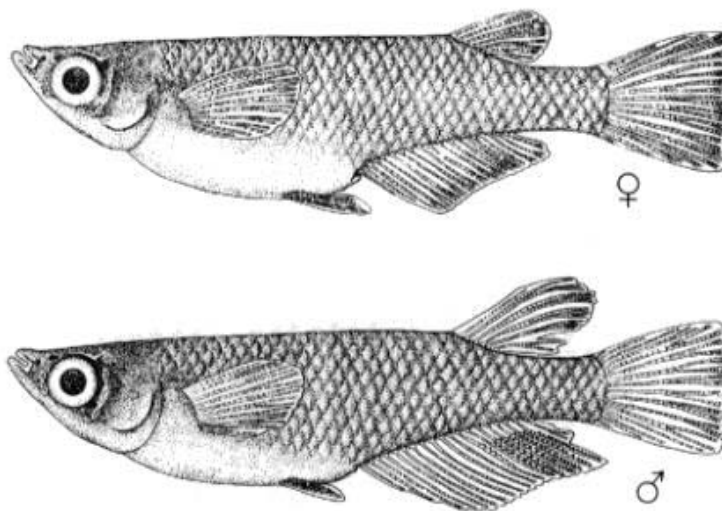


メダカの DNA 分析実験



メダカを用いた遺伝子分析実験の概要	1
メダカの DNA 分析実験 電気泳動までの流れ	2
実験 メダカの DNA 分析実験	4
実験操作と使用機器	9
アガロースゲルの作成	12
マイクロピペットの使い方 (速習編)	13
解説 遺伝子を取り扱う基本技術	14
参考資料 関連部分の DNA 塩基配列データ	16

2020

Ver.3.3 Nov.16

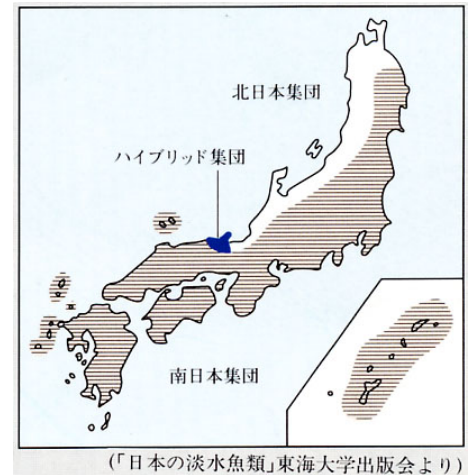
メダカを用いた遺伝子分析実験の概要

キタノメダカとミナミメダカ

メダカは研究者の間では MEDAKA として世界中で通じるモデル動物であり、生物学のいろいろな分野で活用されてきた。日本に生息するメダカは、19 世紀半ばにシーボルト(Philipp Franz Balthasar von Siebold 1796-1866 年)が海外に紹介して以来、*Oryzias latipes* の 1 種であるとされてきたが、1980 年代に酒泉満・新潟大学教授の分子遺伝学的研究によって、青森県から京都府の日本海側に分布する「北日本集団」と、それ以外の「南日本集団」に大別できることが分った。しかし、主に形態的特徴から種を区別するという分類学の立場から、両者を別種とするまでには至らなかった。

2011 年に近畿大学大学院農学研究科博士課程の朝井俊亘氏によって両者の形態的な特徴が調べられ、「北日本集団」が独立した新種キタノメダカ *Oryzias sakaizumii* となった。(新聞報道は 2012 年 6 月) この結果、「南日本集団」はミナミメダカ *Oryzias latipes* となった。

キタノメダカは、ミナミメダカと比べ、(1) オスの背ビレの切れ込みが小さい、(2) ウロコが網目状に黒っぽくなっている、(3) 体側後方に不規則な黒い斑点がある、などの特徴がある。

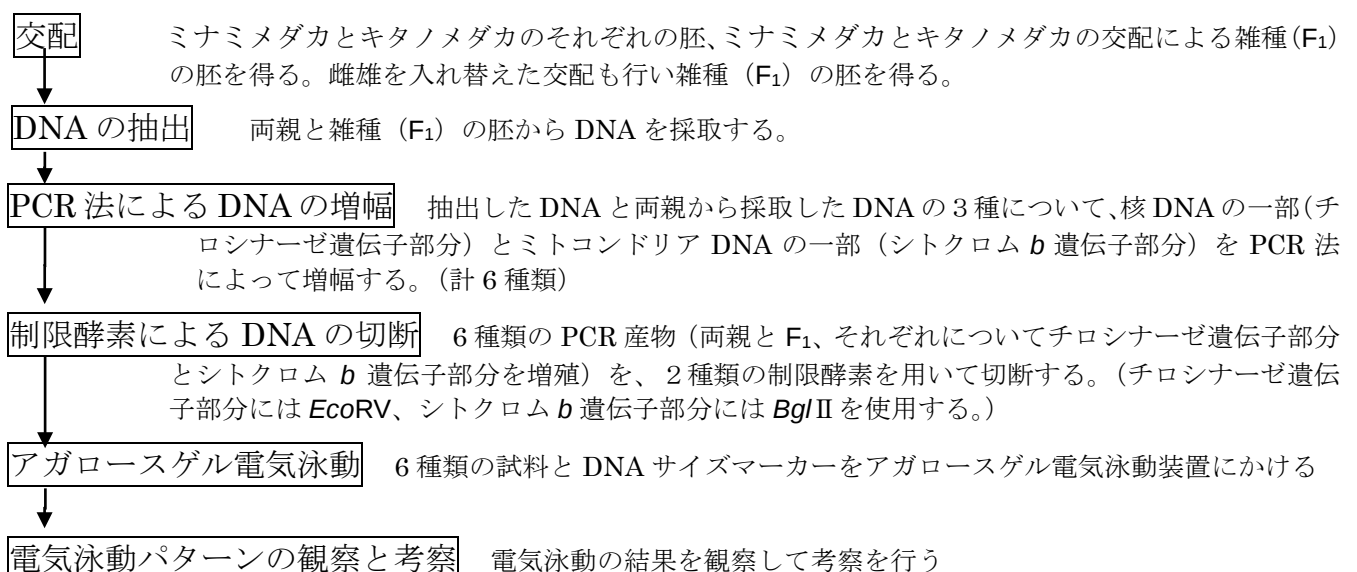


Oryzias latipes (左)と *Oryzias sakaizumii* (右)

Toshinobu Asai, Hiroshi Senou and Kazumi Hosoya (2011) *Oryzias sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, Vol. 22, No. 4, pp. 289-299.

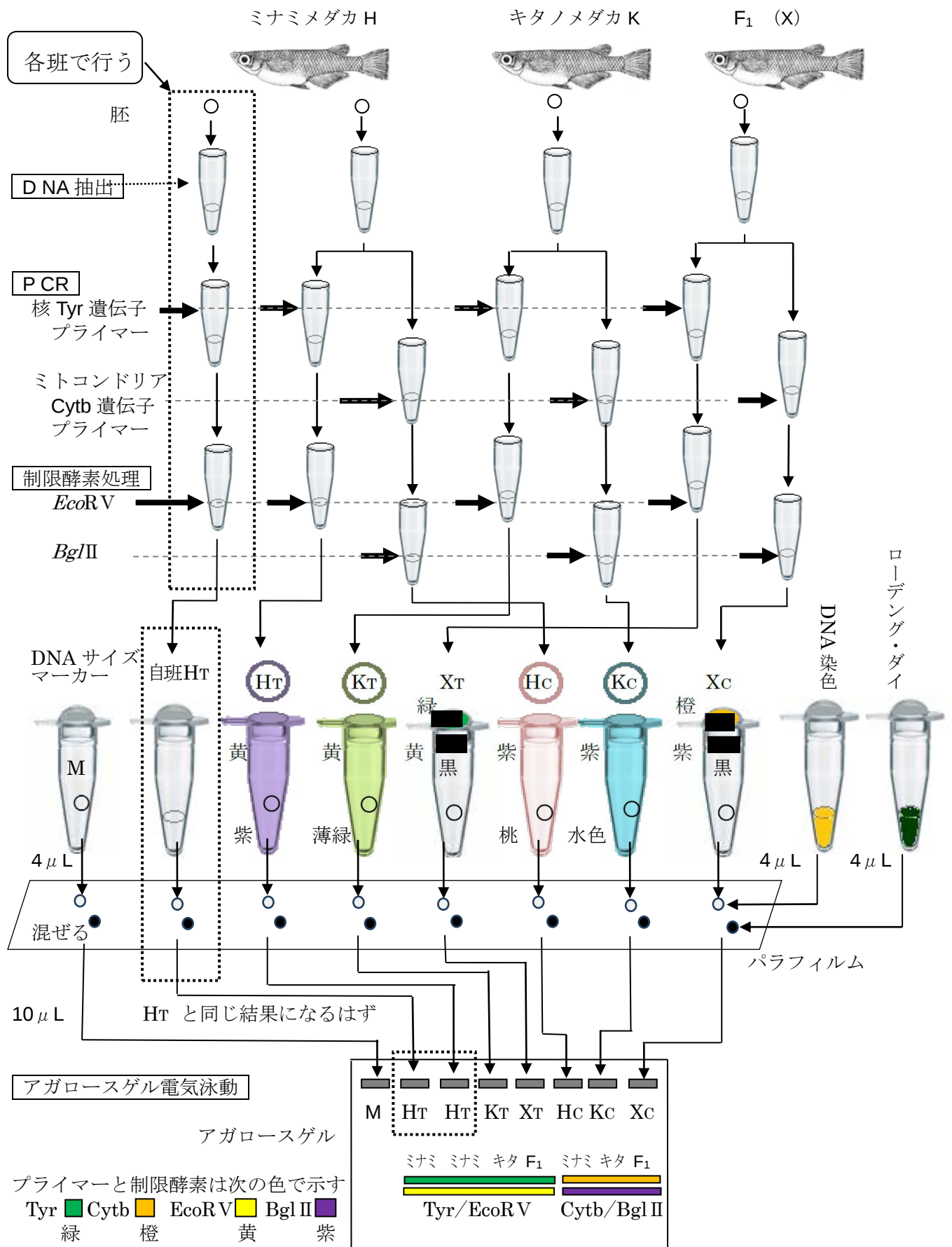
本実験の概要

ミナミメダカとキタノメダカでは DNA の塩基配列が異なっている部分がある。本実験はこれらの 2 種のメダカと雑種メダカ (♀ミナミメダカ×♂キタノメダカ または♀キタノメダカ×♂ミナミメダカ) の DNA を分析するものであり、DNA を扱う基本的な実験 (PCR 法、制限酵素、電気泳動など) を実際に行って、これらの実験方法についてより深く理解することができる。



