

# メダカの DNA 分析実験 (アガロースゲル電気泳動)

## 実験のねらい

分子生物学における基本的な実験手法 (アガロースゲル電気泳動) を実際に行って理解を深める。

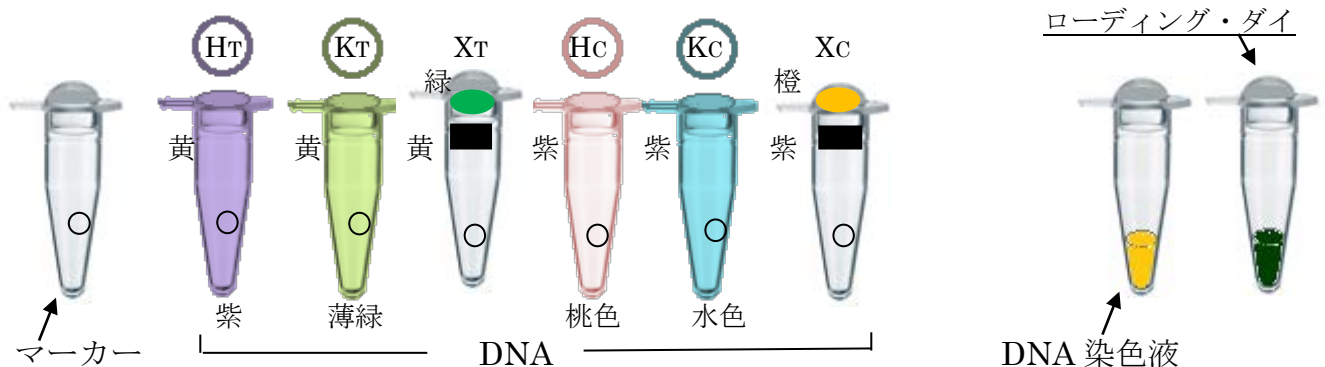
## 課題

キタノメダカとミナミメダカおよびそれらの交配による F<sub>1</sub> から抽出した DNA を PCR 法で増殖させ、制限酵素で切断した試料を、アガロースゲル電気泳動によって分析する。得られた泳動パターンから、F<sub>1</sub> が♀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。

## 準備

- [全体] 小型遠心機 (スピンドウン用)、電気泳動装置 4 台、トランスイルミネーター (LED 470nm)、  
 [各班] 2-20 μL マイクロピペット、ピペットチップ (チップケース)、ディスポゼトリ皿、  
 0.2mL PCR チューブラック、パラフィルム (約 3cm 幅)  
 試薬等 アガロース (0.4g)、TAE バッファー (ゲル作成用、泳動槽 300mL)、  
 DNA 染色液 (UltraPower DNA Stain 希釈液 35 μL オレンジ色)、  
 ローディング・ダイ (ローディング・バッファー 35 μL 濃青緑色)、  
 DNA サイズマーカー (100bp DNA Ladder 5 μL 透明)、  
 DNA ミナミメダカ (ヒメダカ) とキタノメダカ、両者の雑種 (F<sub>1</sub>, X と表記) 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 5 μL 入っている。

|         | H <sub>T</sub> | K <sub>T</sub> | X <sub>T</sub>     | H <sub>c</sub>     | K <sub>c</sub> | X <sub>c</sub>     |
|---------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|----------------|--------------------|
| もとの DNA | ミナミ            | キタ             | 両者の F <sub>1</sub> | ミナミ                | キタ             | 両者の F <sub>1</sub> |
| 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    | EcoRV          |                |                    | BglII              |                |                    |



チューブの黄印は *EcoRV* で処理、紫印は *BglII* で処理を示す。

## I 制限酵素処理 (処理済み)

- DNA サンプル (各 2 μL) の入ったマイクロチューブに制限酵素を 4 μL ずつ入れる。  
 プライマー TyrF/R の PCR 産物 (黄印 H<sub>T</sub>、K<sub>T</sub>、A<sub>T</sub>) には *EcoRV* (黄印) を入れる。  
 プライマー CytbF/R の PCR 産物 (紫印 H<sub>c</sub>、K<sub>c</sub>、X<sub>c</sub>) には *BglII* (紫印) を入れる。
- 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。
- 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。

