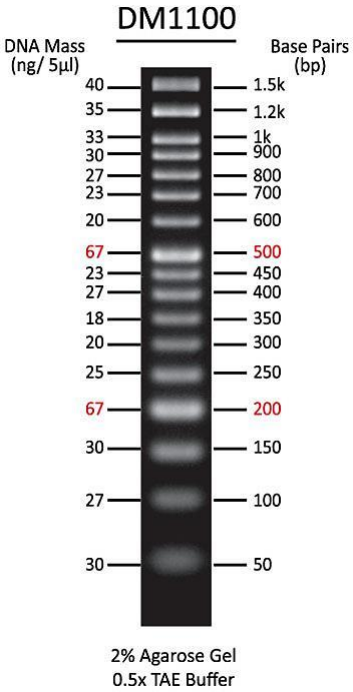
Nov 8, 2019

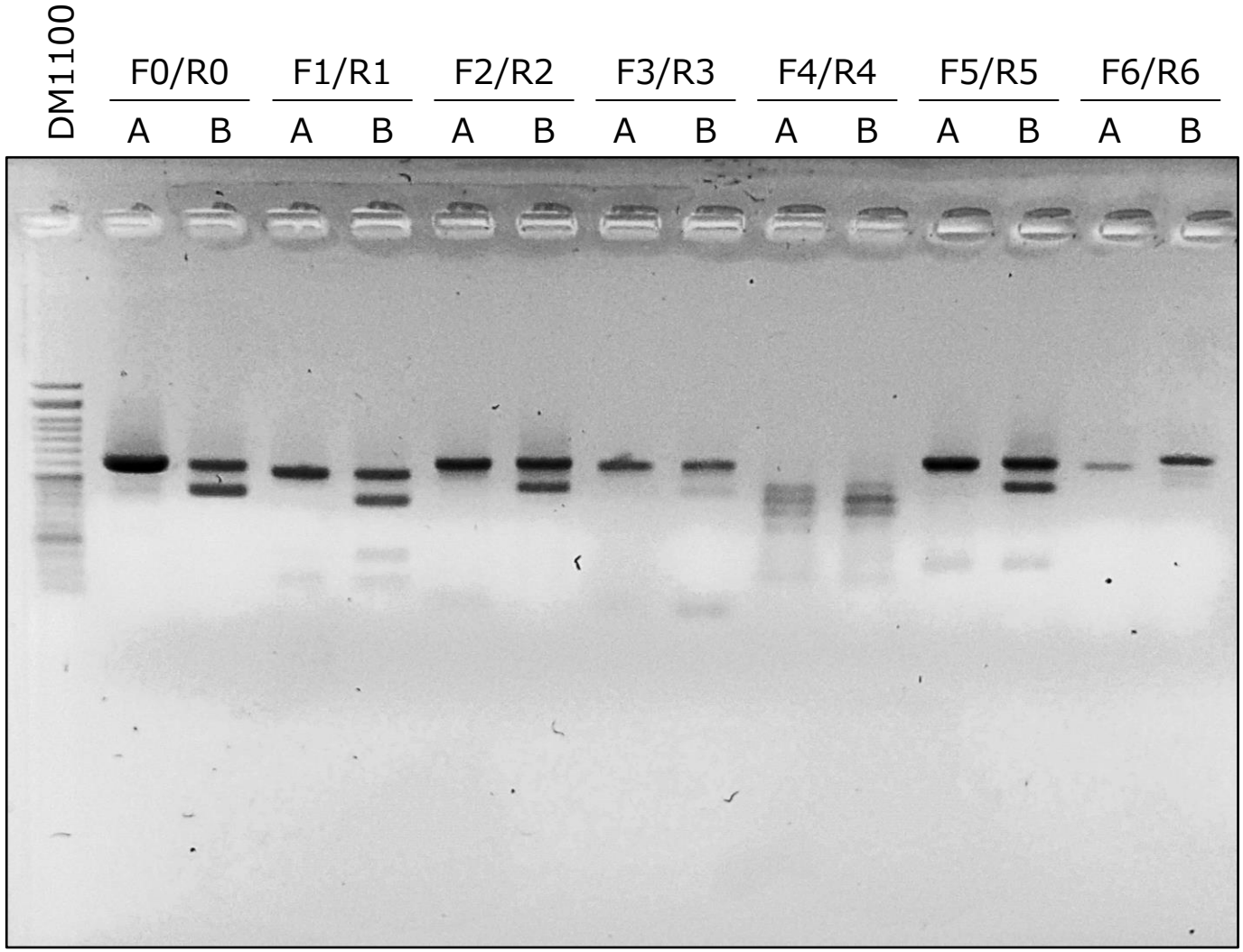
PCR産物の電気泳動結果（模範実験）



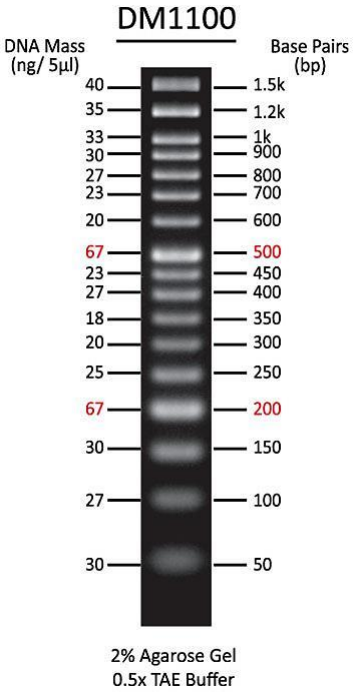