メダカの DNA 分析実験

電気泳動までの流れ



実験

メダカを用いた遺伝子分析実験

I 胚からの DNA の抽出

メダカ胚から DNA を抽出する。(胚はすでにアルコールで固定されている)

器具と試薬等

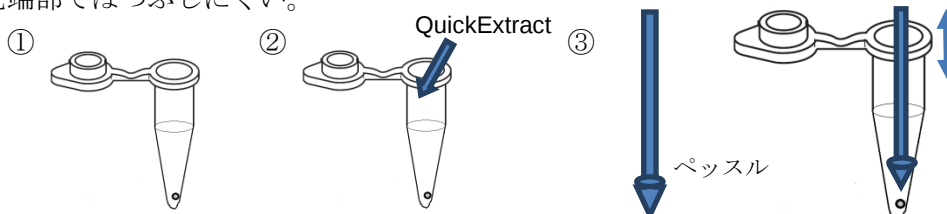
〔試料〕 ミナミメダカの胚が 1 個入ったマイクロチューブ (1.5mL),

〔試薬〕 QuickExtract DNA Extraction Solution (QE 0.2mL チューブに入っている)

〔器具など〕 抽出した DNA を入れる 0.2mL チューブ (キャップに赤色の印)、ペッスル, ボルテックスミキサー, ウォーターバス 65℃, ヒートブロック 98℃, フローター, マイクロピペット (20), ピペットチップ (チップケース), 微量遠心機, クラッシュアイス (氷とアルミブロック)

手順

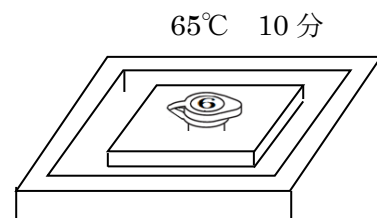
- ① メダカの固定済みの胚が 1 個ずつ入った 1.5mL マイクロチューブに班番号を書く。
- ② QuickExtract DNA Extraction Solution を 50 μ L 加える。
(抽出溶液の入った 0.2mL チューブをスピンドウンして溶液を下に集め、ピペットで全量を移す)
- ③ ペッスルで胚を十分につぶす。※実体顕微鏡でつぶされていることを確認すると良い。
※胚はペッスルでチューブの側面に押しつけてつぶすと良い。
先端部ではつぶしにくい。



- ④ 蓋をしてボルテックスミキサーで 15 秒間内容物を十分攪拌する。(蓋がしっかり閉まっていることを確認して、チューブの上部をしっかりと持ち、チューブの下部をミキサーの振動部分に押しつける。→ p.10)

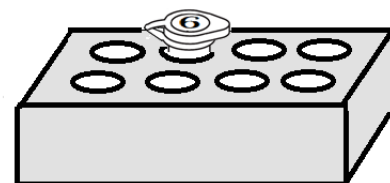
- ⑤ 小型遠心機にかけて、内容物をチューブの下部に集める。
(「スピンドウン」と言う → p.10)

- ⑥ チューブをフローターにさして 65℃のウォーターバスに浮かべ、10 分間保温する。



- ⑦ ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌して内容物をよく混ぜる。(方法は④参照) 攪拌後はスピンドウンする。

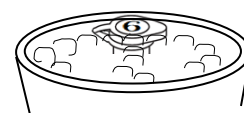
- ⑧ チューブをブロックヒーターのアルミブロックに入れ、98℃で 2 分間保温する。



- ⑨ ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌して内容物をよく混ぜる。攪拌後はスピンドウンする。

- ⑩ 98℃のブロックヒーターでさらに 2 分間保温する。

- ⑪ 氷上で温度を下げる。(クラッシュアイスの中に奥まで入れるか、氷上においてアルミブロックに入れる)



- ⑫ 15,000 回転で 2 分間遠心する。

※遠心機にセットするとき、チューブの蓋と本体の接続部分の突起を外側に揃えておくと、沈殿ができる位置が推定できるので、次の作業がしやすくなる。

- ⑬ 上清 (DNA が溶けている部分) をマイクロピペット (10 μ L にセット) で 10 μ L 量り取り、0.2mL チューブ (蓋が赤色の印) に入れる。この液を鋳型 DNA (ミナミメダカ) として次の PCR 法③で使用する。(遠心の結果、チューブの下部の側面に沈殿ができる。上清を取る時にチップの先端がこの部分に触れないように注意すること。沈殿に触れてしまったら、再度遠心する。)

II PCR 法による DNA の増幅

PCR 法によって DNA の特定の部分を増幅する。

器具と試薬

[試料] I で抽出したメダカの DNA (キャップに赤い印 0.2mL チューブ、10 μ L)

[試薬] PCR ミックス (KOD FX Neo Mix 無印の 0.2mL チューブ : PCR チューブ 16 μ L) ★, プライマー (核遺伝子チロシナーゼ遺伝子領域 F と R を混合したもの 蓋に緑の印のある 0.2mL チューブ 2 μ L プライマーの塩基配列は p.10 参照)

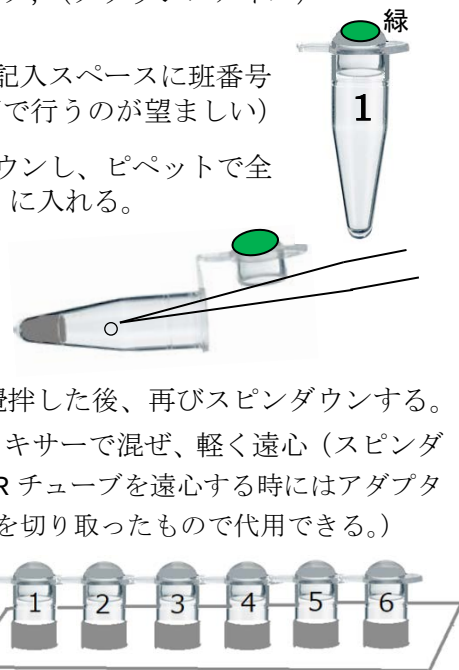
★ KOD FX Neo Mix には、DNAポリメラーゼ, PCR Buffer (pH 8.5), dNTP (ATCGのヌクレオチド), $MgCl_2$, などが入っている。

[器具など] サーマルサイクラー, 微量遠心機, ボルテックスミキサー, マイクロピペット 20, ピペットチップ (チップケース), 0.2mLPCR チューブラック, (クラッシュアイス)

手順

- ① 蓋が緑色の PCR チューブ (プライマーが 2 μ L 入っている) の記入スペースに班番号をマーカーで記入し、スピンドウンする。(以降、すべて氷冷下で行うのが望ましい)
- ② PCR ミックスの入っているチューブ (無印のもの) をスピンドウンし、ピペットで全量 (16 μ L) 取って、プライマーの入った PCR チューブ (緑印) に入れる。
- ③ I の⑬で抽出したミナミメダカ DNA (鋳型) を 2 μ L 入れる。微量なのでチップの先をチューブの内壁面につけて出して、DNA が確実にチューブに入ったことを確認するとよい (水玉ができる)。
- ④ チューブの蓋を閉めスピンドウンし、ボルテックスミキサーで攪拌した後、再びスピンドウンする。
- ⑤ 蓋がしっかりと閉まっていることを確認し、軽くボルテックスミキサーで混ぜ、軽く遠心 (スピンドウン) する。(小型遠心機が 1.5ml マイクロチューブ用の場合、PCR チューブを遠心する時にはアダプターを装着して遠心する。アダプターは 1.5ml マイクロチューブの蓋を切り取ったもので代用できる。)
- ⑥ サーマルサイクラーにセットする。(サンプルブロックに順番にしっかり押し込んで入れる。)
- ⑦ サーマルサイクラーに、次のプログラムをセットし、スタートさせる。終了するのに 75 分ほどかかる。途中で、サーマルサイクラーのディスプレイの部分を見ると、現在どの段階であるかが分かる。

94°C 2 分 $\rightarrow$ (98°C 10 秒, 64°C 30 秒, 68°C 30 秒) 25 回 $\rightarrow$ 68°C 3 分 $\rightarrow$ 4°C ∞



III 制限酵素による DNA の切断

増幅した PCR 産物を制限酵素によって分断する

器具と試薬

[試料] II で作成した PCR 産物 (無印の PCR チューブ 20 μ L 入っている)

[試薬] 制限酵素 *EcoRV* ミックス※ (黄色のマーク 0.2mL チューブ 8 μ L)

※*EcoRV* ミックスの成分 (20 μ L あたり) 10×H バッファー 4.0 μ L (NaCl の濃度が高い緩衝液)
EcoRV (制限酵素) 0.5 μ L 蒸留水 15.5 μ L

[全体] 37°C 恒温槽、小型遠心機 (スピンドウン用), ボルテックスミキサー

[各班] マイクロピペット (20), ピペットチップ, 0.2mLPCR チューブラック, チューブフロート

操作

- ① 制限酵素 (*EcoRV*) の入ったチューブ (黄色印) に、PCR 産物を 4 μ L 入れる。微量なのでチップの先をチューブの内壁面につけて出して、PCR 産物が確実にチューブに入ったことを確認するとよい。(水玉ができる)。
- ② チューブの蓋を閉め、スピンドウンする。
- ③ 蓋をしてボルテックスミキサーで攪拌し、小型遠心機でスピンドウンする。
- ④ フロートにさして、37°C の恒温槽に浮かべ、1 時間反応させる。



ここまでの処理で得た試料 HT を、他の試料に加えてアガロースゲル電気泳動で用いることになる。

IV アガロースゲル電気泳動 DNA 断片を電気泳動装置にセットし電気泳動を行う

メダカの胚から抽出した DNA を鋳型にして、PCR 法によって核遺伝子のチロシナーゼ遺伝子部分を増幅し、PCR 産物を制限酵素 *EcoRV* で処理によって、電気泳動用の試料が得られた（はずである）。

この試料と、別に作成された 6 種類の試料に DNA サイズマーカー（DNA Ladder）を加えて、合計 8 種類のサンプルを同時に電気泳動装置にセットして、電気泳動像（バンドのパターン）を比較する。

別に作られた試料について

PCR ミナミメダカ（記号 H で表す。以下同様）とキタノメダカ（K）、両種の交配による F₁（X）※の 3 種類の胚から DNA を抽出し、核 DNA(nuclearDNA) のチロシナーゼ遺伝子領域とミトコンドリア DNA(mtDNA)のシトクロム *b* 遺伝子領域を、それぞれ別のプライマーセット（F と R）★を用いて増幅。