## II アガロースゲルの作成 (2%ゲル)

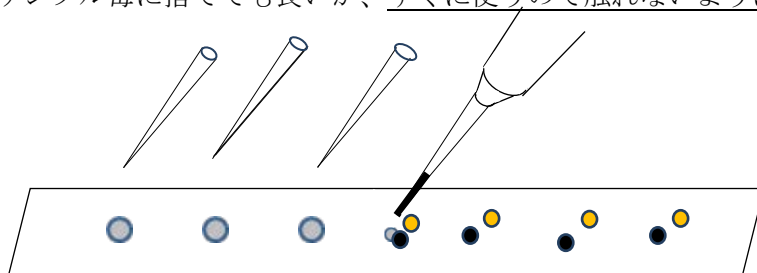
- 50mL ビーカーにアガロース 0.4g と TAE バッファー 20mL を入れて混ぜる。
- 電子レンジで加熱する。(沸騰しないように注意する)
- 約 60°C に冷えた段階で、ゲル枠 (小) をゲルメーカーにセットして溶液を入れる。
- 溶液が全体に広がった段階でコウム (8 穴) を差し込み、ゲルが固まるまで放置する。
- ゲルが固まったら、コウムを抜き、ゲル枠ごと TAE バッファーを入れたペトリ皿に入れる。

### III アガロースゲル電気泳動

1. チューブラックにチューブを順番に並べる。(マーカー、H<sub>T</sub>、K<sub>T</sub>、X<sub>T</sub>、H<sub>c</sub>、K<sub>c</sub>、X<sub>c</sub>、DNA 染色液、ローディング・ダイの順)
2. 3cm 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  $\mu$ L 取り 7 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  $\mu$ L 取り液玉を作る。



3. サイズマーカー、DNA サンプル(H<sub>T</sub>、K<sub>T</sub>、X<sub>T</sub>、H<sub>c</sub>、K<sub>c</sub>、X<sub>c</sub> の順)を 4  $\mu$ 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 (ピペッティングする)、(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捨てても良いが、すぐに使うので触れないように並べおくと良い。



4. 作成したアガロースゲルをゲル枠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 4  $\mu$ 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。
6. 電気泳動装置にアガロースゲルをゲル枠ごとセットする。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。)
7. 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。
8. 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。
9. 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。
10. 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。

### IV 電気泳動像を見る

1. ゲルをホルダーから離し、ディスプレイペトリ皿に移す。
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) を記録する。(電気泳動像をデジタルカメラで撮影する)

#### 考察

1. 電気泳動像から、核遺伝子とミトコンドリア遺伝子の遺伝様式が異なることを確認する。
2. 実験に使った F<sub>1</sub> (A または B) 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を判定する。

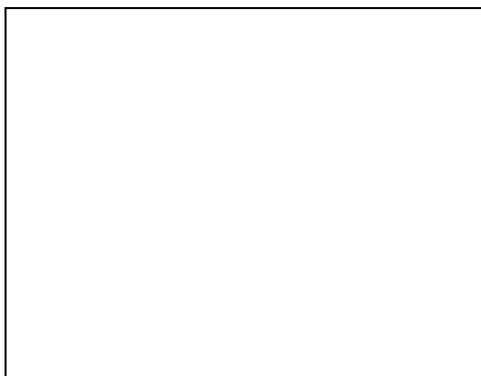
# メダカの DNA 分析実験 (アガロースゲル電気泳動) 記録

年 月 日 ( 曜 ) 第 時限に実施

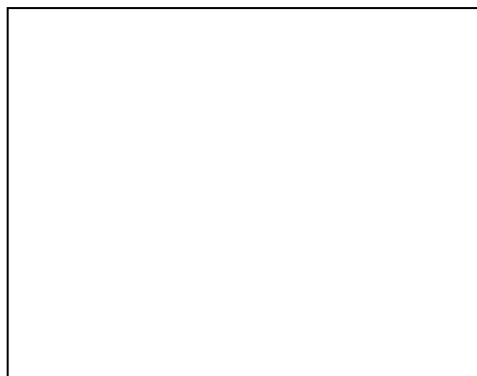
## 電気泳動による DNA 断片の分析

○手順通りにできたか。難しかった点があれば書く。

○電気泳動像 (スケッチ)



