

PCRによる特異DNA断片の増幅

- ① 自分のDNA抽出
- ② PCR法によるALDH2領域増幅
- ③ アガロースゲル電気泳動法
- ④ パッチテスト

① 自分のDNA抽出

PCR法とは？

ポリメラーゼ連鎖反応法

PCR (Polymerase Chain Reaction)

少量のDNAから、数時間で特定の
DNA断片領域を大量に増幅する技術

理論的には1分子あれば増幅が可能

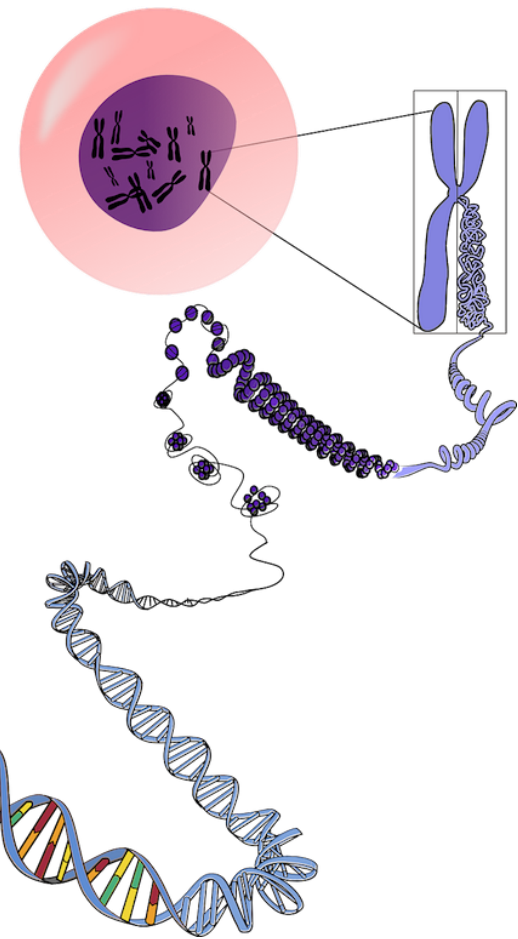
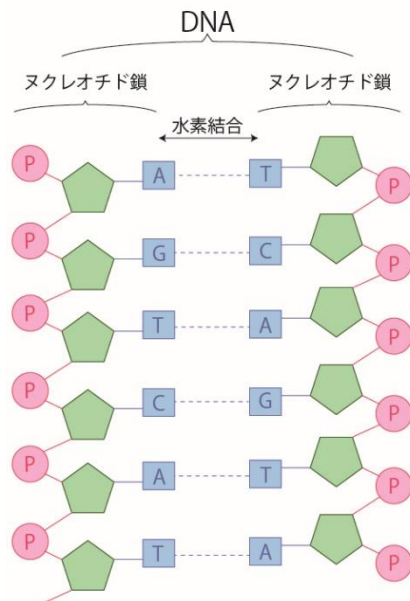
DNAとは？

デオキシリボ核酸(DNA)

デオキシリボース(糖)、リン酸、塩基からなるヌクレオチドが多数つながったもの

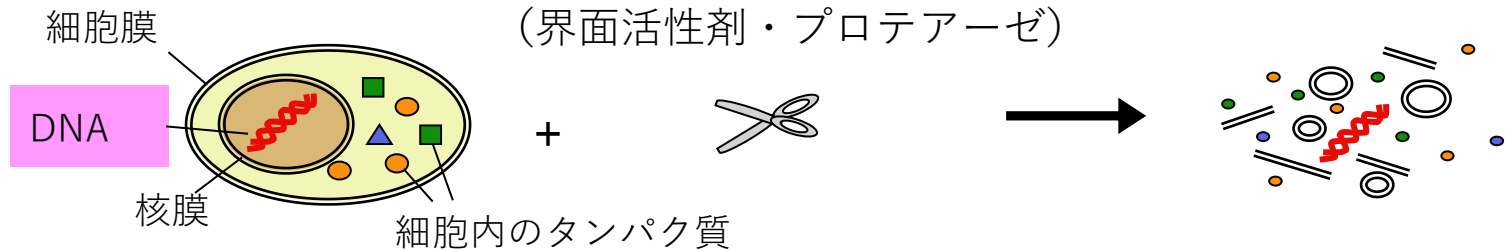
DNAと遺伝子

DNAの中で、遺伝情報を持った領域を「遺伝子」と呼ぶ

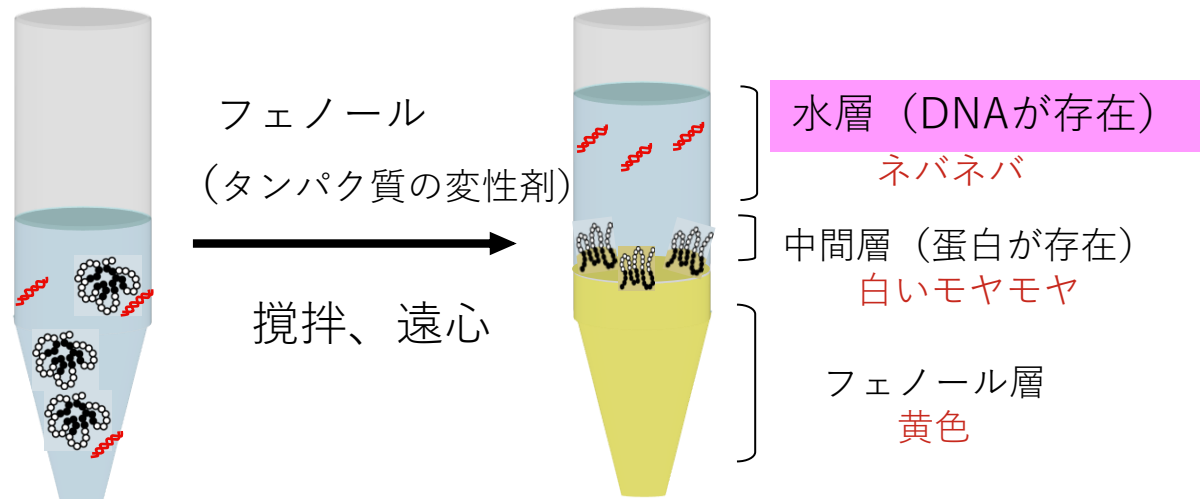


DNA抽出の3ステップ

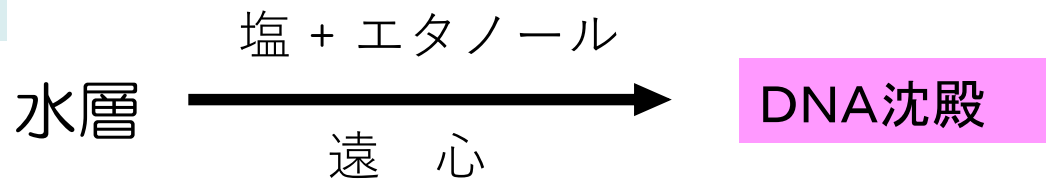
1: タンパク質の分解



2: 除タンパク



3: エタノール沈澱



自分のDNAを抽出してみる！

材料： 自分の髪の毛 2～3本

試薬： ISOHAIR Jr. (ニッポンジーン)