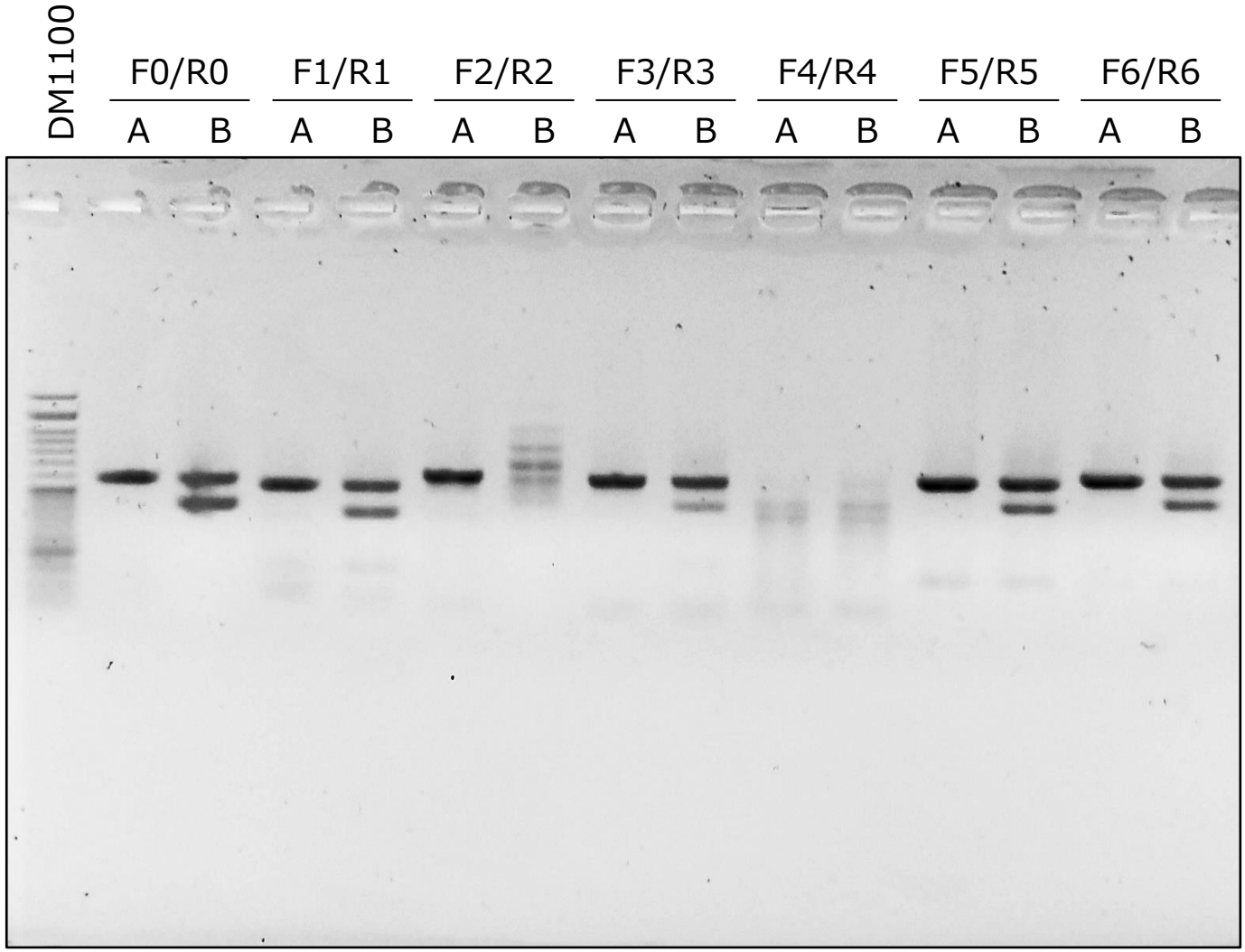
PCR産物の電気泳動結果（1班）



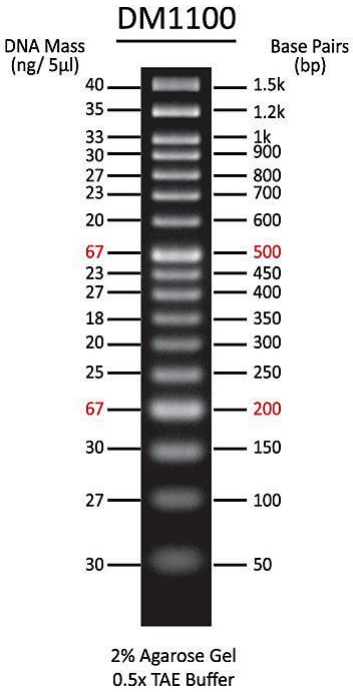


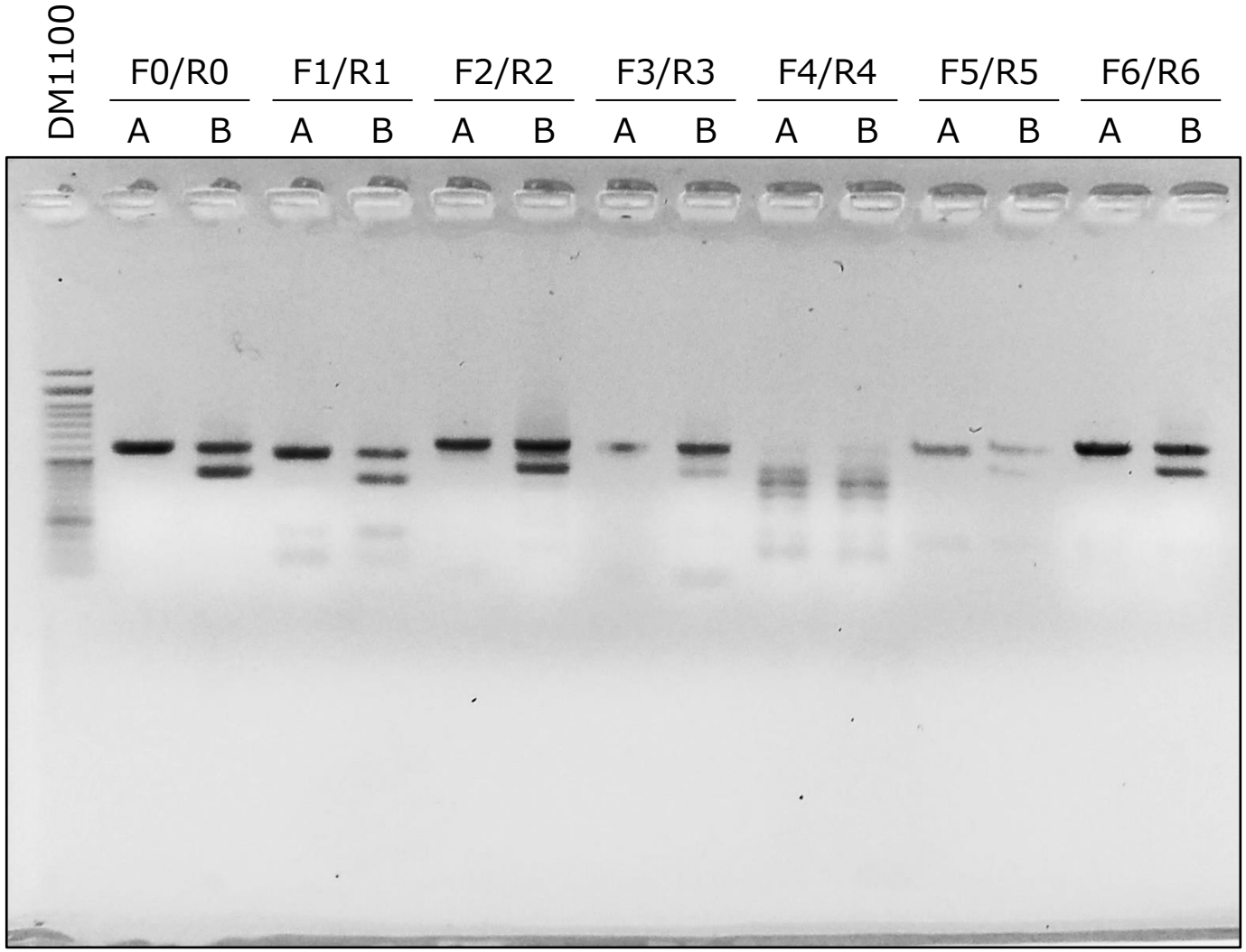
PCR産物の電気泳動結果（2班）



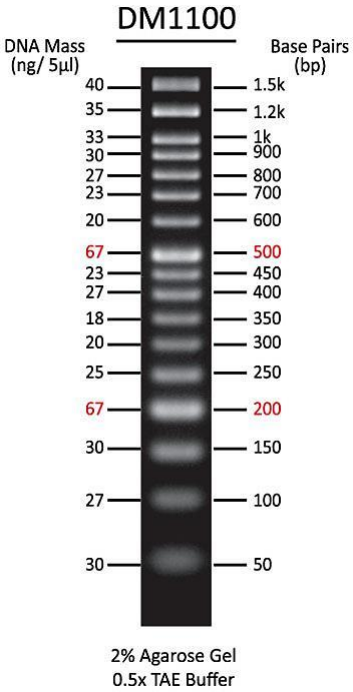