※F₁（X）には、♀ミナミメダカ×♂キタノメダカの場合と、♀キタノメダカ×♂ミナミメダカの場合の 2 つの場合がある。電気泳動パターンをみると、どちらの場合かを判定することができる。

★それぞれのプライマーの塩基配列は次の通りである。

核DNA(nuclearDNA) のチロシナーゼ遺伝子領域プライマー

Tyr_F 配列(5'-3'): TTTGTCTGCCGTTCTGCTGCAG

Tyr_R 配列(5'-3'): GGCGTTACGTCCACCCATC

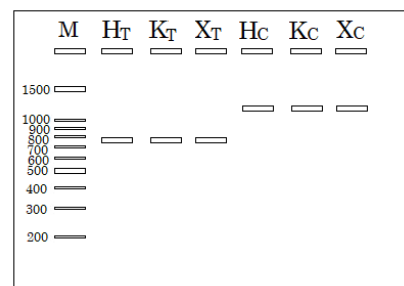
ミトコンドリアDNA(mtDNA) のシトクロム*b*遺伝子領域プライマー

Cytb_F 配列(5'-3'): AGGACCTGTGGCTTGAAAAACCAC

Cytb_R 配列(5'-3'): TYCGACYCCGRWTTACAAGACCG

Y = C or T, R = A or G, W = A or T

PCR 産物の塩基数は、核 DNA のチロシナーゼ遺伝子領域が 766bp、ミトコンドリア DNA のシトクロム *b* 遺伝子領域が 1241bp である。両者ともに、ミナミメダカ（H）、キタノメダカ（K）、F₁（X）の長さは等しい。核 DNA の PCR 産物を H_T, K_T, X_T、ミトコンドリア DNA の PCR 産物を H_c, K_c, X_c として、アガロースゲル電気泳動を行うと、右のようなパターンとなる。ここで、M は DNA サイズマーカー（100 bp DNA Ladder）で、バンドの塩基数の目安となる。



制限酵素処理 PCR で増やした DNA を制限酵素で処理する。

核 DNA の PCR 産物 H_T, K_T, X_T には制限酵素 *EcoRV* を作用させ、ミトコンドリア DNA の PCR 産物 H_c, K_c, X_c には制限酵素 *Bgl*II を作用させる。*EcoRV* とを *Bgl*II の認識塩基配列と由来となる細菌名は、下表の通りである。

酵素名	切断前	切断後	由来
<i>EcoRV</i>	5' ---GATATC---3' 3' ---CTATAG---5'	5' ---GAT ATC---3' 3' ---CTA TAG---5'	大腸菌 <i>Escherichia coli</i>
<i>Bgl</i> II	5' ---AGATCT---3' 3' ---TCTAGA---5'	5' --- A GATCT---3' 3' --- TCTAG A---5'	<i>Bacillus globigii</i>

※H_T は自班で作成したものと同じものである。電気泳動で同じパターンであった場合、DNA 抽出、PCR、制限酵素処理のすべての処理が順調に行われたことが確認できる。

○ アガロースゲルの作成（詳細は p.13）

1. 50mL ビーカーにアガロース 0.4g と TAE バッファー 20mL を入れて混ぜる。
2. 電子レンジで加熱する。（沸騰しないように注意する）
3. 約 60℃ に冷えた段階で、トレイ（小）をゲルメーカーにセットして溶液を入れる。
4. 溶液が全体に広がった段階でコウム（8 穴）を差し込み、ゲルが固まるまで放置する。
5. ゲルが固まったらコウムを抜き、トレイごと TAE バッファーを入れたペトリ皿に入れる。

準備 [全体] 小型遠心機（スピンドアウン用）、電気泳動装置、トランスイルミネーター（LED 470nm）、
 [各班] マイクロピペット（20）、ピペットチップ（チップケース）、ディスポペトリ皿、
 0.2mLPCR チューブラック、パラフィルム（約 2cm 幅）
 試薬等 アガロース（0.4g）、TAE バッファー¹⁾（ゲル作成用、泳動槽 300mL）、
 DNA 染色液（UltraPower DNA Stain²⁾希釈液 36 μ L オレンジ色）、
 ローディング・ダイ（ローディング・バッファー 36 μ L 濃青緑色）、
 DNA サイズマーカー（100bp DNA Ladder 6 μ L 透明）、

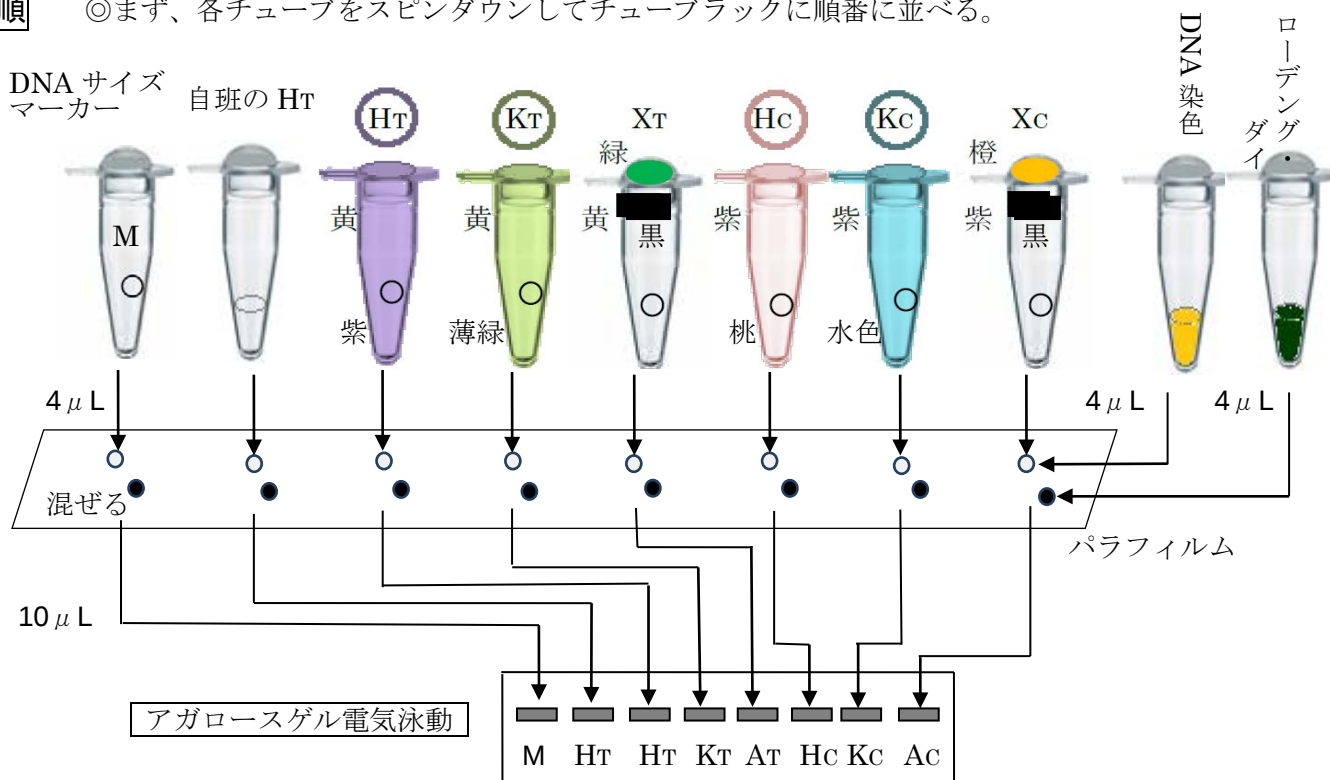
- 1) TAE バッファー：電気泳動の際に用いるバッファー。Tris 121 g, 酢酸 28.6 mL, 0.5 M EDTA pH 8.0 50 mL, メスアップで 500 mL にする（50 倍液）。使用時に精製水で 50 倍に薄めて使用。電気泳動装置の泳動槽に入れるほか、アガロースゲルの作成にも用いる。
- 2) UltraPower DNA Stain 希釈液：UltraPower DNA Stain（ジェネリック・インターナショナル社）100 μ L と 1mL の TAE バッファーを混合する。この染色は発がん性のある EtBr と違い、発色にも UV を使わないので安全である。

DNA 自班の試料と、ミナミメダカとキタノメダカ、両者の雑種（F₁, X）から抽出した DNA を PCR で増殖し、制限酵素で切断したもの。それぞれ 4 μ L 入っている。

	自班の試料	別に処理された試料					
	H _T	H _T	K _T	X _T	H _c	K _c	X _c
もとの DNA	ミナミ	ミナミ	キタ	両者の F ₁	ミナミ	キタ	両者の F ₁
プライマー	核遺伝子 TyrF/R				ミトコンドリア遺伝子 CytbF/R		
制限酵素	<i>Eco</i> RV				<i>Bg</i> /II		
チューブの色	—	紫	薄緑	無・黒印	桃色	水色	無・黒印
チューブの線	—	黄	黄	黄	紫	紫	紫

チューブの線：黄=*Eco*RV 処理済み 紫=*Bg*/II 処理済み を示している

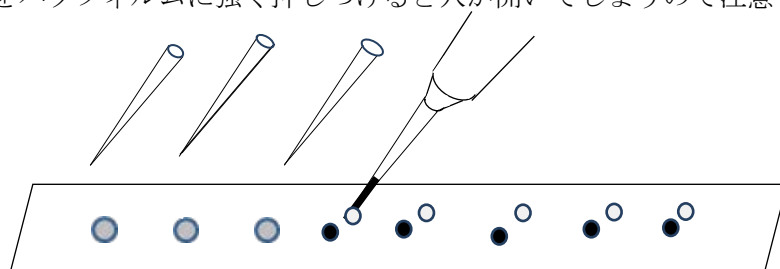
手順 ◎まず、各チューブをスピンドアウンしてチューブラックに順番に並べる。



- ① 2cm 程度の幅に切ったパラフィルム上にマイクロピペットで UltraPower DNA Stain 希釈液を 4 μ L 取り 8 つの液玉を作る。それぞれの液玉の近くにローディング・ダイを 4 μ L 取り液玉を作る。