手順を配布資料で確認しながら行う

タンパク質の分解

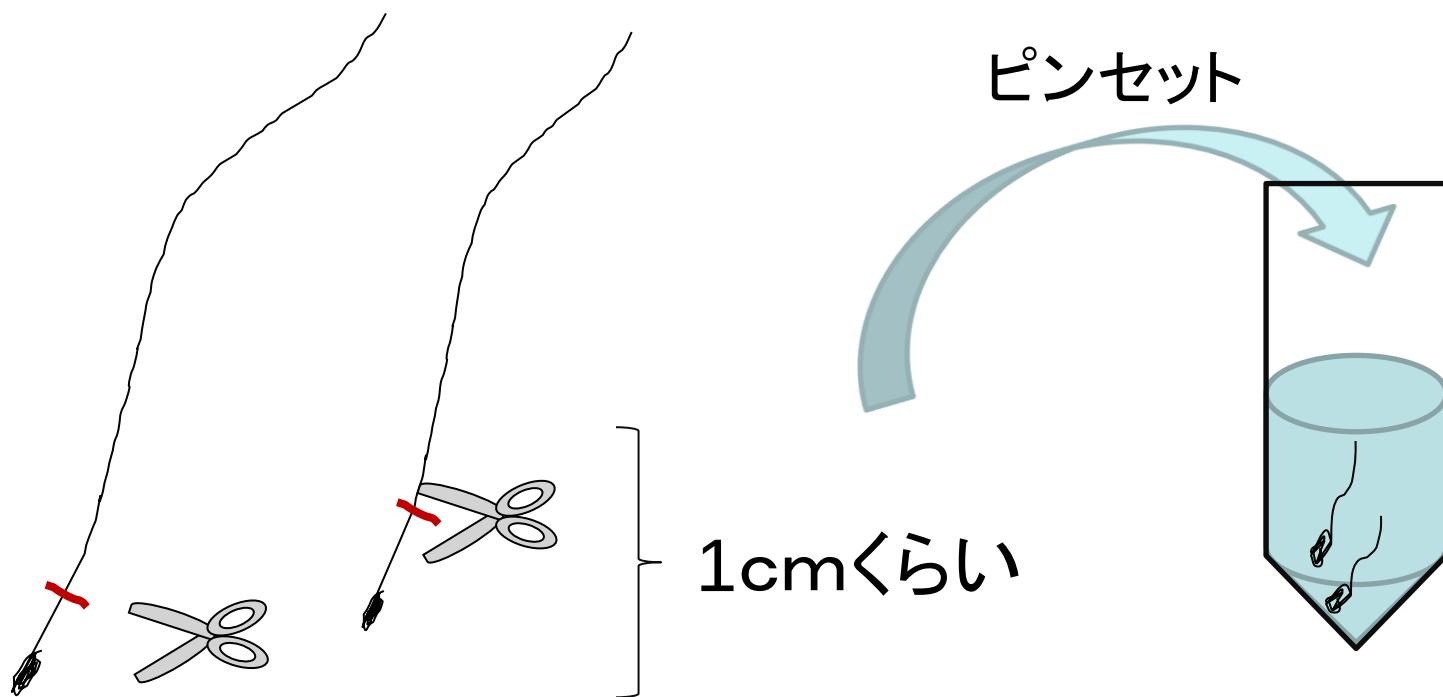
作業1) 1.5mlチューブのフタと側面に名前を書く

作業2) Extraction Buffer を 200 μl 入れる

タンパク質の分解

作業3) 毛髪を2～3本抜き、毛根に近いところだけ
切り取ってチューブに入れる

※ きちんと液に浸るように入れる！



タンパク質の分解

作業4) Enzyme Solution を 5 μl 加える

作業5) Lysis Solution を 8 μl 加える

作業6) チューブを指で弾いて混合
※ ボルテックスは使わない！

作業7) 55°Cのヒートブロックに20分
※ 数分に一度、タッピングする

作業8) Enzyme Solution を 5 μl 追加し、
55°C、10分
※ これで十分に試料が溶ける...はず

除タンパク

作業9) 手袋を装着後、
フェノール/ クロロホルムを 200 μl 加える



劇薬！絶対に手に付けないこと！

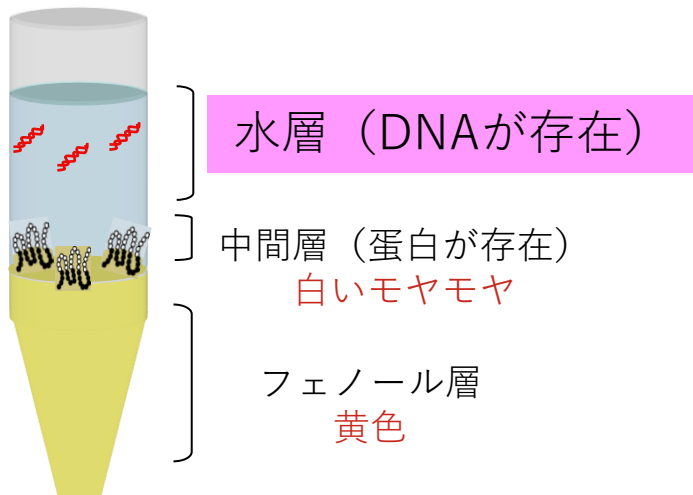
付いてしまったら、すぐに大量の水で洗う！

作業10) チューブのフタをしっかりと閉めて、
5分ほど転倒混和

作業11) 12000 rpm、5分遠心

エタノール沈殿

作業12) 水層を、新しい1.5 ml Tubeに移す



- ・2層に分かれていることを確認！
- ・中間層はピペットマンで吸わないように！
(吸ったらやり直し)

フェノールはこちらで回収します。

※チューブの蓋をきちんとしめておくこと！

エタノール沈殿

自分の量を
メモ！

作業13) 3M Sodium Acetate 15～20 μl を加える

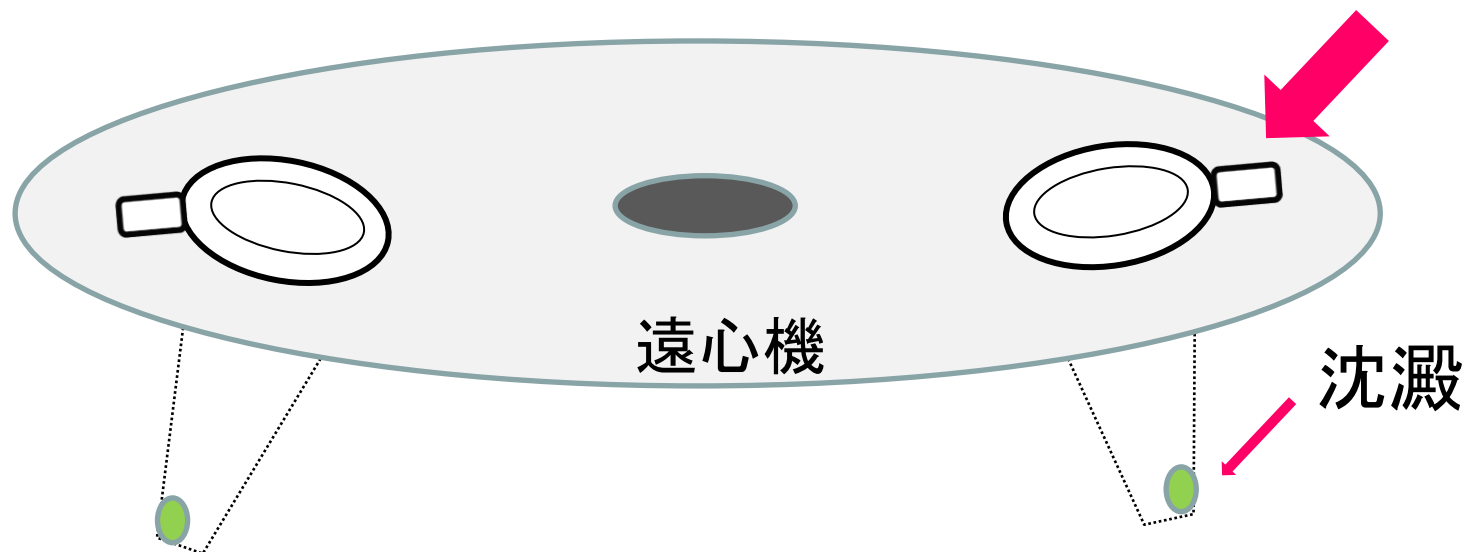
作業14) Ethachinmate 2 μl を加える
チューブを指ではじいて混合