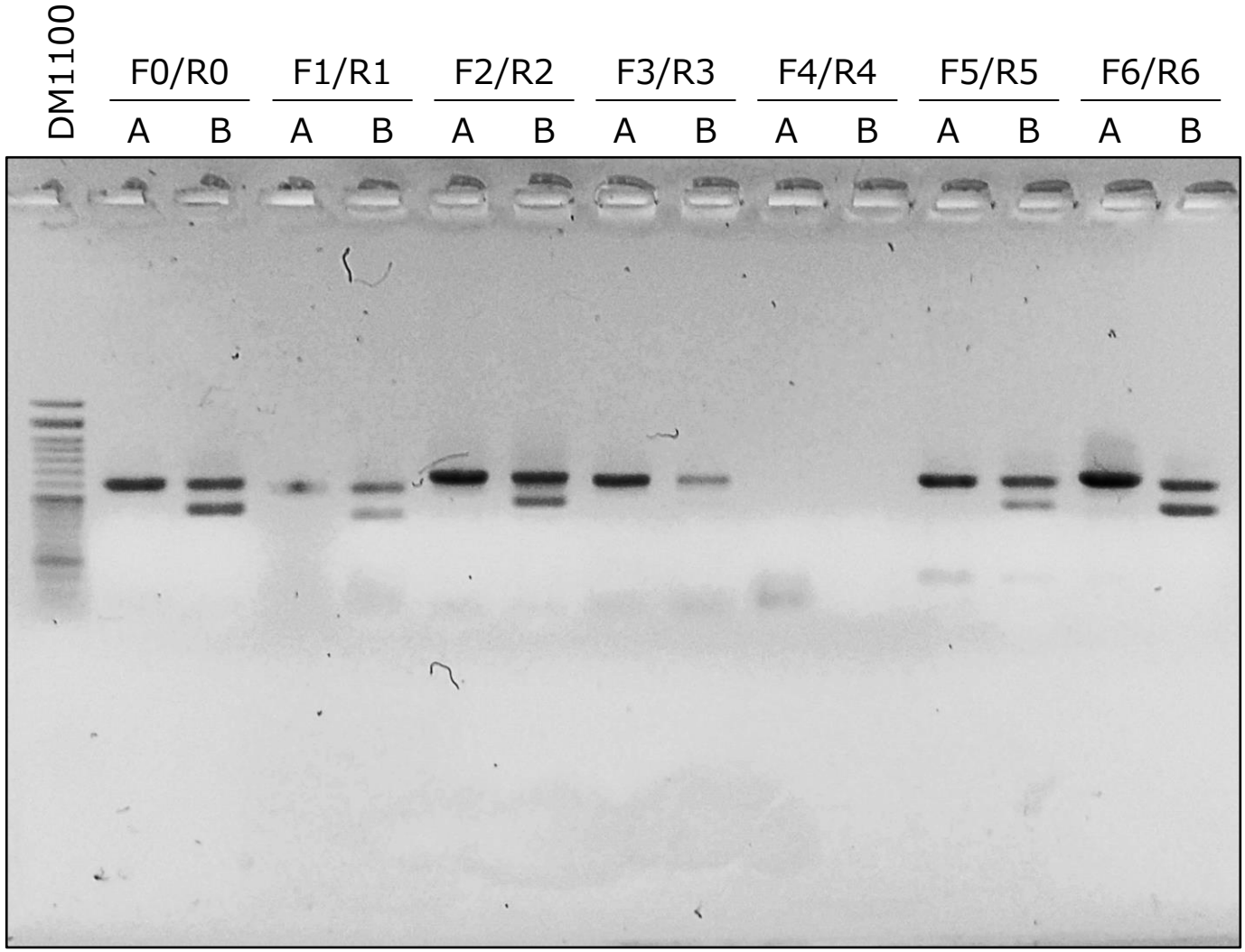
PCR産物の電気泳動結果（3班）



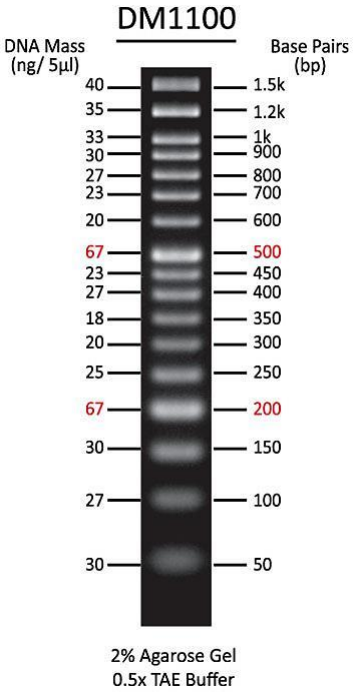


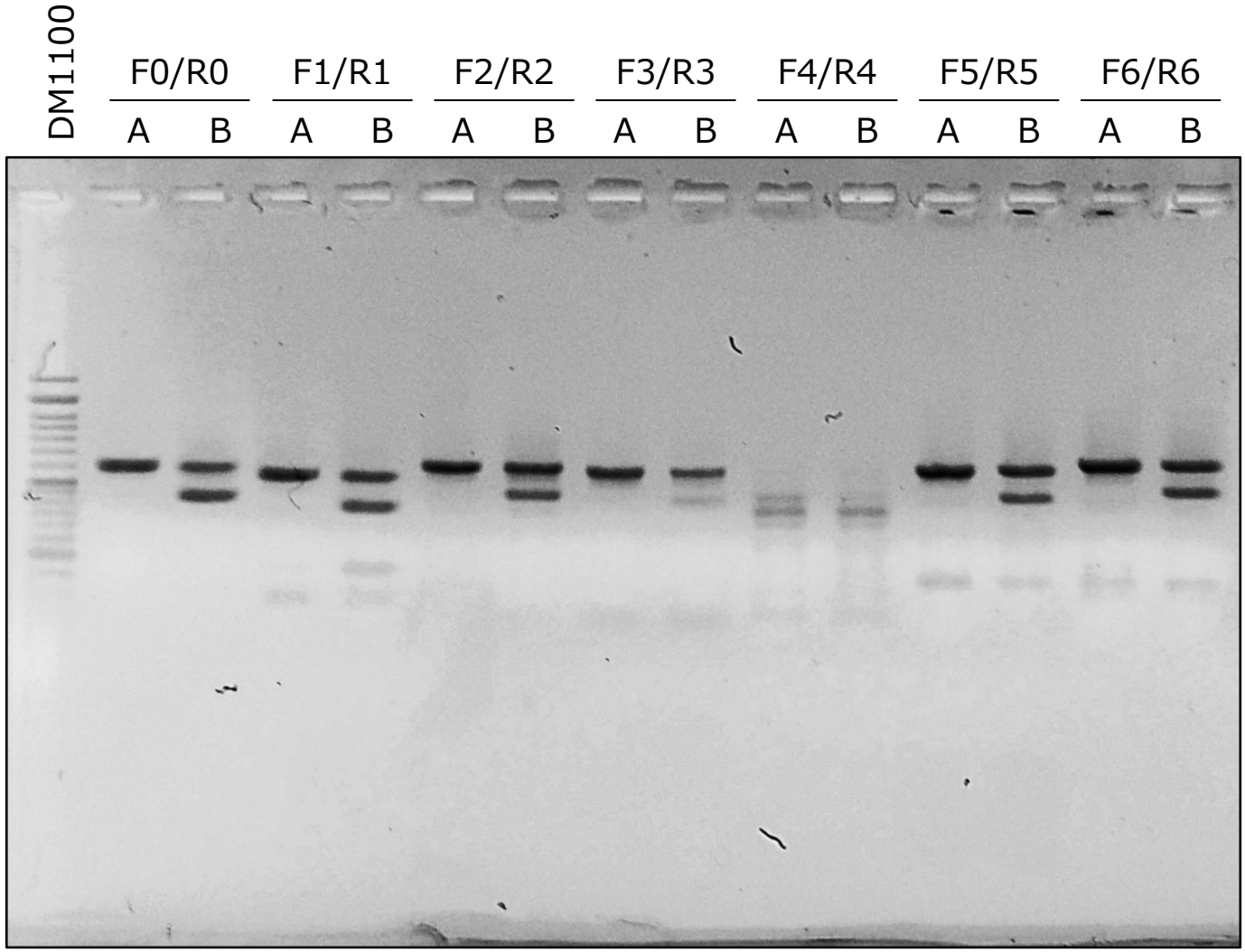
PCR産物の電気泳動結果（4班）



