

海洋生物科学技術論と実習 II

分子遺伝学的手法による海洋生物の種同定
プロトコル

海洋生物からのDNAの調製

1. 採集した海洋生物()の組織を1片(約3 mm角)を切り取り, マイクロチューブに入れる.
2. 組織片にDNA抽出バッファー TNE (400 μ l)をチューブに加え, ハンドホモジェナイザーで磨碎.
3. 10% SDS (20 μ l)を加える.
4. 10 mg/ml Proteinase K (2 μ l)を加え, 上下反転して穏やかに混合する.
5. 55°C, 2-3 h インキュベートする【タンパク質の分解】.
6. Phenol/Chroloform (400 μ l)を加え, 乳濁化するまでボルテックスで混和【タンパク質の変性】 フェノールは劇薬なので取り扱い注意.
7. 10000 $\times g$, 5 minの遠心を行なう.
8. 2層に分離した上層(水層)を回収し, 新しいチューブに移す【タンパク質の除去】.
9. 6-8を繰り返す.

-
10. Chloroform (400 μ l)を加え、ボルテックスで混和.
 11. 10000 $\times g$, 5 min遠心分離.
 12. 2層に分離した上層(水層)を回収し、新しいチューブに移す **【フェノールの除去】**.
 13. 1/10量 (40 μ l) の3M酢酸ナトリウム, 2.5倍量の100%エタノール 1000 μ lを加え、ボルテックスで混和.
 14. 10000 $\times g$, 15 minの遠心分離を行ないDNAのペレットを得る**【DNAの回収】**.
 15. 上清を取り除き、沈殿に70%エタノールを1000 μ l加え、ボルテックス**【共沈した塩の除去】**.
 16. 10000 $\times g$, 5 min遠心分離.
 17. 上澄みを取り除き、沈殿に100%エタノールを100 μ l加え、洗浄
 18. 10000 $\times g$, 5 min遠心分離
 19. 上澄みをピペットマンでていねいに取り除き、42°Cで1分程度加熱しエタノールを蒸発させる。**【エタノールの除去】**
 20. 500 μ lのH₂Oに溶かす.

PCRによるDNAの増幅と、制限酵素処理による 断片長多型の解析 —PCRによる28SrDNAの増幅

1. PCRプレミックス溶液(プライマー, バッファー, DNAの基質となるdNTPs, 耐熱性DNAポリメラーゼ等) 19 μ lが入った200 μ lのチューブにDNA溶液を1 μ l入れる.
2. サーマルサイクラーで以下の条件でPCRを行なう.

95 °C, 0.5 min	:	DNAの変性
50 °C, 1 min	:	アニーリング
68°C, 1 min	:	伸長反応 30サイクル.

PCRによるDNAの増幅と、制限酵素処理による断片長多型の解析 —PCR産物の電気泳動

1. パラフィルム上で、PCR産物4 μ lとゲルローディングバッファー2 μ lを混和する.
2. 1%アガロースゲルのウェルに上記サンプル(6 μ l)とサイズマーカー(100 bpラダー:3 μ l)をアプライし、電気泳動を行う. ゲルにはエチジウムブロマイド(強い発癌性がある)が含まれているので手袋をつけて扱うこと.
3. BPBがゲルの1/2くらい流れたところで泳動を終了する.
4. トランスイルミネーターにサランラップを敷き、その上にゲルをのせてUVで照らし、泳動パターンを確認し写真撮影する. UVは直視しないこと.

PCRによるDNAの増幅と、制限酵素処理による断片長多型の解析— PCR産物の制限酵素(*Hae*III)処理

- 電気泳動で増幅が確認できたPCR産物16 μlに、HaeIII mixを4 μl(10×制限酵素のバッファー2 μlとHaeIII 2 μl)加える.
- HaeIIIの切断サイト
5'...GG CC...3'
3'...CC GG...5'
- 37°C, 1h, インキュベートする【酵素反応】.
- HaeIII分解産物の電気泳動.
- HaeIII分解産物のチューブにゲルローディングバッファー4 μlを加える.
- 3%アガロースゲルのウェルにサンプル(HaeIII分解産物24 μl), サイズマーカー(100 bpラダー:1 μl)をアプライし, 電気泳動を行う.
ゲルにはエチジウムブロマイド(強い発癌性がある)が含まれているので手袋をつけて扱うこと.
- BPBがゲルの1/2くらい流れたところで泳動を終了する.
- トランスイルミネーターにサランラップを敷き, その上にゲルをのせてUVで照らし, 泳動パターンを確認し写真撮影する. UVは直視しないこと.