作業15) 100%エタノール 400 μl を加え、
チューブを横に倒して揺らすように混ぜる

エタノール沈殿

作業16) 12000 rpm 15分遠心

※ チューブの耳を外に向けて入れる！



エタノール沈殿

作業17) 沈澱を確認！

沈澱を目視しながら、マイクロピペットでエタノールを除去する

※ 沈殿を吸ってしまった場合は、
遠心 5分やり直し

作業18) 70% エタノール 500 μl を加える

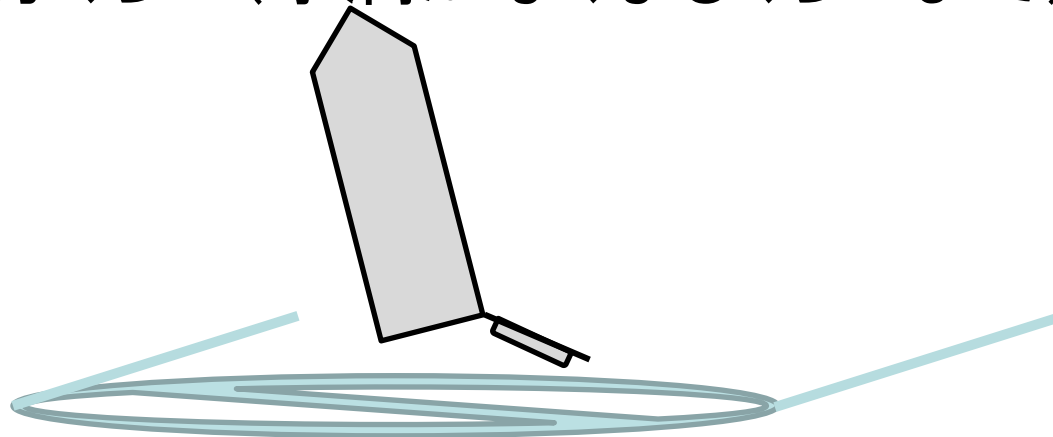
作業19) 12000 rpm、5 分 遠心機にかける

エタノール沈殿

作業20) 沈澱を目視しながら、マイクロピペットでエタノールを除去する

※ 沈殿を吸ってしまった場合は、
遠心5分やり直し

作業21) キムワイプの上に立てて、乾燥
～5分くらい(水滴がなくなるくらいまで)



作業22) TE 20 μ l を加え、沈澱を溶かす

※指でタッピングして溶かす

作業23) -20°C で保存

※チューブに自分の印を忘れず！

課題

(Google フォームにて解答可)

- ① Enzyme solutionの役割を説明してください
- ② ヒートブロックを55°Cに設定する理由を説明してください

② PCR

PCR法とは？

ポリメラーゼ連鎖反応法

PCR (Polymerase Chain Reaction)

少量のDNAから、数時間で特定の
DNA断片領域を大量に増幅する技術

理論的には1分子あれば増幅が可能

コピーの方法

DNAには同じ配列を探してそこに付くという能力がある
→PCR法はこのDNAの探索能力を利用

増やしたいDNAの前後と同じ配列を持つ人工合成したDNA(プライマー)をゲノムDNAと混ぜてやると、同じ配列を見つけてくっつく



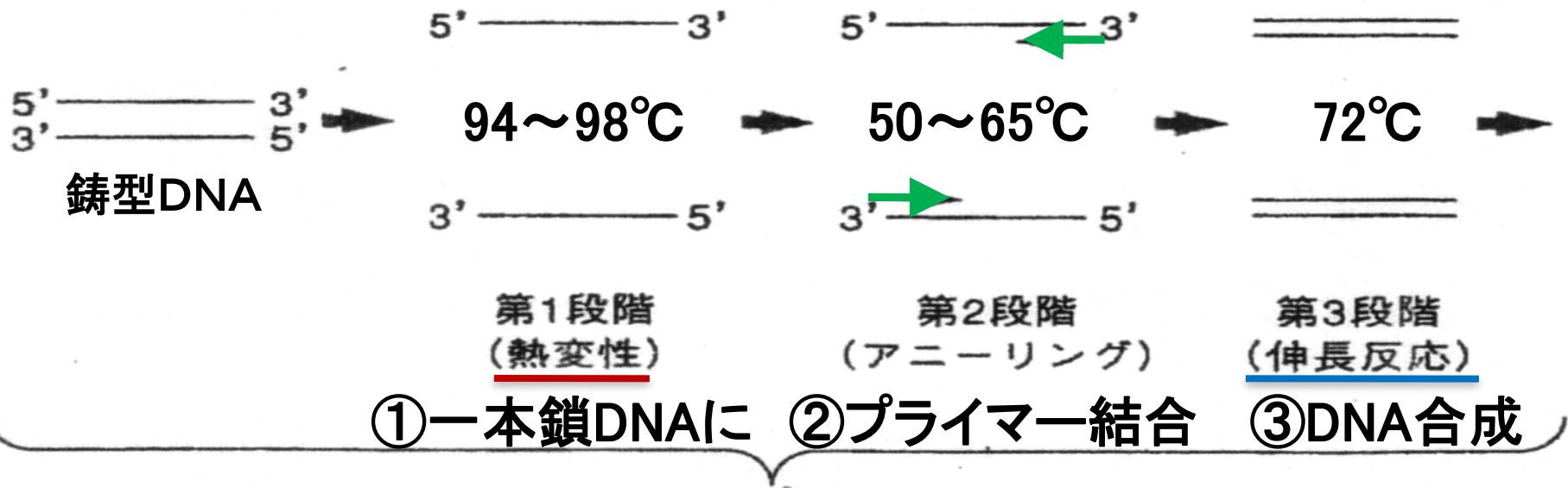
増やしたい領域

必要な試薬を混ぜ、温度を上げ下げすることで、
プライマーで挟まれた領域が急速に増幅される

PCR法の原理

3段階の温度変化の繰り返し

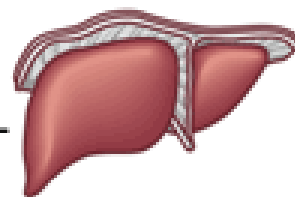
- 繰り返し
- ① DNAの解離 (高温で**熱変性**) 94～98℃
 - ② **プライマー**の結合 (相補的な配列) 50～65℃
 - ③ DNA合成 (**DNAポリメラーゼ**の働き) 72～74℃