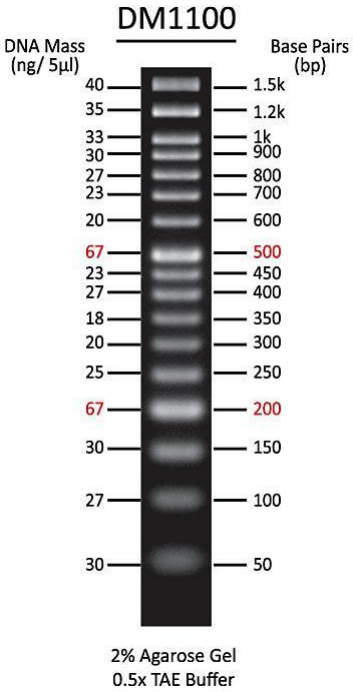


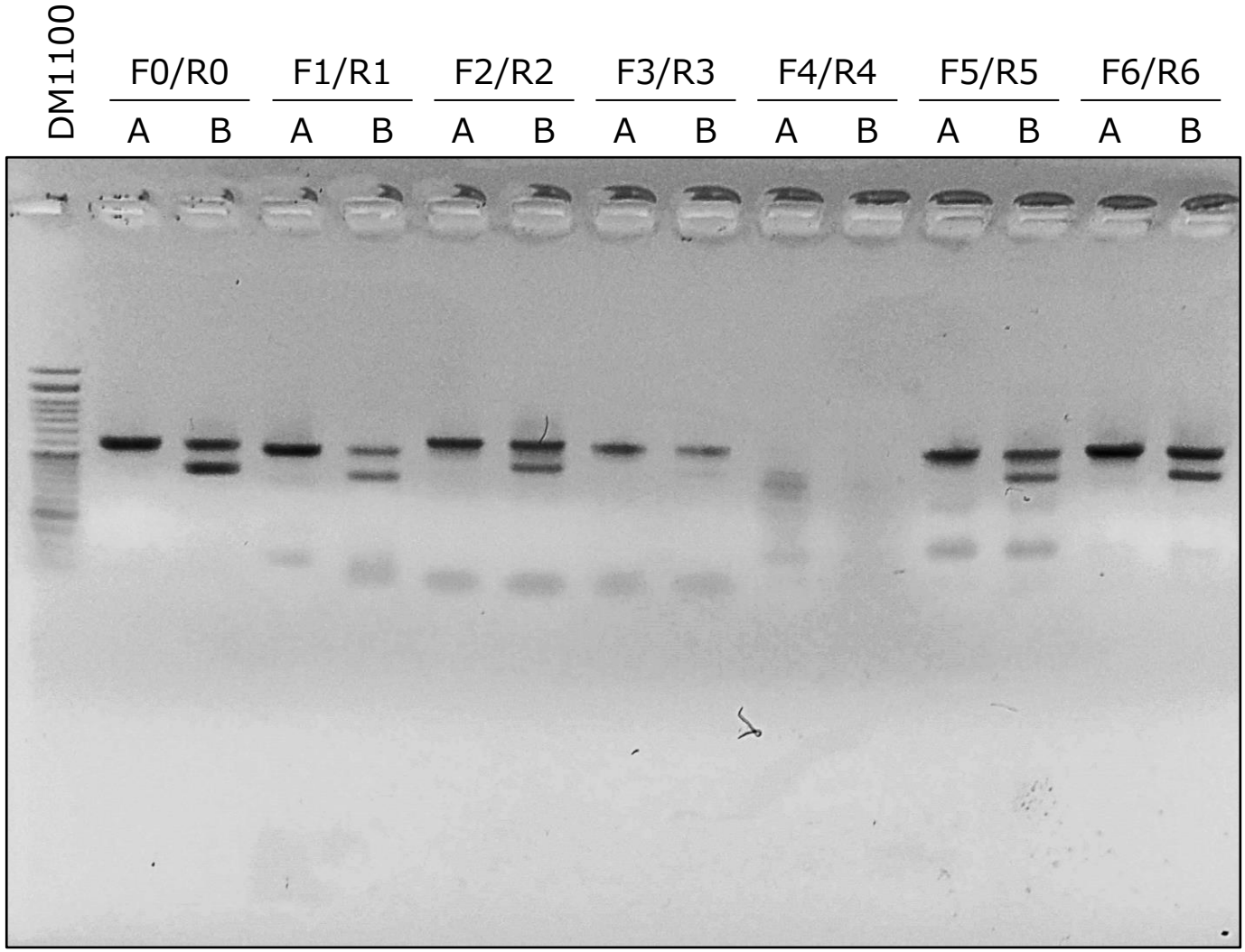
PCR産物の電気泳動結果（5班）





PCR産物の電気泳動結果（6班）





1. ImageJ による PCR 産物長の計測

1.1. 目的

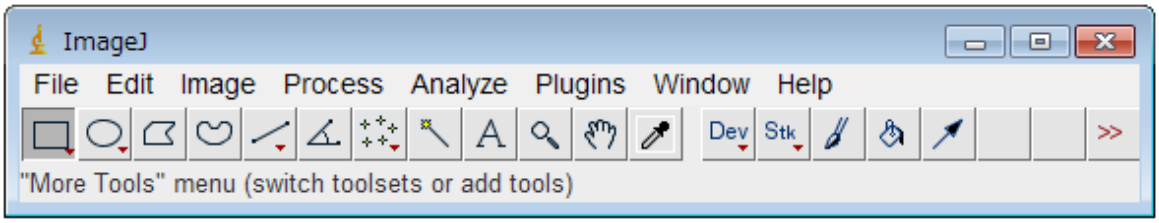
画像解析処理ソフト ImageJ を用い、アガロースゲル電気泳動した PCR 産物の長さを定量する。

1.2. 材料

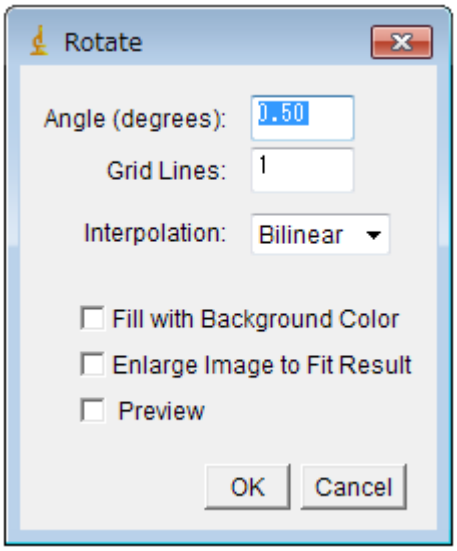
- アガロースゲル電気泳動像
- ImageJ ソフトウェア（https://imagej.nih.gov/ij/）