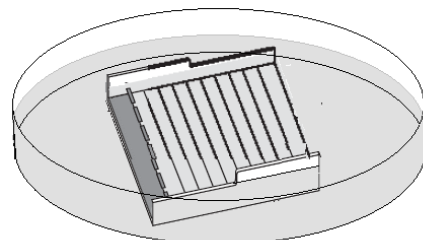


- ② サイズマーカー、DNA サンプル(自班の H_T、H_T、K_T、X_T、H_c、K_c、X_c の順)を 4 μ L ずつ量り取り、UltraPower DNA Stain 希釈液とローディング・ダイの液玉を混ぜる (ピペッティング)。(ピペットの先をパラフィルムに強く押しつけると穴が開いてしまうので注意する)

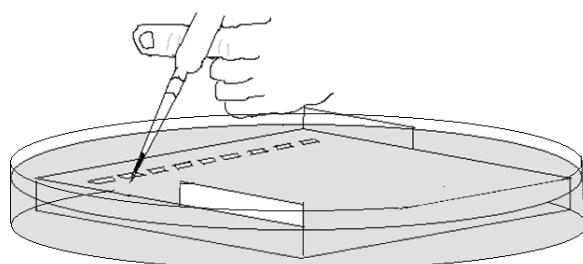


※チップはサンプル毎に取り替えるが、すぐに使うので触れないように並べおくと良い。

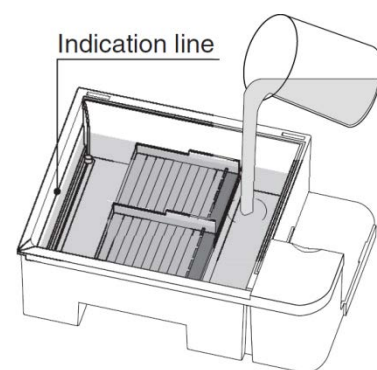
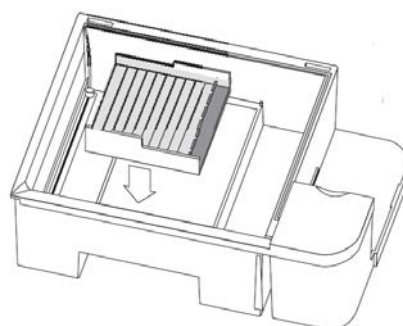
- ③ 作成したアガロースゲルをトレイごとプラスチック製のペトリ皿に取り出し、TAE バッファーをウェル (くぼみ) が液に浸かるまで入れる。



- ⑤ ゲルのウェル (くぼみ) のある方を上にして、ウェルの左から順に、サイズマーカー、サンプルを 10 μ L ずつ入れる。このとき、マイクロピペットを片手で取り扱うのではなく、チップの上のピペットの部分に他方の手の指を添えて、チップの先がしっかりとウェルの中に入るようにする。チップの先端が確実にウェルに入っていることを確認してから内容物を出すこと。また、チップを奥まで入れすぎてゲルを突き抜けることがないように注意する。このとき、**2ndSTOP** まで押し込まなくてもよい。

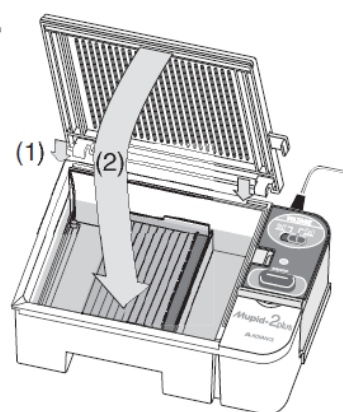
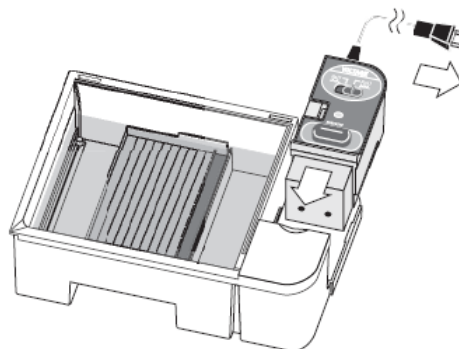


- ⑤ 電気泳動装置にアガロースゲルをトレイごとセットする。アガロースゲルのウェルが電源ユニット側にあることを確認する。(小型のゲルの場合、同時に 2 枚セットできる。)



- ⑥ 電気泳動槽にゲルが十分に浸かるように TAE バッファーを入れる。
(約 250ml) ウェルの部分に気泡が存在する場合は、チップなどを使って気泡を取り除く。

- ⑦ 電源ユニットを取り付け、泳動槽にフタをする。このフタはベース部分と合うように一方向だけに装着できるようになっている。



- ⑧ 泳動方向を確認し (DNA は+極に向かって移動する)、電圧を 100V にセットしスイッチを入れる。
⑨ 20 分経過したら電気泳動装置のスイッチを切り、コンセントを抜く。

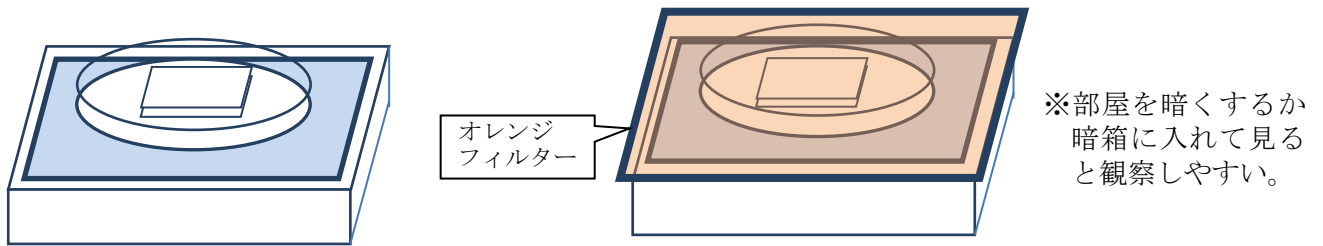
V 電気泳動像を見る

課題

- ① 自分たちで処理した試料 H_T の電気泳動パターンと、H_T のパターンが同じであったか確認する。
- ② 配布されたキットの F₁ (X) はどのような交雑によって得られたものか、
♀キタノメダカ×♂ミナミメダカなのか、♀ミナミメダカ×♂キタノメダカなのかを判定する。

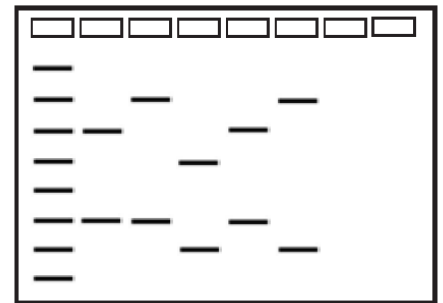
操作

- ① ゲルをトレイから離し、ディスポペトリ皿に移す。
- ② トランスイルミネーターの電源スイッチを ON にして、青色面にペトリ皿をのせ、オレンジ色のフィルターを通して電気泳動像（バンド）を観察する。（電気泳動像をデジタルカメラ等で撮影する）



考察

- ① 電気泳動像から、自班が作成した試料が正しく作られていたか確認する。もし、うまくいかなかった場合には、原因としてどのようなことが考えられるか。
- ② H_T、K_T、X_T の電気泳動パターンを比較して、核遺伝子はどのように子に伝わると考えられるか。
- ③ H_c、K_c、X_c の電気泳動パターンを比較して、ミトコンドリア遺伝子はどのように子に伝わると考えられるか。
- ④ 実験に使った F₁ (X) は、♀キタノメダカ×♂ミナミメダカによるものなのか、♀ミナミメダカ×♂キタノメダカによるものか。そのように判断した根拠を示せ。

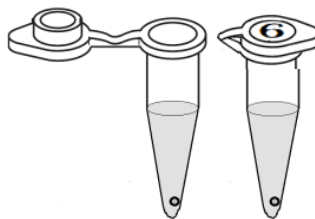


実験操作と使用機器

1. マイクロチューブ：反応容器

化学の実験ではガラスの試験管が用いられてきたが、微量の試料を扱う分子生物学の実験では、樹脂製のマイクロチューブが容器として用いられる。初期の頃にエッペンドルフ社のものが使われたため、「エッペンドルフ・チューブ」「エッペンチューブ」などと呼ばれることもある。最も一般的なサイズは 1.5mL のものであるが、2.0mL のものもある。また、PCR 用には一般に 0.2mL の PCR チューブが用いられる。PCR チューブには蓋がフラットなものとドーム型のものがある。

注意点 蓋がしっかり閉まっているかを確認する。



2. マイクロピペット：溶液を量り取る

微量の試料を量り取るにはマイクロピペットが用いられる。原理はガラス製の駒込ピペットと変わらないが、ゴムに相当する部分がボタンになっている。使用時には必ず先端にピペットチップを取り付け、溶液はチップの中でのみ出し入れされ本体に入ることはない。量り取る溶液の最大量によって段階的にいくつかの種類があり、量り取る量に対応したマイクロピペットを選択する必要がある。一般的な実習用としては、2～20 μ L、20～200 μ L、100～1000 μ L の 3 種類が配備されていることが多い。多くの場合、チップは容量によって色分けされており、2～20 μ L と 20～200 μ L は黄色、100～1000 μ L は青色のチップを装着して使用する。チップはチップケースごと無菌処理されたものを用いることが多い。ボタン操作が重要であり、操作方法を習得する必要がある。（操作方法は別記）

注意点 操作方法を理解し、必ず先端にピペットチップを取り付けて使用する。



3. ボルテックスミキサー：溶液を混ぜる（攪拌）

マイクロチューブにいくつかの溶液を入れて混ぜ合わせる場合、チューブ全体を振動させて内部の溶液を攪拌する方法がとられる（微量なので手で振ったぐらいでは混ざらない）。このとき使われる装置は「ボルテックスミキサー」と呼ばれ、振動の大きさの調節、振動部分が常に振動しているモードや押しつけた時に振動するモードなどの選択ができる。「ボルテックス VORTEX」は会社名であるが、一般に「ボルテックスする」などと用いられる。蓋がしっかり閉まっていることを確認して、チューブの上部をしっかりと持ち、チューブの下部をミキサーの振動部分に押しつけ、15 秒程度の間振動させると、内容物は十分に攪拌される。振動によってチューブ内に溶液が飛び散った状態になるので、攪拌後にはスピンドアウン（次項参照）してチューブの底の部分に溶液を集める。