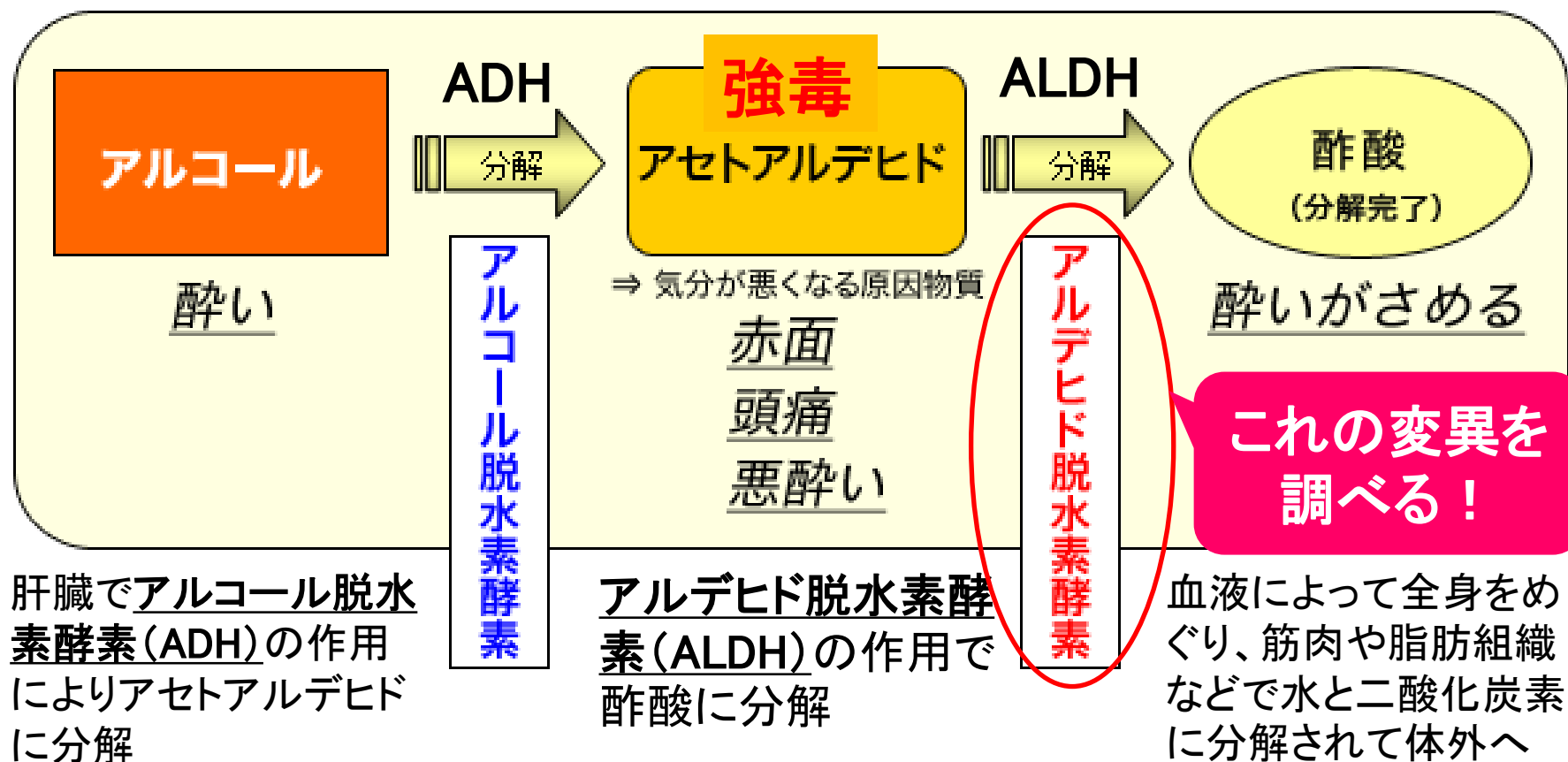
1サイクルで2倍に！

どの領域を増やすか ⇒ **ALDH2**

アルコールの吸収と代謝



アルコールは 主に肝臓で 2段階に分解されます。
「**アルコール脱水素酵素**」と「**アルデヒド脱水素酵素**」の2つが作用。



今回の実験では・・・

どのステップが
何度で何分というのは
実験の大切な条件！
レポートに必ず書く

98°C 3分 pre heat

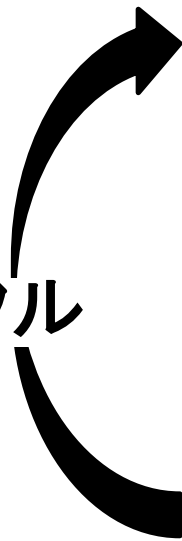


① 98°C 20秒
DNAを1本鎖に

② 60°C 20秒
プライマーを1本鎖にアニーリング

③ 72°C 45秒
DNAの伸長反応

40サイクル



72°C 5分 final extension

PCRをやってみる

試薬・材料

- ・PCR試薬
- ・自分のDNA 溶液
- ・プライマー 3種類 (F, RN, RM)

器具

- ・PCRチューブ 2本
- ・ピペットマン
- ・サーマルサイクラー

PCR

作業1) PCR反応液の組成を確認する

PCR反応液

ddH₂O

37.75 μl

10 $\times$ Gene Taq Universal Buffer

5 μl

dNTP Mixture (各 2.5 mM)

4 μl

フォワードプライマー (F, 10 pmol / μl)

1 μl

リバースプライマー (RN **or** RM, 10 pmol / μl)

1 μl

鋳型DNA (自分のDNA)

1 μl

Gene Taq NT

0.25 μl

total

50 μl

メモ!



PCR

作業2) チューブのフタに、リバープライマーの
区別(N or M)を書き込む

プライマーペア	チューブ①	F × RN (正常型)
	チューブ②	F × RM (変異型)

作業3) チューブの横に名前を書く
フタにイニシャルも書いておく

PCR

作業4) PCR液を作る (氷上！)

リバープライマー以外の液(×2の量)を、
チューブ①に入れてピペッティングする

PCR液	× 1	× 2
ddH ₂ O	37.75 µl	75.5 µl
10 × Buffer	5 µl	10 µl
dNTP Mixture	4 µl	8 µl
フォワードプライマー (F)	1 µl	2 µl
鋳型DNA	1 µl	2 µl
Gene Taq NT	0.25 µl	0.5 µl
		total 98 µl

PCR

作業5) PCR液 (98 μl) の半量をチューブ②へ移す

作業6) チューブ①、②にそれぞれRプライマーを
1 μl 入れ、ピペッティングする

チューブ①・・・RN(正常型)

チューブ②・・・RM(変異型)

作業7) 卓上遠心後、氷上で保管

作業8) サーマルサイクラーにセット & スタート

課題

(Google フォームにて解答可)