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。「Rotae」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。

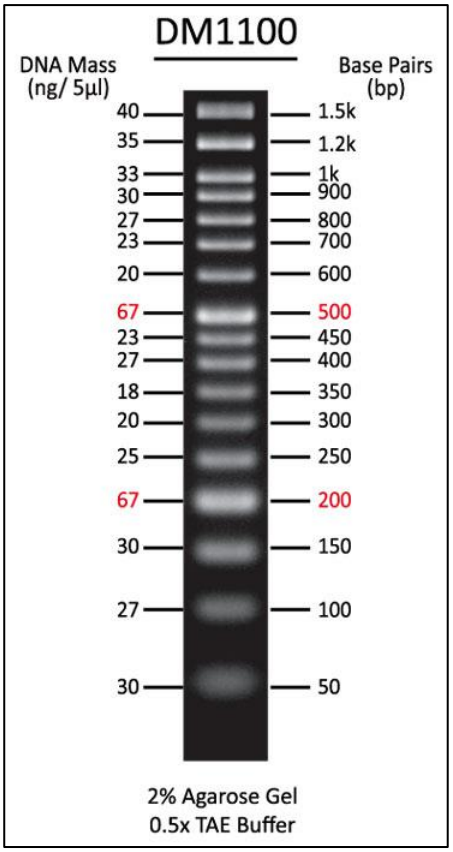


5. 加工した画像を別名で保存する。
   「File」→「Save As」→「TIFF...」を選択し、適当な名前を付けて保存する。

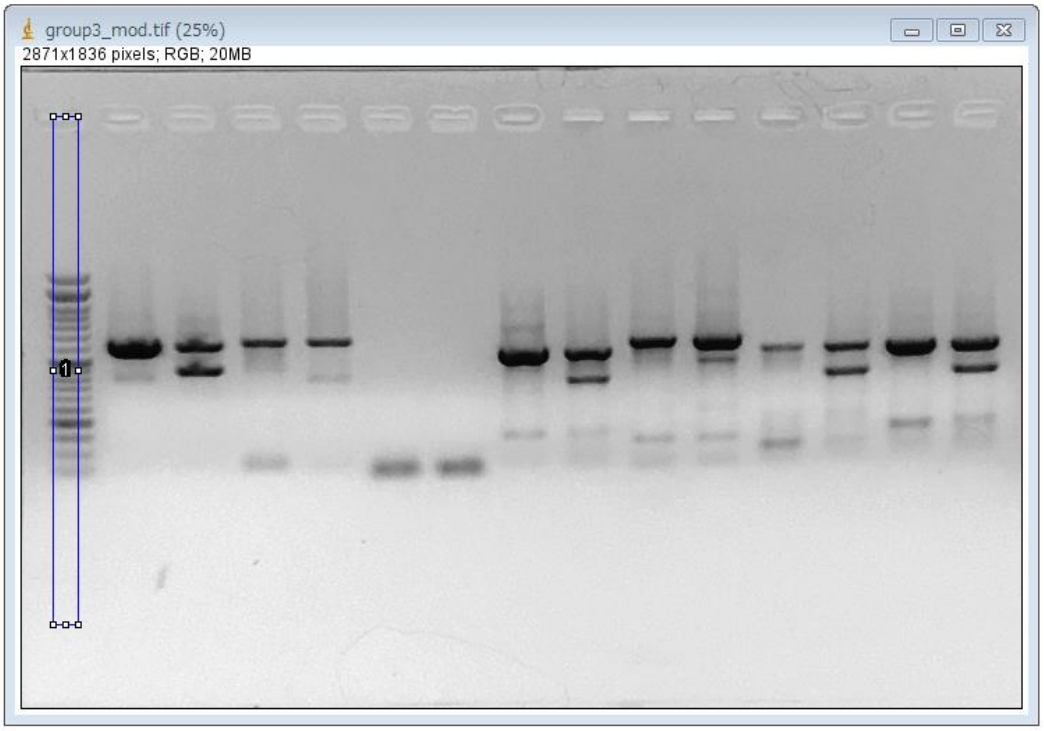
1.4. 検量線の作成

1. Excel を起動し、以下の表を作成する。

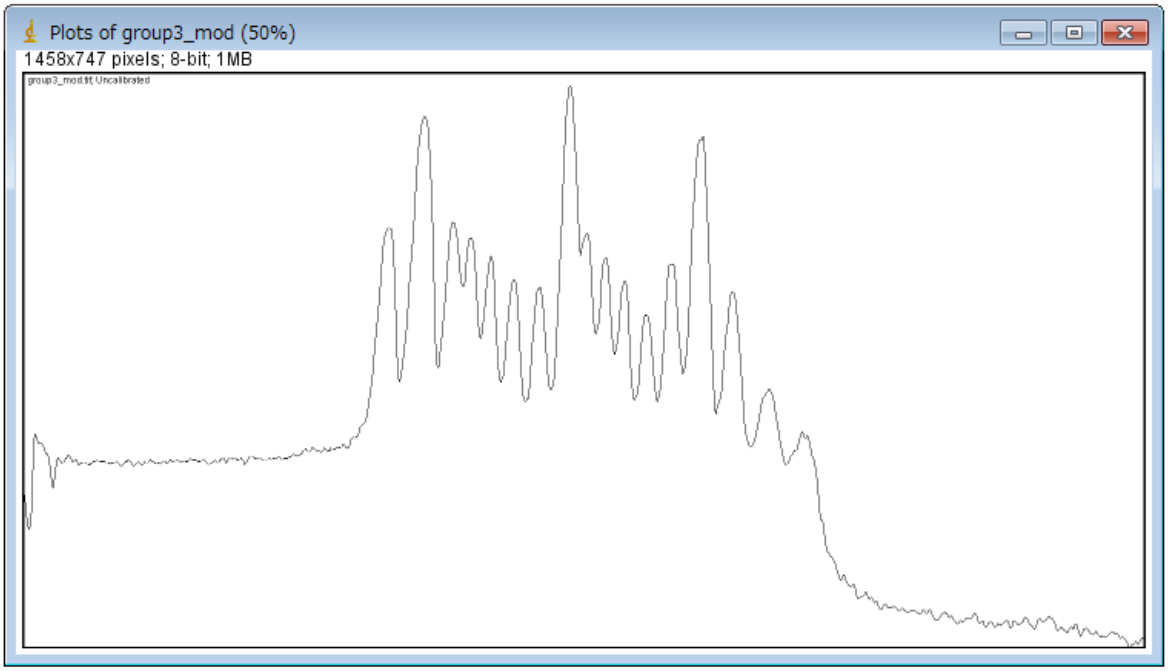
泳動距離	ラダー（bp）
	1500
	1200
	1000
	800
	700
	600
	500
	450
	400
	350
	300
	250
	200
	150
	100
	50