注意点 チューブの蓋がしっかり閉まっているかを確認する。



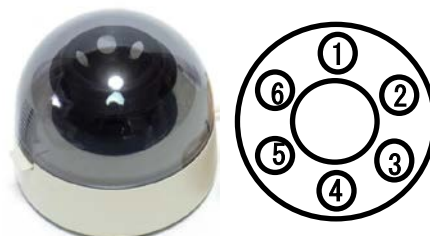
4. 小型遠心機：チューブ内の溶液を集める（スピンドアウン）

攪拌後には溶液をマイクロチューブの底部に集めて反応させるために、小型の遠心分離機が用いられる。この操作を「スピンドアウン」といい、「チビタン」という機種が代表的なものである。チューブを穴にセットして、蓋を閉めて上から押すとスイッチが ON になり回転し、約 10 秒後に蓋を押さえるのを止めると停止する（蓋とは別にスイッチがあるタイプもある）。

PCR チューブ用の遠心機もあるが、1.5mL チューブの蓋を切り取りアダプターとして用いることで、PCR チューブをスピンドアウンすることができる。

注意点 回転させる前にバランスがとれる位置にチューブをセットする。

遠心機は一度に 6 本のチューブを遠心できる。6 本以下の場合、2 本ずつを対にして対角線の位置にセットして使用する。（1 と 4 の位置、2 と 5 の位置など）奇数の場合は空のチューブを対角線の位置にセットして偶数にして使用すること。3 本の場合、1, 3, 5 の位置にセットしても良い。



5. 遠心分離機：溶液の浮遊物を沈殿させる

スピンドウン用の小型遠心機よりも高速で回転する遠心分離機もある。溶液の浮遊物を沈殿させて、沈殿と上澄みに分離することができる。高速で回転させるので、回転中は蓋がロックされるなどの安全機能がある。チューブはローターの穴にセットする。高速で回転させると空気との摩擦で温度が上がるので、冷却機能を持つものもある。沈殿させるものによって、回転数 rpm (遠心力 $\times g$ で表す場合もある) や処理時間が異なり、それらをセットして ON にする。処理時間に達すると、自動的にブレーキがかかり完全に停止してから蓋のロックが解除される。

ローターの穴は斜めなので、沈殿はチューブの底ではなく下部の側面にできる。チューブを遠心機にセットするときに、チューブの蓋と本体の接続部分の突起を外側に揃えておくと、沈殿の位置が推定できるので、次の作業がしやすくなる。

注意点 ローターのバランスがとれる位置にチューブをセットする。2本ずつを対にして対角線の位置にセットして使用する。奇数の場合は空のチューブを対角線の位置にセットして偶数にして使用すること。



6. ウォーターバスとブロックヒーター：溶液を加熱する

(1) ウォーターバス

マイクロチューブに入った溶液を加熱するには、ウォーターバスが使われる。ウォーターバスは水槽にヒーター部が取り付けられたもので、水槽内に水流を作るモーターがついているものが多い。水温や水流の調節ができる。チューブをフローターの穴に奥までしっかり差し込み、フローターごとウォーターバスに浮かべる。フローターには、1.5mL チューブ用の穴のほかに 0.2mL チューブ用の穴があいているものもある。



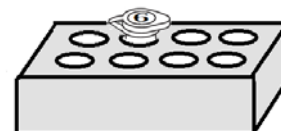
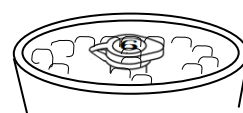
(2) ブロックヒーター

ウォーターバスでは 98°C の温度設定は危険なので、アルミブロックを加熱するブロックヒーターを使用する。高温なのでブロックに手を触れないように注意すること。また、取りだしにはピンセットを使用することが望ましい。チューブに細い針金を付けて沸騰水に投げ込むことで、代用することもできる。



7. クラッシュアイスとアルミブロック：溶液を冷やす

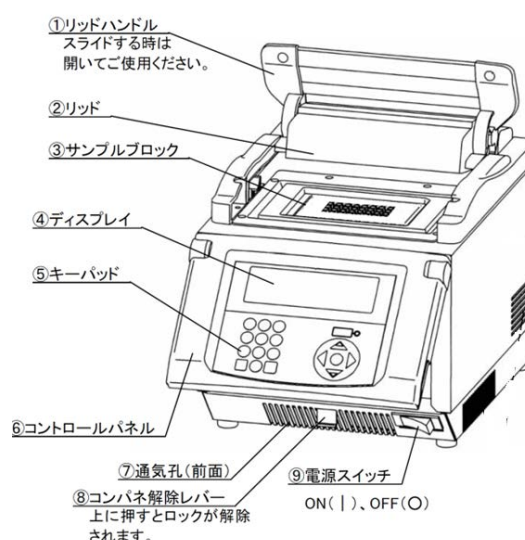
溶液を冷やすには、クラッシュアイス（細かく砕いた氷）を入れた容器にチューブを奥まで差し込む。ブロックヒーターのアルミブロックを氷上に置き、アルミブロックの穴に差し込む方法も用いられる。



8. サーマルサイクラー：DNA の特定部分を増やす

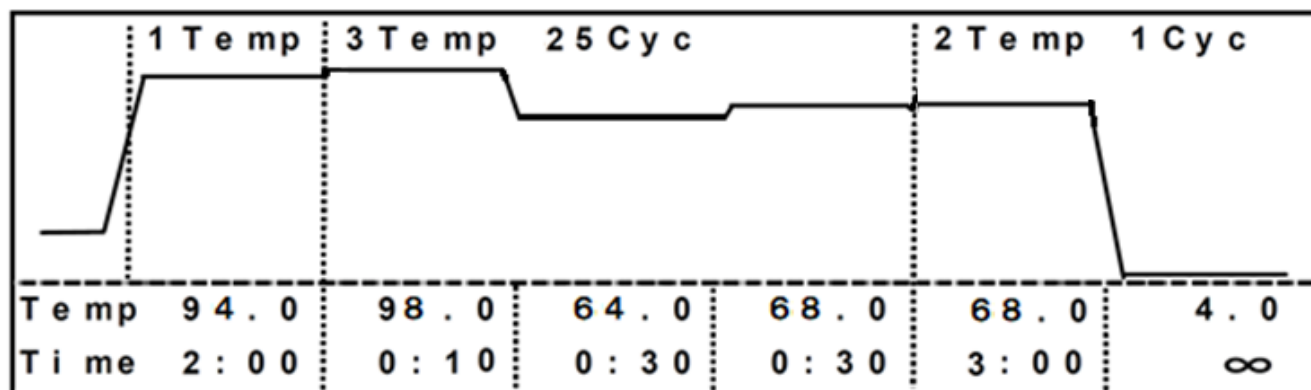
現在では 1 分子の DNA を直接解析する技術も開発されているが、DNA の一部をコピーして解析する方法が行われてきた。DNA の一部をコピーして増やす方法として PCR 法があるが、それを自動化して行うのがサーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler) である。マニュアルにしたがって、温度設定をする。

注意点 PCR チューブを隙間がないようにしっかりセットされていることを確認する。



94℃ 2 分 → (98℃ 10 秒, 64℃ 30 秒, 68℃ 30 秒) 25 回 → 68℃ 3 分 → 4℃ ∞

とセットすると、ディスプレイに次のように表示される。この場合、終了するのに 75 分ほどかかる。



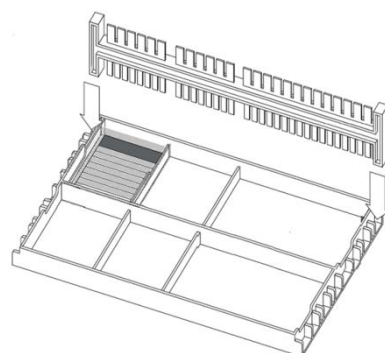
途中で、サーマルサイクラーのディスプレイの部分を見ると、現在どの段階であるかを知ることができる。

※サーマルサイクラーで DNA を増幅させるには、鋳型 DNA、DNA ポリメラーゼ、DNA を作る材料（4 種のヌクレオチド）、緩衝液、プライマーなどの試薬が必要となる。

9. ゲルメーカー：アガロースゲルを作る

アガロースゲル電気泳動装置には、ゲルを作るためのゲルメーカーが付属している。ゲルメーカーは、ゲルメーカー本体（外枠）、ゲルトレイ、コームの 3 つのパーツで構成されている。今回の実験ではゲルメーカー本体の枠にゲルトレイ（小）をセットする。トレイ底部には色づけされた面や線が描かれている。色づけされた面を奥側にセットし、その位置にコームを差し込む。アガロース溶液を沸騰直前まで加熱して透明な状態にしたあと、60℃ぐらいまで温度が下がった状態にしてトレイに流し込む。アガロースを流し込んだらコームを差し込む。コームはゲルのウェル（試料を入れる溝）を作るためのもので、上下でウェルの大きさが異なる。今回は 8 つのウェルが必要となるので突起が 8 つ出ている方を下にしてゲルに差し込む。

注意点 ゲルが完全に固まって白くなるまではゲルメーカーを動かさない。



10. 電気泳動装置：DNA 断片を大きさ（長さ）で分別する

アガロースゲル電気泳動装置は、負の電荷をもつ DNA 分子が陽極に引き寄せられて移動する原理を利用している。アガロースゲルの網目が DNA の移動を妨げるため、同じ電流をかけても小さい（短い）DNA は速く、大きい（長い）DNA は遅く移動する。これにより、DNA を分子の大きさ（長さ）で分別することができる。試料中の DNA 断片が 1 種類であれば DNA は 1 つの塊として移動し、2 種類のものが混ざっていれば 2 つに分かれてゲル中を移動する。これらが可視化された場合、線状に見えるので、「バンド」と呼ばれる。

注意点 試料に混ぜたローディング・バッファーは移動の目安であって、DNA を染色していない。

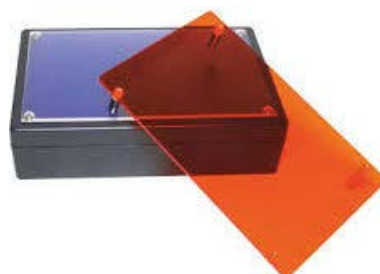


11. トランスイルミネーター：DNA 断片を可視化する

電気泳動後のアガロースゲルの中の DNA は、そのままでは見ることはできない。DNA の染色剤には泳動前に試料に混ぜて泳動するタイプと、泳動後にゲル全体を染色剤に入れて染色するタイプがある。かつては、安価なエチレンブロマイド（EtBr, 「エチプロ」）で泳動後に染色して紫外線を照射して「バンド」を観察したが、「エチプロ」は発がん性があり、紫外線も人体には好ましくないため、他のものが使われるようになってきている。この実習では泳動前に染色して、泳動後のゲルに青色 LED トランスイルミネーターで青色光を照射し、オレンジフィルターを通してバンドを観察する。