- ③ 溶解しているDNAは (+ or -) に帯電している
- ④ リバープライマーが2種類ある理由を説明してください

③ パッチテスト

手軽にALDH2の遺伝子型を知る方法

お酒を飲んだ時の症状

自分のこれまでの経験や、両親、兄弟姉妹の
飲酒時の症状から予想

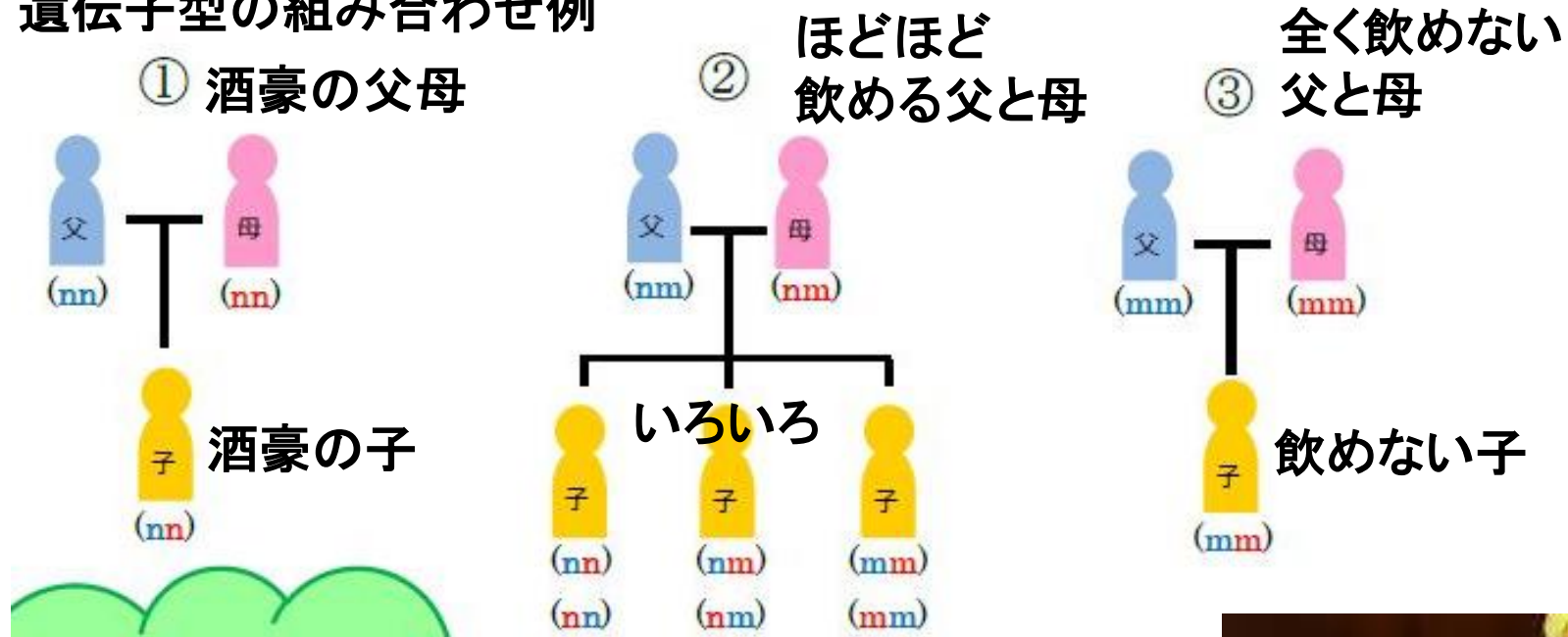
エタノールパッチテスト

エタノールを含んだ脱脂綿を皮膚にあて、皮膚の色の
変化からアセトアルデヒド分解の有無を判定

※ 皮膚の細胞と肝臓の細胞では、アルコールの代謝に関連している遺伝子群の発現が異なるため、パッチテストの結果が必ずしも肝臓におけるアルコール代謝の強弱を反映するとは限らない。
参考にはなるが、ALDH2の遺伝子型が正確に判定できるとは限らないことに注意。

お酒を飲んだ時の症状で予想

両親の飲酒時の症状から
遺伝子型の組み合わせ例



正常型 / 正常型 ... 酒豪！

相当の量を飲まないと、顔が赤くならない

正常型 / 変異型 ... ほどほどに飲める

コップ一杯程度のビールで顔が赤くなる

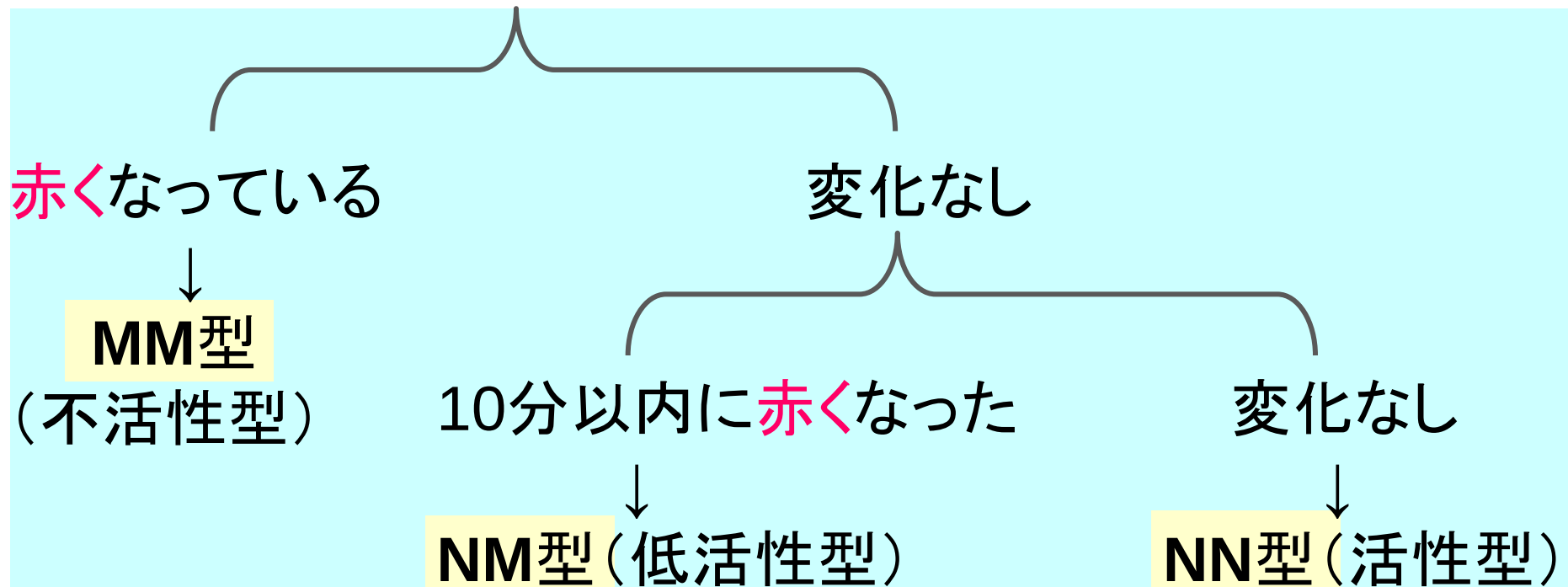
変異型 / 変異型 ... 飲めない



アルコールパッチテストをやってみる

アルコールにアレルギーのある人は、やらなくてよい

- ① 70%以上のアルコール(消毒液等)に浸した脱脂綿を、腕の内側に貼る
- ② 7分後、脱脂綿をはがす
- ③ 判定



課題

(Google フォームにて解答可)

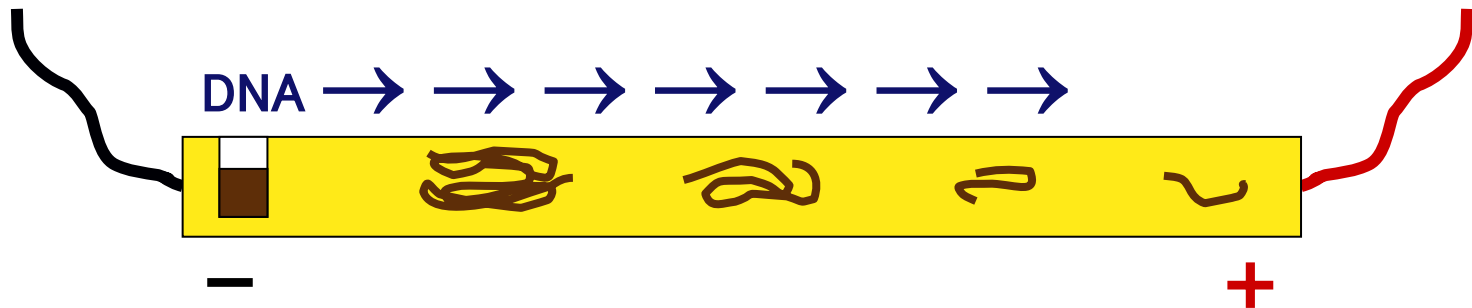
- ⑤ 自分の家族が、どれくらいお酒に強いかわ調べてみてください(任意)
- ⑥ アルコールパッチテストの原理を説明してください
- ⑦ アルコール消毒液等を使って、パッチテストを実行してください(できる人のみ)