電気泳動像のデジカメ写真を貼り付ける。



○与えられた F<sub>1</sub> サンプル (X<sub>T</sub>・X<sub>C</sub>) の親の組み合わせは、♀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。

判定した根拠を記せ。

## [参考] 制限酵素による DNA の切断

○参考資料をもとに、サンプル H<sub>T</sub>、K<sub>T</sub>、H<sub>C</sub>、K<sub>C</sub> 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。

| 制限酵素                     | <i>EcoRV</i>   |                | <i>BglII</i>   |                |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| DNA                      | H <sub>T</sub> | K <sub>T</sub> | H <sub>C</sub> | K <sub>C</sub> |
| 断片数 (切れない場合は 1)          |                |                |                |                |
| 各断片の長さを列挙する<br>(大きい順に書く) |                |                |                |                |

◎感想

クラス ( ) No. ( ) 氏名

検印

## 参考資料 1

### キタノメダカとミナミメダカ

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生き物を分析する分類学の立場からの実証がなされてこなかった。

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、コナメダカと比べ、(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.

## 参考資料 2

### 制限酵素 *EcoRV* と *BglII* の認識塩基対

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

(増殖した DNA の領域の塩基配列データから、切断の結果は予想できる。)

### 参考資料 3

## 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 ヒメダカ)

```

TTTGTCTGCC GTTCTGCTGC AGTTCTTTTGA 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 ATTTCGTTAC TGGGGCTCCA ACTGTGCTGA GTACAGAGAG TCAGTGCGCA
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 AGTTCTTTTGG 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 ATTTCGTTAC TGGGGCTCCA ACTGTGCTGA GTACAGAGAG TCAGTGCGCA
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 ヒメダカ)

```

AGGACCTGTG GCTTGAAAAA CCACCGTTGT ATTCAACTAC AAGAACTTAA TGGCCAACCT TCGAAAAACC
CACCCCCTGT TAAAAATTGC AAACGATGCT CTAGTTGACC TTCCAGCCCC TTCGAACATT TCAGTTTGAT
GAAACTTTGG TTCTCTTCTC GGACTTTGTT TAGCCGCCCA AATCATCACG GGCCTTTTTC TTGCCATACA
TTATACATCC GACATCGCCA CAGCATTCTC ATCAGTTGCA CACATCTGCC GGGATGTTAA CTACGGCTGA
CTAATCCGGA ATATACATGC AAACGGCGCT TCTTTTTTCT TCATCTGCAT TTACCTTAC ATTGGGCGAG
GCTTGTACTA CGGATCCTAC TTATACAAGG AAACATGAAA TGTCGGTGTA ATTCTTCTTC TACTAGTAAT
AATAACGGCT TTCGTAGGTT ACGTTTTACC CTGAGGACAA ATATCATTTT GAGGAGCCAC TGTAATCACC
AACCTCTTGT CTGCCGTCCT TTACGTTGGC AACGCCCTCG TCCAATGAAT TTGAGGAGGA TTTTCAGTAG
ATAACGCCAC ACTTACCCGA TTCTTTGCCT TCCATTTCTT CCTCCCCTTC GTAATTGCCG CCGCAACAGT
TGTTTCATCTA ATTTTTCTTC ACGAAACAGG TTCAAACAAC CCAACCGGCC TCAATTCAGA CCCCACAAA
GTCTCCTTCC ACCCTTACTT TTCTTATAAA GACTTTTTAG GGTTCGCTGC CTTGCTAGTA GCCTTAATTT
CCCTGGCGCT TTTCTCCCC AACCTGCTTG GAGACCCAGA CAACTTCACC CCTGCCAACCG CTAGTTAC
TCCCCCTCAC ATCAAGCCTG AATGATACTT CCTATTTGCC TACGCCATTC TACGATCAAT TCCAAATAAA
CTTGAGGGG TCCTAGCCCT ATTAGCCTCT ATTCTAGTAC TATTCCTGGT CCCTATCCTA CACACCTCTA
AACACGAAG CTTACGTTT CGACCTTTCA CCAATTCTT TTTCTGACTC CTAGTAGCAG ACGTGATGGT
TTAACCTGA ATTGGCGGAA TGCCCGTAGA ACACCCATTT ATTATCATTTG GTCAAATCGC ATCTTTTCTT
TATTTTTCCC TCTTTCTTAT TATAGACCA GCGGCGGGAT GACTAGAAAA TAAAGTCTTA AAATGACAAT
GCACGAGAAG CTCAATTGTA AGAGCACCGG TCTTGTAAWY CGGRRGTCGR A 1241bp
    