注意点 青色 LED トランスイルミネーターの光は強力なので直接見ることは避ける。

※DNA サイズマーカー（100bp DNA Ladder）には、100bp, 200bp, 300bp…1000 bp の 10 種類に 1500 bp の DNA 断片が含まれる。500bp のみ量が少し多いので他より太いバンドが見られる。



アガロースゲルの作成

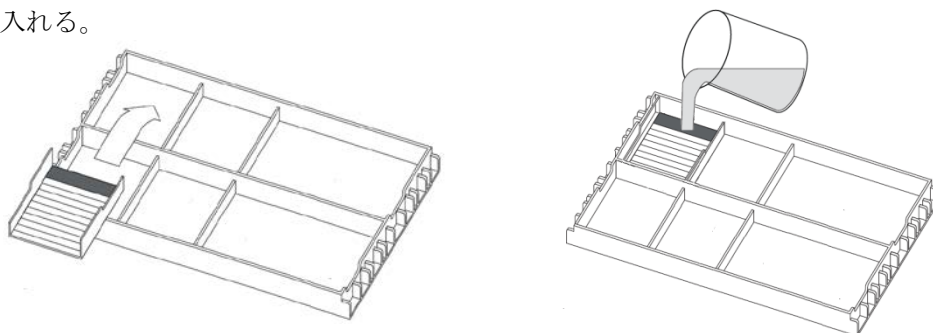
電気泳動で用いるアガロースゲルを作成する。

器具と試薬 電気泳動用アガロース, ゲルメーカー, ビーカー TAE バッファー¹⁾

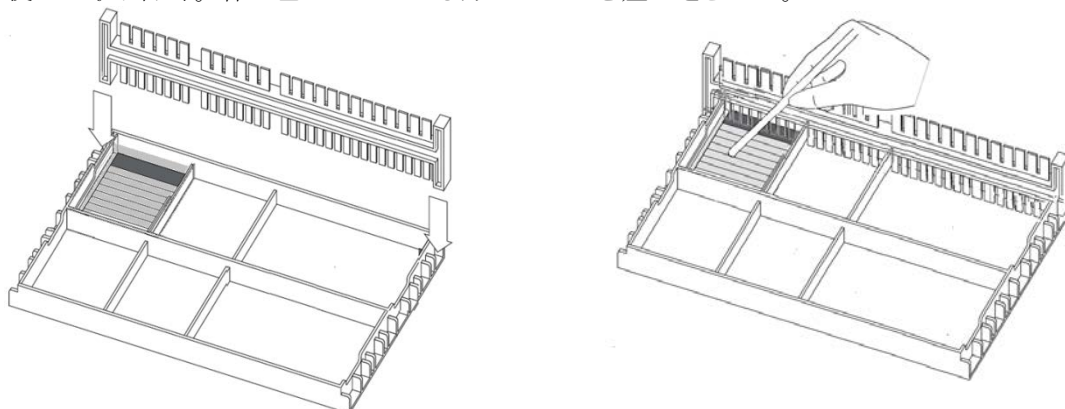
- 1) TAE バッファー: 電気泳動の際に用いるバッファー。 Tris 121 g, 酢酸 28.6 ml, 0.5 M EDTA pH 8.0 50 ml, メスアップで 500 ml にする (50 倍溶液)。使用時に精製水で 50 倍に希釈する。電気泳動装置の泳動槽に入れるほか、アガロースゲルの作成にも用いる。

手順

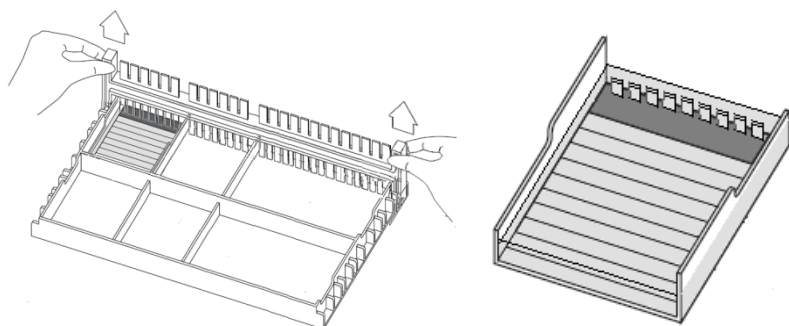
- ① ビーカーに電気泳動用アガロース 0.4g を TEA バッファー 20mL に加え、ビーカーを振って混ぜる。2%アガロース溶液となる。この段階では溶解しない。
- ② ビーカーを電子レンジで加熱する。(突沸しないように注意する。突沸すると気泡が入って扱いにくくなる。電子レンジの中を見ながら、突沸しそうになったら止める。)
※透明で均一な状態になるまで加熱を繰り返す。熱いので気をつける。
- ③ 60℃程度に冷えた段階 (ビーカーをさわって持てる程度なら良い) で、枠をゲルメーカーにセットしてゲルを入れる。



- ④ 溶液が全体に広がった段階でコームを差し込み、ゲルが固まるまで放置する。コームは上側と下側でウェルの幅が異なる。今回は小さい方 (数の多い方) を使用する。ゲルに気泡がある場合には、固まる前にガラス棒などを使って取り除く。枠の色がついている方にコームを差し込むこと。



- ⑤ ゲルが固まったらコームを外し、枠ごとゲルを取り出す。すぐに使わない時は、ゲルは枠に入ったままの状態ですッパーに入れて TAE バッファーに浸して冷蔵庫で保管する。



参考 アガロースゲルの濃度

今回の実験では、2%のアガロースゲルを用いるが、試料の DNA の大きさによって、適切なアガロースの濃度が違ってくる。

%Agarose 分離に適した サイズ

0.7% gel > 5 kbp

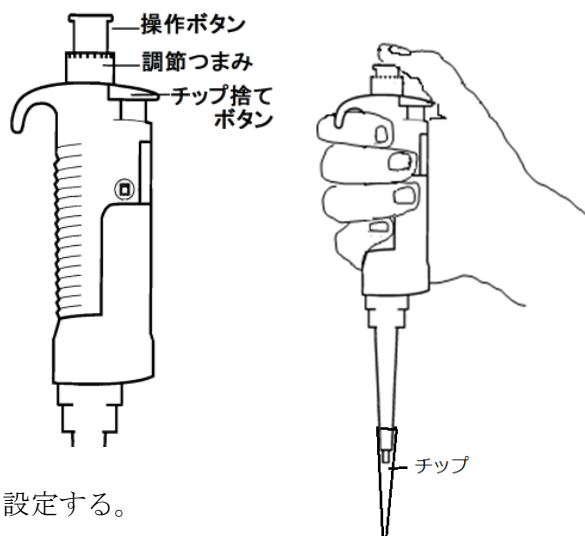
1.0% gel 1 kbp ~ 5 kbp

1.5% gel 200 bp ~ 3 kbp

2.0% gel < 500 bp

マイクロピペットの使い方（速習編）

- 注意**
1. 必ず先端にチップを装着して使用する。
 2. チップを装着した状態で、マイクロピペットを横にしたり、逆さにしたりはしない。
 3. 操作ボタンを押し込んで止まるところが2段階あること（1st Stopと2nd Stop）を確認すること。



操作方法（右利きの場合の操作）

1. **確認** 溶液を取るチューブと取った溶液を入れるチューブを確認する。（チューブラックにある）
2. **設定** ピペットの調節つまみを回して、測り取る量を設定する。
3. **チップ装着** ピペットを握り、チップボックスの蓋を開け、先端にチップを装着する。
（チップを装着したら、机の上に置いたりせず、すぐに測り取りの操作に移る。）
4. **チップ先端の挿入** 測り取る溶液の入ったチューブを左手に持って親指で蓋を開け、右手でピペットを握り、操作ボタンを1st Stopまでゆっくりと押し込み、その状態のまま、チップの先端をチューブの溶液の中に入れる。
（眼の高さまで持ち上げ、チップの先端が溶液に入っていることを確認する。）
5. **吸引** ピペットを垂直に保ち、ボタンを押し込む力を緩め、ボタンをゆっくり元の状態に戻す。
（チューブ内の溶液がチップの中に入ってくる。液が入っていくことを目視で確認する。）
（測り終わったら左手指でチューブの蓋をして、チューブラックに戻す。）
（チップの先に溶液が入っていることを目視で確認する。）
6. **流出** 測り取った溶液を入れるチューブを左手に持ちかえて親指で蓋を開け、チップの先端をチューブの中に入れて、ボタンを1番奥（2nd Stop）までゆっくりと押し込む。
（チップ内の溶液がチューブに移る。）
7. **チップ離脱** チップ捨てボタンを押して、チップをチップ捨てに捨てる。（「チップ捨て」の方を近くにもってきて捨てること。）

電気泳動実験の操作上の注意事項およびコメント

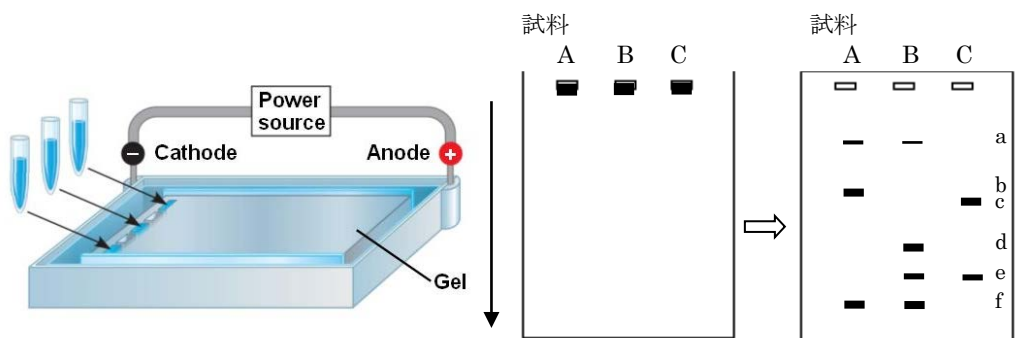
マイクロピペットは精密な機器で高価であり、取り扱いには十分注意すること。

ここでは Eppendorf 社のリサーチVシリーズのマイクロピペットを例として記されている。

(1) 電気泳動 electrophoresis

DNA の断片の長さを比較する

タンパク質や DNA などの高分子は、電荷を持つ成分を含んでいるので、分子全体として電荷を持っている。これらの溶液を電場（電界）に置くと、分子はその電荷に従って電極の方向へ移動する。DNA を構成するヌクレオチドは負の電荷をもっているため、DNA は陽極（+極）に移動することになる。この性質を利用して溶液の代わりにろ紙やゲルを使って高分子を分析する方法が電気泳動（electrophoresis）である。分子に添加する物質、ゲルの種類などを変えることによって、分子の大きさ、電荷の量やその他の物理的性質の違いで、溶液に含まれる物質を分離することができる。いくつかの DNA 断片を含む試料溶液を電気泳動装置にかけると、短いヌクレオチド鎖は移動速度が大きいので下の方へ移動し、長いヌクレオチド鎖は移動速度が小さいので上の方に位置することになる。適当な時間後にゲルを取り出して染色すると、ヌクレオチド鎖がある位置にバンドが現れる。バンドの数が3本なら、試料溶液中には3種類のヌクレオチド鎖があることがわかる。長さが分かっているヌクレオチド鎖を混ぜて泳動すると、試料中に存在するヌクレオチド鎖の長さを推定することもできる。一般には、複数の試料を同時に電気泳動し、それらの試料中に存在するヌクレオチド鎖を比較することができる。この方法の精度は高く、1ヌクレオチドの差でも分離することができる。