④ アガロースゲル電気泳動法

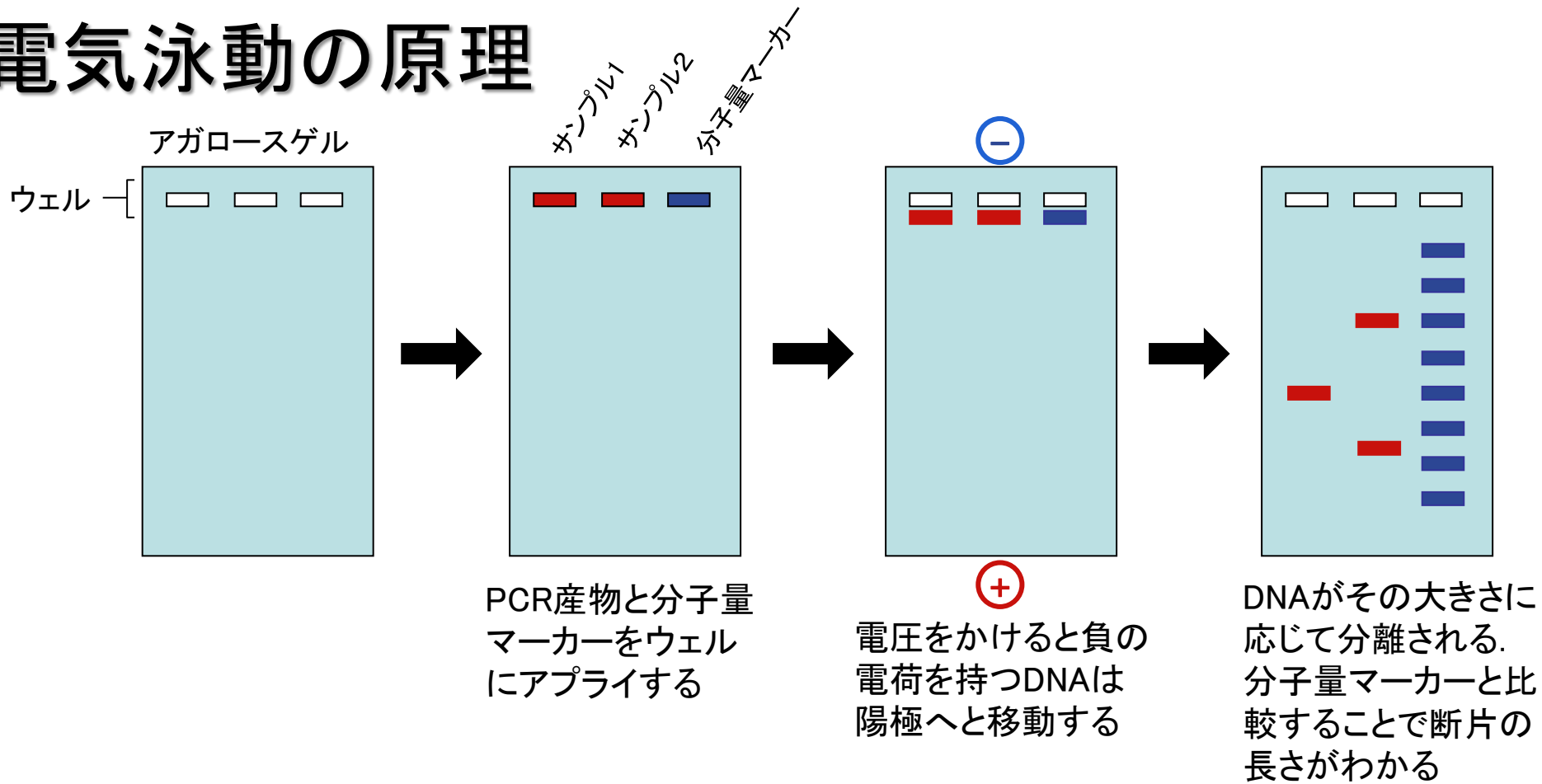
アガロースゲル電気泳動

寒天ゲル中で、DNAを電気によって移動させることで分子量に応じて分離する方法

- DNA はマイナスに帯電している
- 分子量の小さいDNAは大きなものより早く移動する(分子ふるい)



電気泳動の原理



**DNAサンプルにグリセロールを含む色素溶液
(ローディングバッファ)を加えてから泳動**

色素溶液

→ DNAは目に見えないので、泳動がどこまで進んでいるかの目安

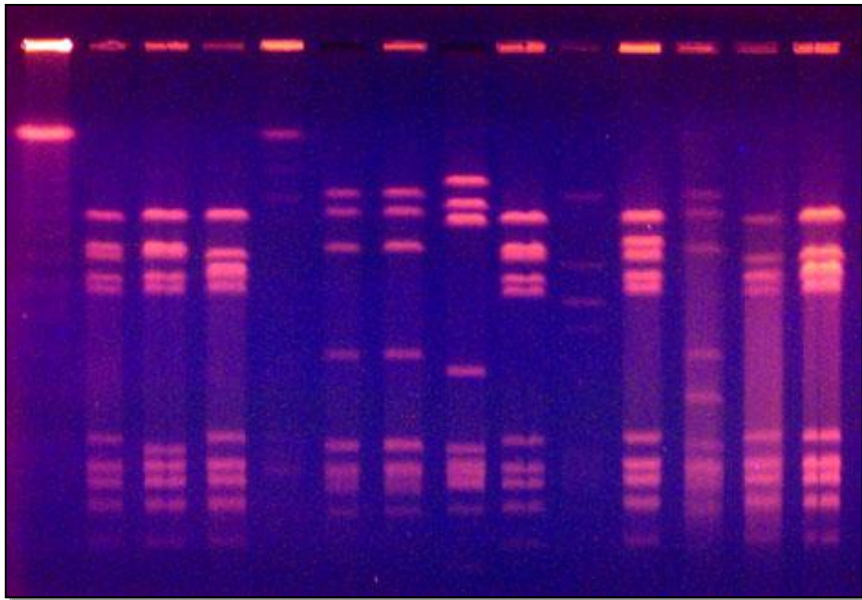
グリセロール

→ 比重を重くすることでサンプルが拡散せずにウェル内に沈む

撮影したDNAバンドの観察

EtBr(エチジウムブロマイド)は、分離したDNAバンドを視覚化する蛍光試薬

DNAの2本鎖の間に入り込み、紫外線をあてると発光する特徴をもっている



注意！

発がん性があるので、
扱う時は必ず手袋をすること！

アガロースゲル電気泳動を行う

PCR反応液(8 μ l)に

2 μ lのローディングバッファーを混合



10 μ lをゲルのウェルにロードする



サイズマーカー5 μ lをゲルにロードする



泳動(15分程度)