```

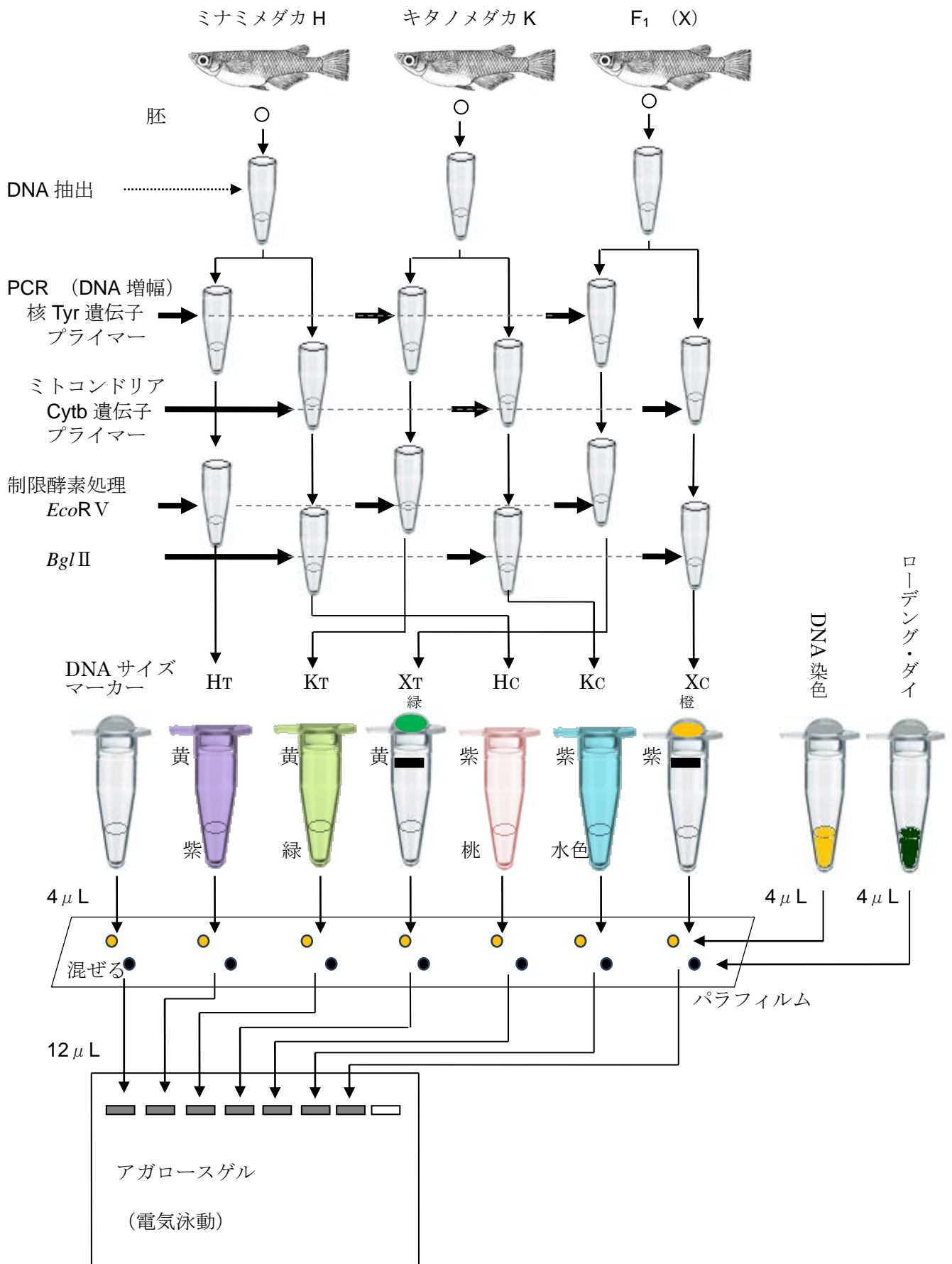
>キタノメダカ(Kaga)