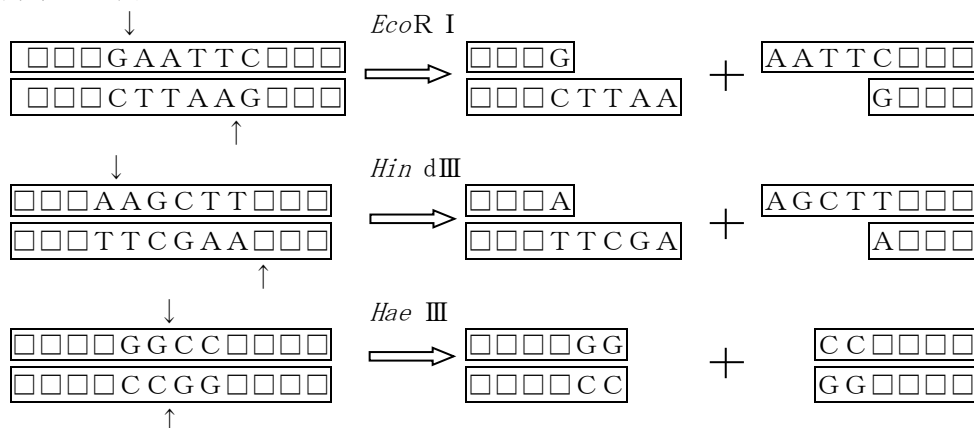
上の例では、a と f のバンドの断片は試料Aと試料Bで同じで、e バンドの断片は試料Bと試料Cで同じと考えられる。

(2) 制限酵素とDNAリガーゼ

DNAを切る・つなげる

1970年 Hamilton Smith は、DNAを特定の塩基配列のところで切断する酵素を単離した。このような酵素は、制限酵素（restriction enzyme）とよばれ、もともとは、細胞が侵入したウィルスのDNAを分解するために使っていたものである。

◎制限酵素の一例



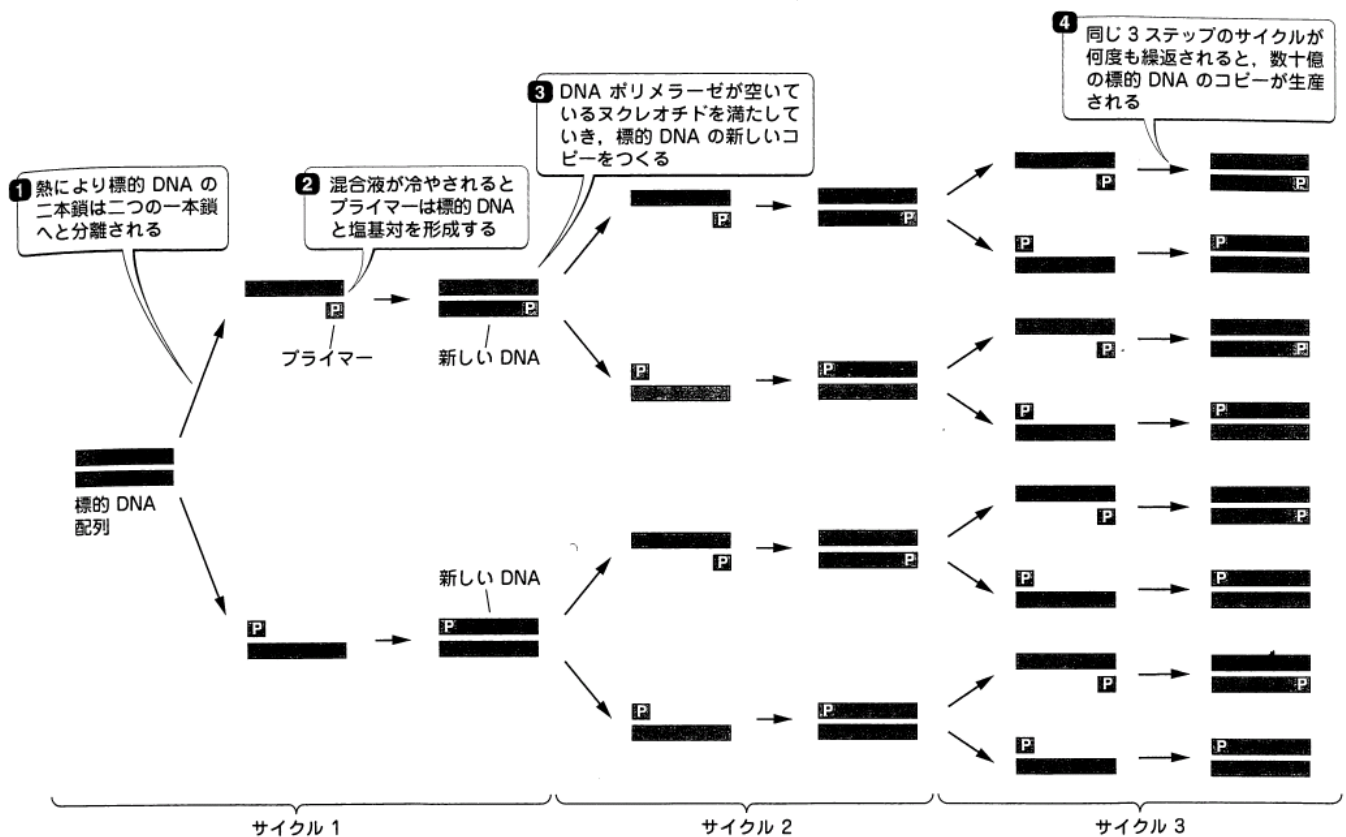
制限酵素で切断してDNA断片にDNAリガーゼを作用させると、相補的な部分が塩基対を作ってつながる。このように、制限酵素とDNAリガーゼを「はさみ」と「のり」のようにつかってDNAを切ったり貼ったりすることができる。

(3) PCR法 (Polymerase Chain Reaction) DNAを増やす

DNAのコピーを大量に作る方法として現在利用されている技術がPCR法である。この技術によって、極端なことをいえば1本のDNAから10億本のDNAを簡単に作ることができる。PCR法は基本的には次の3つの段階の繰り返しである。

- ① 二本鎖DNAを一本鎖に分離する。(短時間の熱処理94℃)
- ② プライマーを加えて冷やし (60℃程度)、一本鎖と結合させる。
- ③ DNAポリメラーゼと4種のヌクレオチドを加えて二本鎖DNAを作る。

①～③をくり返すことによって、DNAは倍々に増えていく。1サイクルは約5分ででき、20～30回くり返しても2・3時間しかかからない。ここで、プライマーとは、相補鎖の合成の最初の部分の15～20程度の塩基配列をもつ短いヌクレオチド鎖である。したがって、この2カ所の部分の塩基配列がわかっていなければならない。この方法は、ごく微量の試料からでもDNAの分析が可能であるので、犯罪捜査などの法医学の分野で利用されたり、化石などから抽出されたDNAの解析にも利用されている。



この方法は、アメリカのマリス (Mullis, K.B) が 1983 年 5 月の金曜日、ガールフレンドを乗せてサンフランシスコ北部のハイウェイをドライブしてアンダーソン峡谷にさしかかったとき、突然思いついたと言われている。当時、*Nature* に投稿したが掲載されず、すぐには認められなかった。マリスはこの業績により 1993 年ノーベル化学賞を受賞した。

DNA は温度を高くするとほぐれ、冷やすとくっつくという原理を利用している。マリスの開発した最初の PCR 法は従来の方法に比較すれば便利であった。しかし、DNA 増幅の 1 サイクルごとに加熱操作で DNA ポリメラーゼが失活するため毎回新しい DNA ポリメラーゼを加える必要があり、その意味では非常に不便で、DNA 増幅に限界があった。マリスはこの問題を好熱性細菌の DNA ポリメラーゼを用いることにより解決した。これで、実用上 PCR 法が確立された。最初に使われた DNA ポリメラーゼは、深海底の熱水噴出孔に生息する好熱細菌 *Thermus aquaticus* が産生するものが用いられたため Taq ポリメラーゼ (単に Taq) と呼ばれたが、最近では他の好熱細菌に由来する酵素も使われている。

参考資料 2 関連部分の DNA 塩基配列データ

PCR で増幅した核遺伝子(チロシナーゼ遺伝子)領域の塩基配列

※四角で囲まれた領域はプライマー配列, 網かけは *Eco* RV 認識サイトを示す.