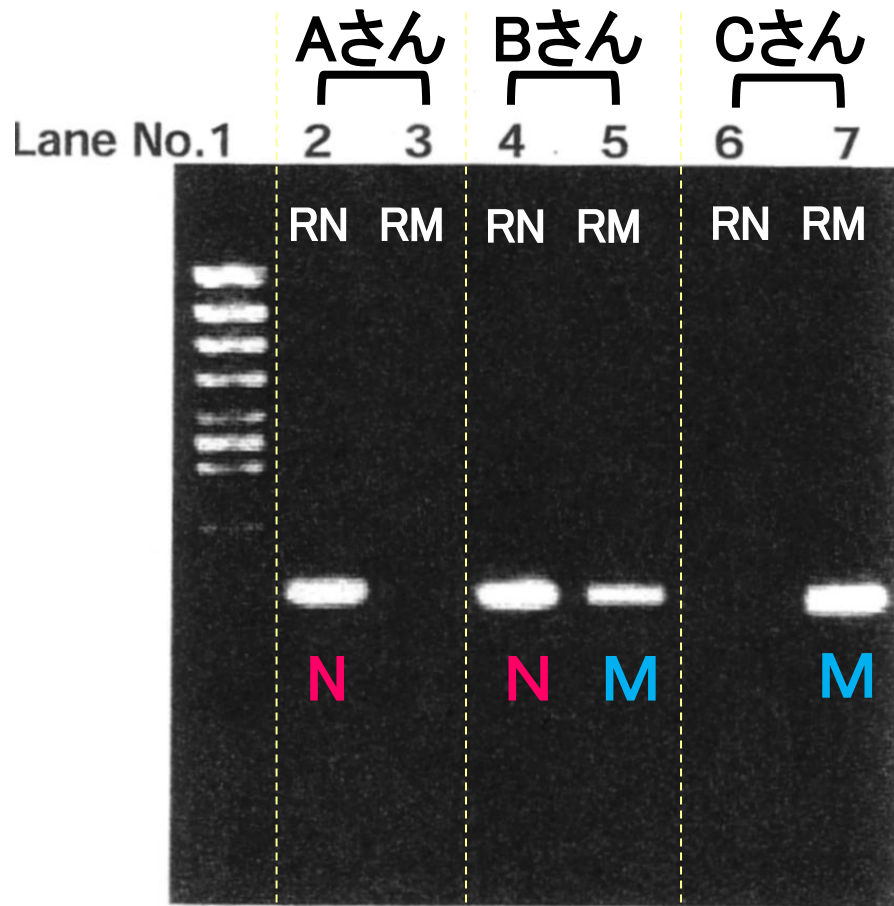
チェックする

どのウェルに、どのサンプルを入れたかメモ！

遺伝子型をチェックする

RNで増幅を確認 ⇒ 正常型

RMで増幅を確認 ⇒ 変異型



Aさん: RNのみバンドあり

NN型

Bさん: RN、RMともにバンドあり

NM型

Cさん: RMのみバンドあり

MM型

課題

(Google フォームにて解答可)

- ⑧ DNAサンプルにローディングバッファーを添加する理由を説明してください
- ⑨ 前スライドのゲル画像の結果、酒豪は誰か答えてください

課題(まとめ)

(Google フォームにて解答可)

- ⑩ 実験の目的を答えてください
- ⑪ 現在のPCRを可能にした、DNA Polymerase の特徴について説明してください
- ⑫ PCR法が開発されたことによって、どのような事が可能になったのかを調べ、具体的に記述してください

解答用Googleフォーム

■ URL

<https://docs.google.com/forms/d/1Rf9bMfwxCg97hdj5naV8JbnT6k43YabfgASSTifLuOc/>

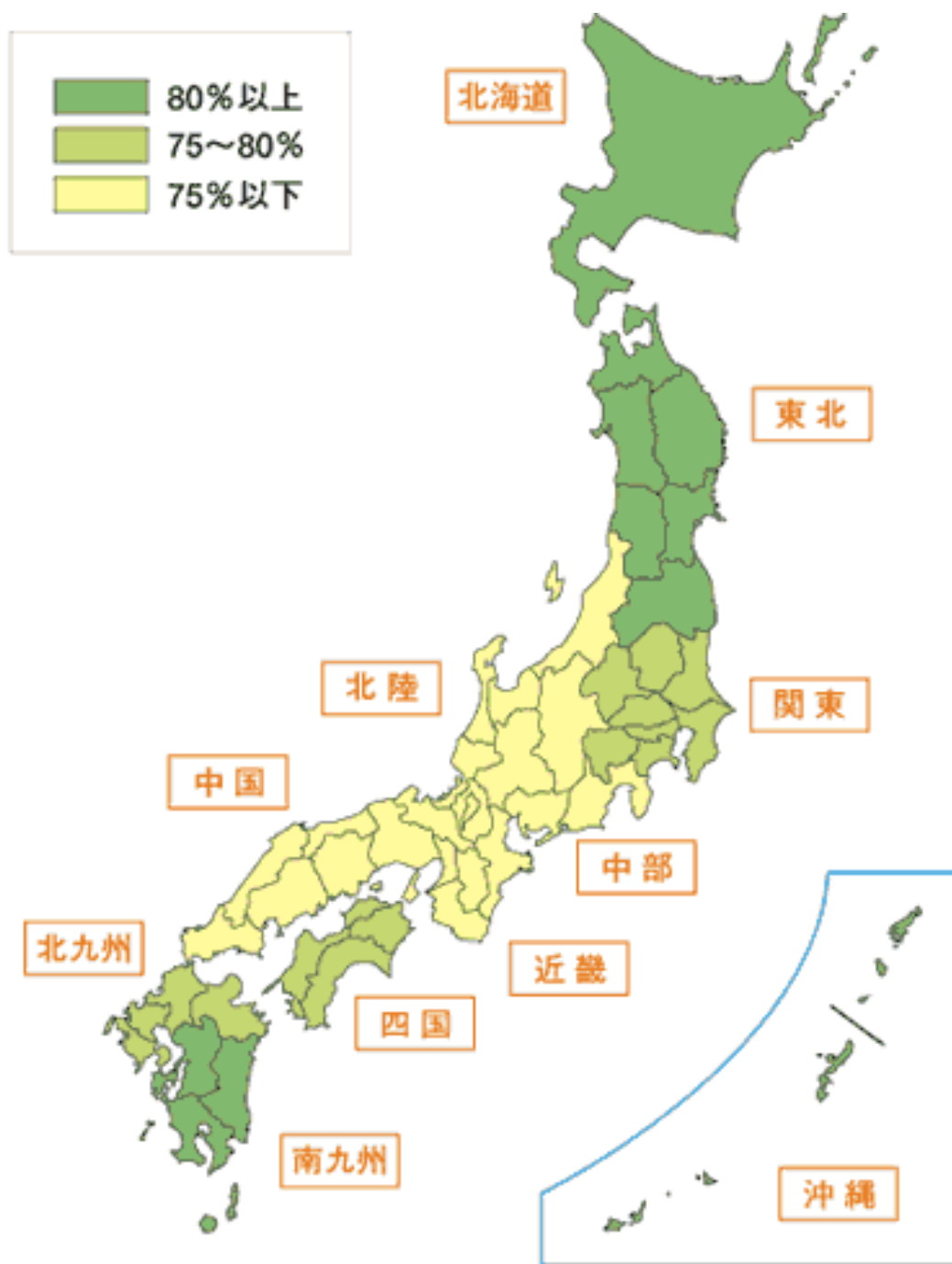
■ QRコード



おまけ

アルコールに強い人・弱い人の 人種別割合

	アルコールに 強い人・弱い人	備 考	人種別出現率		
			黒人	白人	モンゴロイド (日本人)
正常型 ホモ	「アルコールに強い人」 と言われている	アルコール依存症に ならないように要注意	100%	100%	56%
正常型と 変異型の ヘテロ	「アルコールに弱い人」又は 「ほどほどに飲める人」 と言われている	強くなろうと無理せず、 適量を守りましょう	0%	0%	40%
変異型 ホモ	「アルコールに全く弱い人」 と言われている	アルコールは飲めません	0%	0%	4%