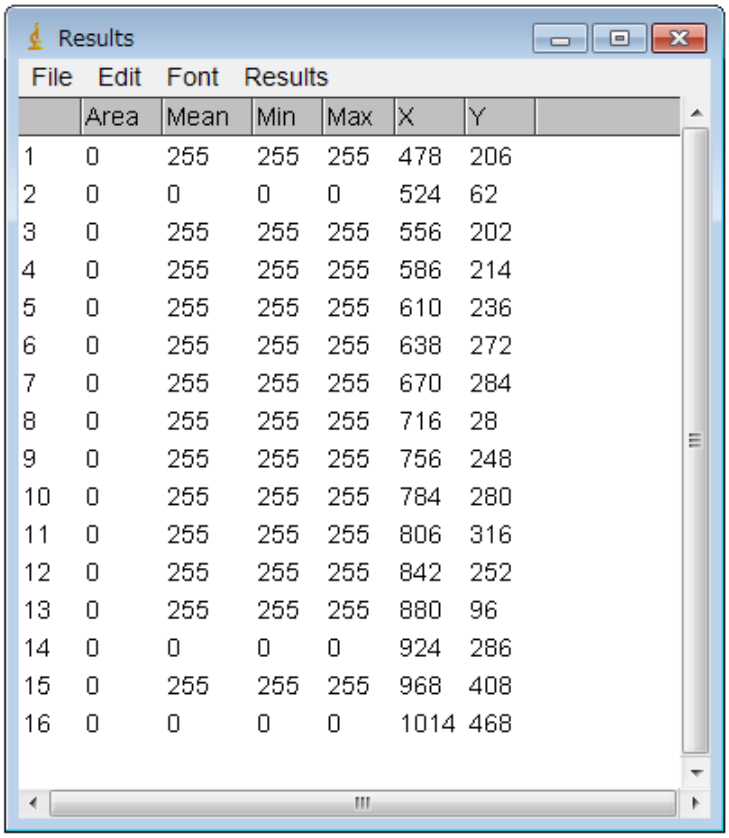
2. ImageJ に戻る。「File」の下にある四角のツールを選択する。
3. マーカーのレーンを四角で囲う。このとき、四角の上辺がウェル（泳動開始点）となるようにする。



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

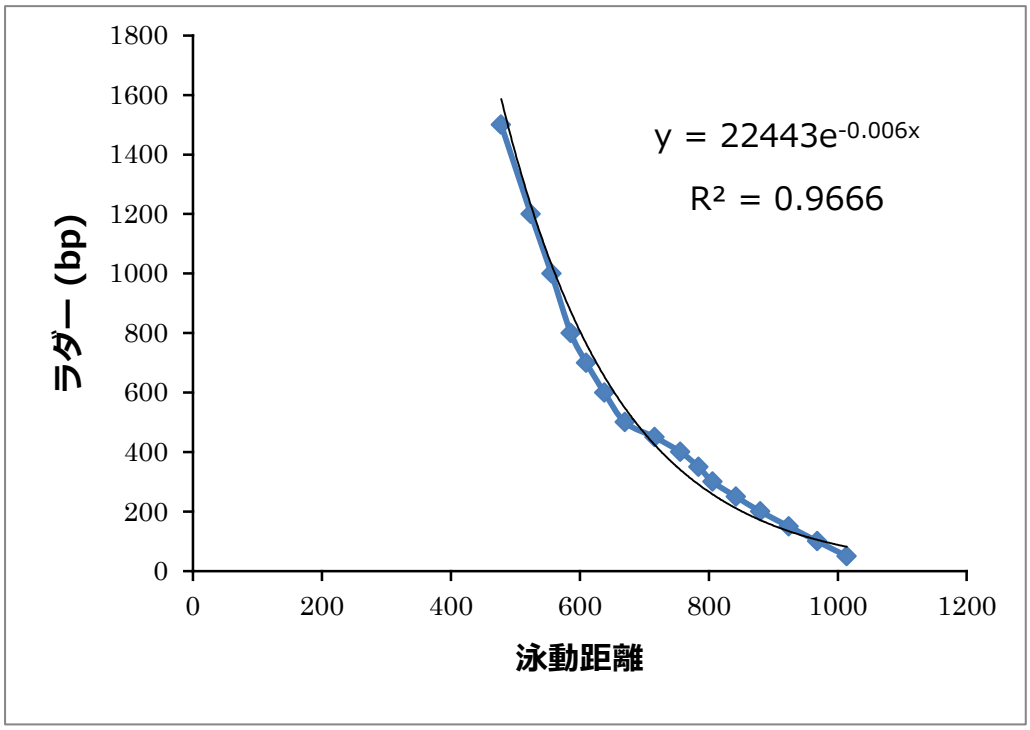


6. 「Process」の下にある丸いツールを選択する。
7. プロットのピーク（= ラダーのバンド）を選択する。16 個のピークがあるはずである。
8. ピークを選択し終わったら、「M」キーを押す。「Results」ウィンドウに計測結果が表示される。