>ミナミメダカ Hd-rR

```
TTTGTCTGCC GTTCTGCTGC AGTTCTTTGA GACTTGTTGG AGCCAGTTTC CTCGCCCCTG TGCCAATTCA
GAGGGACTGC GAACCAAGGA GTGCTGTCCA GTGTGGAGTG GAGATGGCTC ACCCTGTGGG GCCCTGTCTG
GTCGCGGGTT CTGTGCAGAC GTCTCGGTTT CAGACGAGCC CAACGGGCCG CAGTACCCTC ACAGCGGGAT
CGATGACAGG GAGCGCTGGC CTTTAGCTTT CTTCAACCGG ACGTGTCGTT GTGCAGGAAA CTATGGAGGG
TTTAACTGTG GGAATGCAG ATTCGTTTAC TGGGGCTCCA ACTGTGCTGA GTACAGAGAG TCAGTGC GCA
GGAACATCAT GAGCATGTCA ACTACTGAGC AGCAAAAGTT CATCTCTTAT CTAAACCTGG CCAAAAACAC
CATCAACCCA GACTACGTCA TCACCACAGG CACAAGAGCA GAGATGGGAG AGAACGGTGA GAGCCCCATG
TTCTCTGACA TCAACACCTA CGACCTATTT GTCTGGATAC ACTACTACGT GTCCAGAGAC ACCTTCTTGG
GAGGGCCTGG GAATGTTTGG AGAGATATCG ATTTTGCCCA CGAGTCTGCT GCATTTCTCC CCTGGCACAG
AGTCTACCTG CTTCACTGGG AGCAGGAGAT ACGCAAAATC GCAGGAGATT TTAACCTTAC CATCCCGTAC
TGGGACTGGA GGGATGCCCA GTCCTGTGAA GTCTGCACTG ATAATCTGAT GGGTGGACGT AACGCC
```

766bp

>キタノメダカ Kaga

```
TTTGTCTGCC GTTCTGCTGC AGTTCTTTGG GACTTGTTGG AGCCAGTTTC CTCGCCCCTG TGCCAATTCA
GAGGGACTGC GAACCAAGGA ATGCTGTCCA GTGTGGAGTG GAGATGGCTC ACCCTGTGGG GCCCTGTCTG
GTCGCGGGTT CTGTGCAGAC GTCTCGGTTT CAGACGAGCC CAACGGGCCG CAGTACCCTC ACAGCGGGAT
CGATGACAGG GAGCGCTGGC CTTTAGCTTT CTTCAACCGG ACGTGTCGTT GTGCAGGAAA CTACGGAGGG
TTTAACTGTG GGAATGCAG ATTCGTTTAC TGGGGCTCCA ACTGTGCTGA GTACAGAGAG TCAGTGC GCA
GGAACATCAT GAGCATGTCA ACTACTGAGC AGCAAAAGTT CATCTCTTAT CTAAACCTGG CCAAAAACAC
CATCAACCCA GACTACGTCA TCACCACAGG CACAAGAGCA GAGATGGGAG AGAACGGTGA GAGCCCCATG
TTCTCTGACA TCAACACCTA CGACCTATTT GTCTGGATAC ACTACTACGT GTCCAGAGAC ACCTTCTTGG
GAGGGCCTGG GAATGTTTGG AGAGATATTG ATTTTGCCCA CGAGTCTGCT GCATTTCTCC CCTGGCACAG
AGTCTACCTG CTTCACTGGG AGCAGGAGAT ACGCAAAATC ACAGGAGATT TTAACCTTAC CATCCCGTAC
TGGGACTGGA GGGATGCCCA GTCCTGTGAA GTCTGCACTG ATAATCTGAT GGGTGGACGT AACGCC
```

766bp

PCR で増幅したミトコンドリア遺伝子(シトクロム *b*) 遺伝子領域の塩基配列

※四角で囲まれた領域はプライマー配列, アンダーラインは開始コドン, 網かけは *Bgl* II 認識サイトを
示す.

>ミナミメダカ Hd-rR

```

AGGACCTGTG GCTTGAAAAA CCACCGTTGT ATTCAACTAC AAGAACTTAA TGGCCAACCT TCGAAAAACC
CACCCCCTGT TAAAAATTGC AAACGATGCT CTAGTTGACC TTCCAGCCCC TTCGAACATT TCAGTTTGAT
GAAACTTTGG TTCTCTTCTC GGACTTTGTT TAGCCGCCCA AATCATCACG GGCCTTTTTT TGGCCATACA
TTATACATCC GACATCGCCA CAGCATTCTC ATCAGTTGCA CACATCTGCC GGGATGTTAA CTACGGCTGA
CTAATCCGGA ATATACATGC AAACGGCGCT TCTTTTTTCT TCATCTGCAT TTACCTTCAC ATTGGGCGAG
GCTTGTAATA CGGATCCTAC TTATACAAGG AAACATGAAA TGTCGGTGTA ATTCTTCTTC TACTAGTAAT
AATAACGGCT TTCGTAGGTT ACGTTTTTACC CTGAGGACAA ATATCATTTT GAGGAGCCAC TGTAATCACC
AACCTCTTGT CTGCCGTCCC TTACGTTGGC AACGCCCTCG TCCAATGAAT TTGAGGAGGA TTTTCAGTAG
ATAACGCCAC ACTTACCCGA TTCTTTGCCT TCCATTTCTT CCTCCCCTTC GTAATTGCCG CCGCAACAGT
TGTTTCATCTA ATTTTTCTTC ACGAAACAGG TTCAAACAAC CCAACCGGCC TCAATTCAGA CCCCACAAAA
GTCTCCTTCC ACCCTTACTT TTCCTATAAA GACCTTTTAG GGTTCGCTGC CTTGCTAGTA GCCTTAATTT
CCCTGGCGCT TTTCTCCCCC AACCTGCTTG GAGACCCAGA CAACTTCACC CCTGCCAACC CGCTAGTTAC
TCCCCCTCAC ATCAAGCCTG AATGATACTT CCTATTTGCC TACGCCATTC TACGATCAAT TCCAAATAAA
CTTGGAGGGG TCCTAGCCCT ATTAGCCTCT ATTCTAGTAC TATTCCTGGT CCCTATCCTA CACACCTCTA
AACACGAAG CTTACGTTT CGACCTTTCA CCAATTCCT TTTCTGACTC CTAGTAGCAG ACGTGATGGT
TTTAACCTGA ATTGGCGGAA TGCCCGTAGA ACACCCATTT ATTATCATTG GTCAAATCGC ATCTTTTCTT
TATTTTCCC TCTTTCTTAT TATAGACCA GCGGCGGGAT GACTAGAAAA TAAAGTCTTA AAATGACAAT
GCACGAGAAG CTCAATTGTA AGAGCACCGG TCTTGTAAWY CGGRRGTCGR A 1241bp

```

>キタノメダカ Kaga

```

AGGACCTGTG GCTTGAAAAA CCACGTGTTGT ATTCAACTAC AAGAACTTAA TGGCTAACCT TCGAAAAACC
CACCCCCTAT TAAAAATTGC AAACGATGCC CTAGTTGACC TCCAGCCCC TTCAAACATC TCAGTTTGAT
GAAACTTTGG TTCTCTCCTT GGGCTTTGTT TGGCCGCCCA AATCGTCACA GGCCTATTTT TGGCCATGCA
CTATACATCT GATATTGCCA CAGCATTCTC ATCAGTCGCA CACATCTGCC GGGACGTTAA CTACGGCTGA
CTAATCCGTA ATATGCATGC AAACGGCGCT TCTTTTTTCT TCATCTGTAT CTATTTGCAC ATTGGTCGAG
GCTTATACTA TGGTTCCTAC TTATACAAGG AAACATGAAA CGTTGGTGTT ATTCTTCTTC TGCTTGTAAT
AATAACAGCT TTCGTAGGCT ATGTCCTACC CTGAGGACAA ATATCATTCT GGGGGGCCAC TGTAATTACC
AACCTGCTGT CTGCTGTCCC TTACATTGGC AACGCCCTCG TCCAATGGAT TTGGGGAGGG TTTTCAGTAG
ATAATGCCAC ACTCACCCGA TTCTTTGCCT TCCACTTCCT CTTTCCCTTC GTAATTGCCG CCGCAACAAT
CGTCCACTTA ATCTTCCTTC ACGAAACGGG CTCAAACAAC CCAACCGGCC TCAATTCAGA CTCTGACAAA
GTCTCTTTTC ACCCTTACTT CTCTTATAAA GATCTTTTAG GCTTTGCTGC CTTGCTAGTA GCCTTGATTT
CTCTCGCACT ATTCTCCCCC AACCTGCTTG GAGACCCCGA TAACTTCACC CCTGCTAACC CATTAGTAAC
CCCTCCTCAC ATTAACCCG AATGATATTT CCTATTTGCT TACGCTATTC TACGATCAAT TCCAAACAAA
CTTGGAGGCG TCCTAGCCTT ATTAGCCTCT ATCCTAGTTC TATTCCTAGT CCCATCCTA CACACATCCA
AACACGAGG CTAACATTT CGACCTTTCA CCAATTCCT TTTCTGACTC CTAGTAGCAG ACGTAATGGT
TTTAACCTGA ATTGGTGTA TGCTGTAGA ACATCCCTTT ATTATCATCG GTCAAATCGC ATCTTTTCTT
TATTTCTTCC TCTTTCTTGT TATAGACCA GCGGCGGGAT GACTAGAAAA TAAAGTCTTA AAATGACAAT
GCACGAGAAG CTCAATTGTT AGAGCGCGG TCTTGTAAWY CGGRRGTCGR A 1241bp

```

メダカを用いた遺伝子分析実験 記録

1 日目

年 月 日 (曜) 第 時限に実施

I 胚からの DNA の抽出 F₁胚から DNA を抽出する。

○手順通りにできたか。難しかった点があれば書く。

○感想

II PCR による DNA の増幅 核遺伝子を増幅する。

○手順通りにできたか。難しかった点があれば書く。

○PCR 法について理解できているか。

○感想など

2 日目

年 月 日 (曜) 第 時限に実施

III 制限酵素による DNA の切断

増幅した核遺伝子とミトコンドリア遺伝子を制限酵素によって切断する。

○手順通りにできたか。難しかった点があれば記せ。

○制限酵素について理解できているか。

○参考資料をもとに、サンプル H_T、K_T、B_T、H_C、K_C は、それぞれいくつの断片になると考えられるか。断片数とそれぞれの断片の長さを考えてみよ。

	H _T	K _T		H _C	K _C	
断片数						
各断片の長さを 列挙する (大きい順に書く)						

○感想など

IV アガロースゲル電気泳動

○アガロースゲル電気泳動法について理解できているか。

○感想など

電気泳動像のデジカメ写真を貼りつける。

全体のまとめと考察

考察

- ① 電気泳動像から、自班が処理したミナミメダカのバンドパターンは H_T と同じになったか。うまくいかなかった場合には、原因としてどのようなことが考えられるか。
- ② H_T 、 K_T 、 X_T の電気泳動パターンを比較して、核遺伝子はどのように子に伝わると考えられるか。
- ③ H_c 、 K_c 、 X_c の電気泳動パターンを比較して、ミトコンドリア遺伝子はどのように子に伝わると考えられるか。
- ④ 実験に使った F_1 (X) は、♀キタノメダカ×♂ミナミメダカによるものなのか、♀ミナミメダカ×♂キタノメダカによるものか。そのように判断した根拠を示せ。○手順通りにできたか。難しかった点があれば記せ。

実験全体の感想