日本では約半数の人でアセトアルデヒド分解能が弱いとされる

北海道、東北、九州、沖縄地方に活性型を持つ人の割合が多く、中部・近畿地方では低い

特に秋田県が一番多く、次に鹿児島県と岩手県、最も少ないのが三重県、次いで愛知県

図表1: 都道府県別に見たN型遺伝子(活性型)の頻度

おまけ

PCR法の応用例

生態系を解明するうえで画期的なツール 環境DNA解析

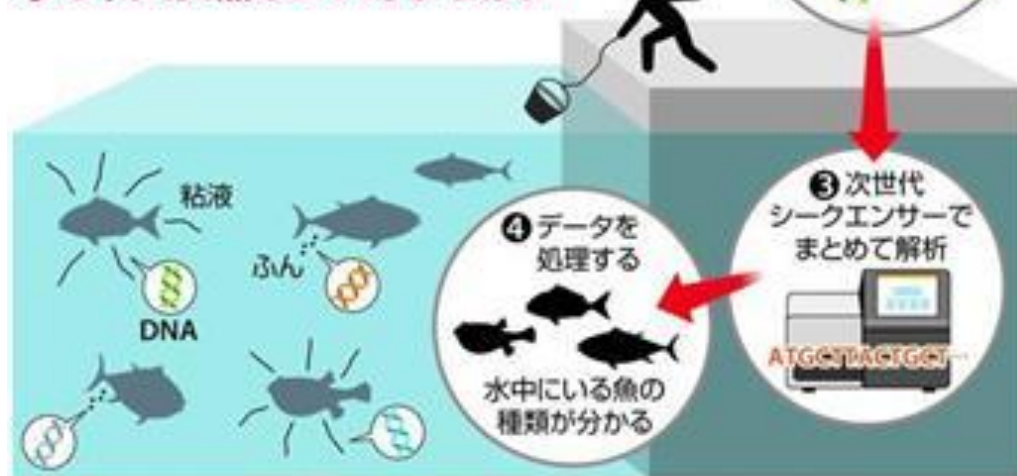
ヨーロッパの湖沼で採集した水試料から、外来種であるウシガエルの環境DNAをPCRにより検出したところ、実際の在・不在データと一致していたことが報告されたのがきっかけで広まる

現在では、PCR技術を応用して環境DNAの濃度を定量し、在・不在データだけでなく、個体数などの推定もなされるようになってきている

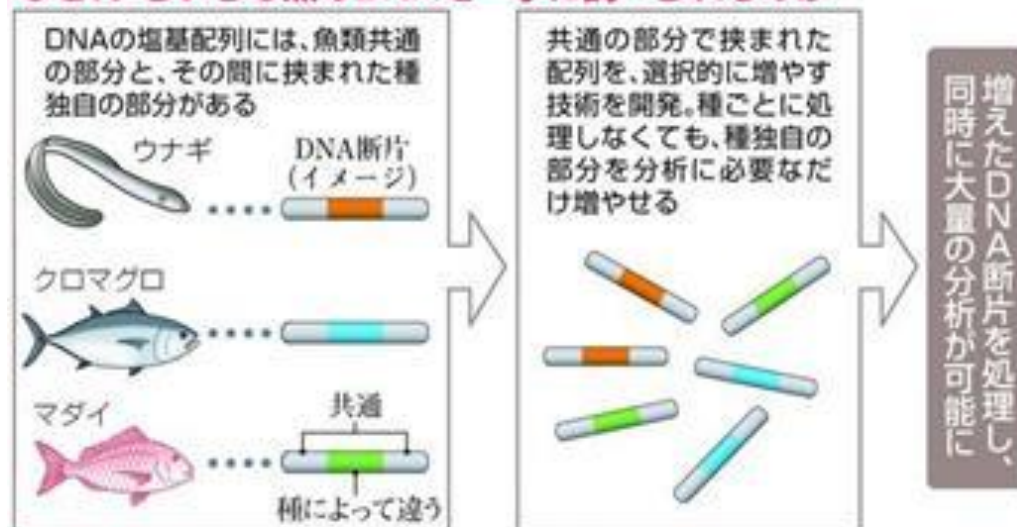
バケツ1杯の水で群集を調べる

- いろいろな場所の魚類調査に応用できる。未知の魚も見つかるかもしれない
- 費用、労力の少ない調査が可能に

水の中には、魚のDNAがいっぱい



なぜ、いろいろな魚のDNAを一挙に調べられるのか



従来の生物調査法

生物の捕獲や観察には

- 多くの労力と費用が必要
- 分類に専門的な知識が必要



広範囲・長期間の追跡が難しい

環境DNA調査

水には生物から分泌される粘液、皮膚片、ふん由来のDNAが多く漂っている

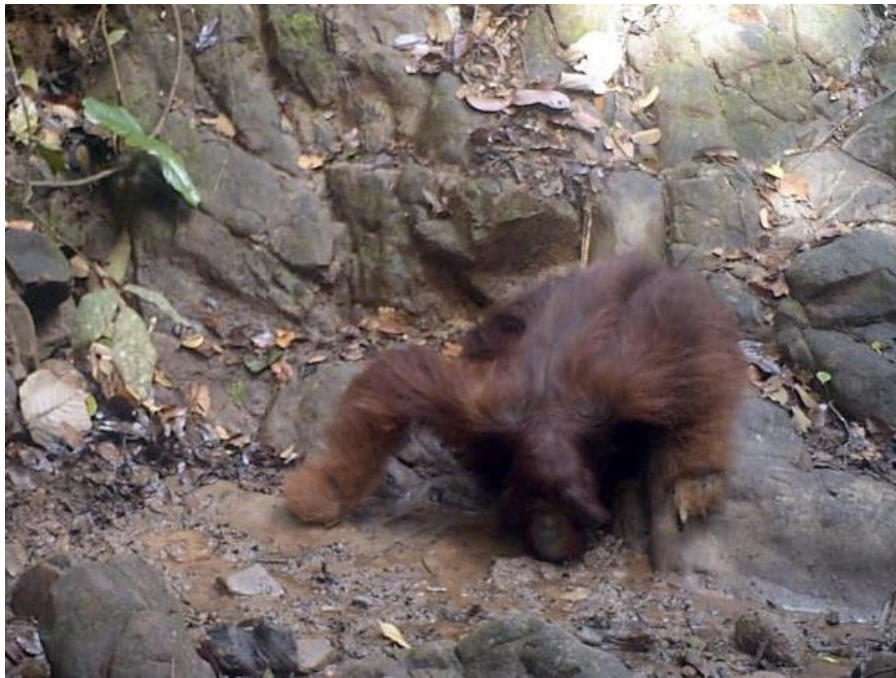
⇒バケツ1杯の水をくむだけで調査終了。これを解析して種を判別。専門的な分類の知識必要なし！1サンプル1000円程度で解析可！広範囲で長期的な追跡可！

広がる調査例，陸上生物調査にも！

哺乳類の生息調査には、自動撮影カメラの設置や野外観察に多大な労力と費用がかかる上、長期間にわたる調査が必要

お金かかるし、時間かかるし、めっちゃ大変

ボルネオの熱帯雨林の塩場の環境DNA解析例



塩場（動物がミネラルを補給するための水飲み場）の中に漂う**唾液や皮膚に含まれるDNA＝環境DNA**を解析

⇒オランウータンやアジアゾウなど
6 種類の絶滅危惧種の DNA を検出

**水を汲みにいく労力だけで
迅速、安価に調査可能**

- ・時間や費用の問題で難しかった哺乳類多様性のモニタリングが簡単にできる
- ・希少生物を傷つけず、調査が環境に与える影響や調査する人の危険も低減