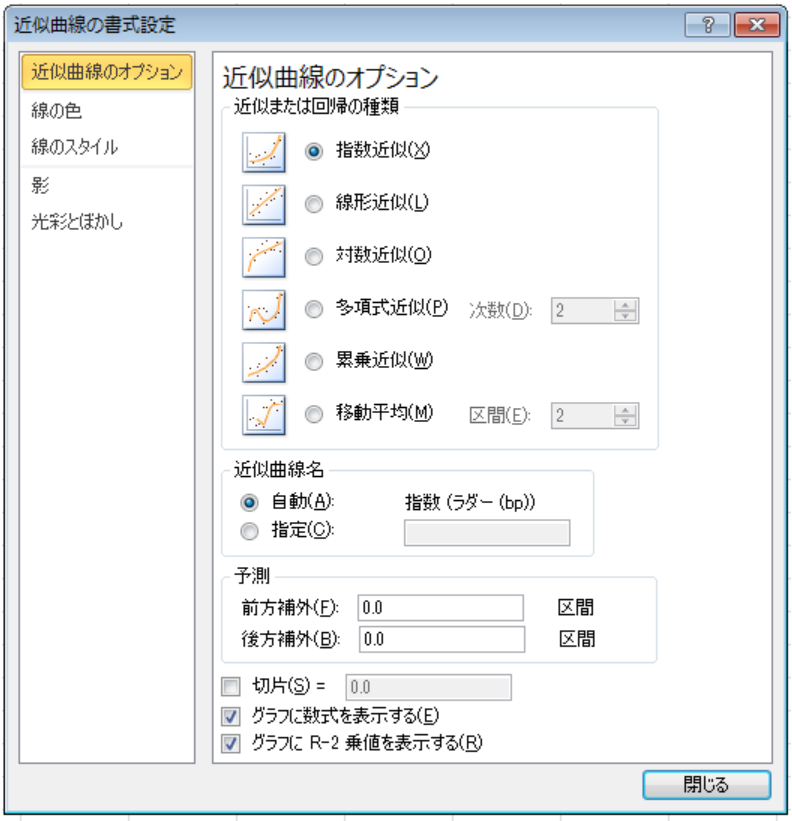


	Area	Mean	Min	Max	X	Y
1	0	255	255	255	478	206
2	0	0	0	0	524	62
3	0	255	255	255	556	202
4	0	255	255	255	586	214
5	0	255	255	255	610	236
6	0	255	255	255	638	272
7	0	255	255	255	670	284
8	0	255	255	255	716	28
9	0	255	255	255	756	248
10	0	255	255	255	784	280
11	0	255	255	255	806	316
12	0	255	255	255	842	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。**

1.5. PCR 産物の長さの計測

1. 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。
2. 各レーンの PCR 産物の長さを計測し、下の表を完成させなさい。**（レポート課題）**

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	578		410	
F2/R2	657		489	
F3/R3	640		472	
F4/R4	644		476	
F5/R5	644		476	
F6/R6	670		502	

レポートについて

- **11 月 30 日（土）24:00** までに、実習について以下の項目をレポートにまとめ、Word もしくは PDF ファイルを高谷（**ttakaya@shinshu-u.ac.jp**）までメールで送ること。
- ファイル名は**「18A2099X 信州太郎」**とする。
- **期限を超過して提出されたレポートは受理しません。**

1. 目的

実験の目的を記述しなさい。また、以下の課題についての回答・考察を盛り込むこと。

- ウズラの Z 染色体と W 染色体で、CHD1 遺伝子の exon 16, 17 の配列（長さ）が等しく、intron 16 の配列（長さ）が異なるのはなぜか？　考えられる理由を記述しなさい。

2. 材料と方法

以下の実習ごとに、材料・方法を記述しなさい。また、各実習で示された課題についての回答・考察を盛り込むこと。

- プライマーの設計
  - 自分が設計したプライマーの配列、長さ、GC 含有量、Tm 値、予想される Z および W 染色体の PCR 産物の長さを記述しなさい。
- PCR 反応
  - NaOH で溶出したウズラゲノム DNA 溶液を Tris-HCl で中和するのはなぜか？
  - PCR 反応液 Mix を作成する際、蒸留水→10×buf、dNTP、ExTaq の順番で加えるのはなぜか？
  - PCR 反応で Taq ポリメラーゼを使用するのはなぜか？
  - Taq が入っているチューブを氷上に置くのはなぜか？
- アガロースゲル電気泳動および写真撮影
  - EtBr によって DNA が検出できるのはなぜか？
  - EtBr が発がん性を示すのはなぜか？
- 画像解析

3. 結果

電気泳動像の写真を挿入し、実験結果を記述しなさい。模範実験のスライドを参考に、電気泳動像には、泳動した各サンプルについて、どのゲノム DNA（A or B）と、どのプライマー（F0/R0～F6R6）を使用したかがわかるように、キャプションを付けること。また、自分が PCR 反応・電気泳動を担当したプライマーに〇を付けるなどして明示しなさい。
また、画像解析により計測した PCR 産物の長さを記載しなさい。

4. 考察

以下の項目についての考察や、問題がある場合の改善方法を記述しなさい。
それぞれの理由や原因が、複数考えられる場合は、複数記述しても良い。

【全員共通】

- ゲノム A と B の、どちらが雄でどちらが雌か。その判断理由は何か？
- 200 bp 付近に見られる、ぼんやりとした短いバンドは何か？　なぜそのようなバンドが出現するのか？
- プライマーF4/R4 でバンドが得られなかった理由は何か？

【各班】

- 各班において、模範実験の結果と異なるサンプルについて、そのような結果になった原因を考察しなさい。
- 上記の問題・失敗を繰り返さないためにはどうすれば良いか、考察しなさい。

その他、実験結果について気付いた点、疑問に思った点、それらについて考えたことや調べたことを自由に記述しなさい。