```

AGGACCTGTG GCTTGAAAAA CCACCGTTGT ATTCAACTAC AAGAACTTAA TGGCTAACCT TCGAAAAACC
CACCCCCTAT TAAAAATTGC AAACGATGCC CTAGTTGACC TCCAGCCCC TTCAAACATC TCAGTTTGAT
GAAACTTTGG TTCTCTCCTT GGGCTTTGTT TGGCCGCCCA AATCGTCACA GGCCTATTTT TTGCCATGCA
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 ATATCATTTT GGGGGGCCAC TGTAATTACC
AACCTGCTGT CTGCTGTCCC TTACATTGGC AACGCCCTCG TCCAATGGAT TTGGGGAGGG TTTTCAGTAG
ATAATGCCAC ACTCACCCGA TTCTTTGCCT TCCACTTCTT CCTTCCCTTC GTAATTGCCG CCGCAACAAT
CGTCCACTTA ATCTTCCTTC ACGAAACGGG CTCAAACAAC CCAACCGGCC TCAATTCAGA CTCTGACAAA
GTCTCTTTTC ACCCTTACTT CTCTTATAAA GATCTTTTAG GCTTTGCTGC CTTGCTAGTA GCCTTGATTT
CTCTCGCACT ATTCTCCCC AACCTGCTTG GAGACCCCGA TAACTTCACC CCTGCTAACCG CATTAGTAAC
CCCTCCTCAC ATTAAACCCG AATGATATTT CCTATTTGCT TACGCTATTC TACGATCAAT TCCAAACAAA
CTTGAGGGG TCCTAGCCCT ATTAGCCTCT ATCCTAGTTC TATTCCTAGT CCCATCCTA CACACATCCA
AACACGAGG CTAACATTT CGACCTTTCA CCAATTCTT TTTCTGACTC CTAGTAGCAG ACGTAATGGT
TTAACCTGA ATTGGTGTA TGCCGTGTA ACATCCCTTT ATTATCATCG GTCAAATCGC ATCTTTTCTT
TATTTCTTCC TCTTTCTTGT TATAGACCA GCGGCGGGAT GACTAGAAAA TAAAGTCTTA AAATGACAAT
GCACGAGAAG CTCAATTGTT AGAGCGCGG TCTTGTAAWY CGGRRGTCGR A 1241bp
    
```

# メダカの遺伝子実験

## 電気泳動までの流れ



**重要** 実験前に 0.2mL チューブをスピンドウンして内容物を下に集めて下さい。

◎マイクロピペットの操作

実験の成否はマイクロピペットの操作にかかっているといつて過言ではない。

事前に使い方を一通りやっておく必要がある。

また、チップが途中で外れないようにしっかり装着してあることを、その都度確認すること。

溶液を量り取ったときに、チップの先に溶液が入っていることをその都度確認すること。

II アガロースゲルの作成（2%ゲル）

1. いくつかの班の分をまとめて作成しても良いが、ゲルメーカーに注ぐときに均等に分配されないこともあり、1班ごとに作った方が均一なものができる。
2. 容器の口にラップをかけると書いてあるものもあるが、熱がこもってかえって危険な場合もある。
3. 「約 60℃に冷えた段階」は正確に測定する必要はなく、底の部分が手で触れる程度なら良い。あまり熱い段階で入れると、プラスチックのゲル枠が変形してしまうことがある。ゲル枠の方向はコウムを差し込む部分に色がついている部分がくるようにする。
4. コウムには2つの方向があり、8穴となる側を差し込むこと。
5. ゲル枠を取り出したら、枠の裏面や側面についた余分なゲルを取り除く。また、ケールメーカーやコウムをできるだけ早く洗うこと。ゲルが固まってしまうと除去できないことが多い。

III アガロースゲル電気泳動

2. パラフィルム上に液玉を作る際、パラフィルムの表面にチップの先を押しつけるのではなく、ピペットのボタンを軽く押してチップの先端に液玉を作って静かに載せるようにする。ローディング・ダイは粘性があり、チップの側面について大きな液玉となってしまうことがあるが問題ない。
3. DNA サンプルをチューブから取ったとき、必ずチップの先に液が入っていることを毎回確認すること。ピペットのボタンを軽く押してチップの先端に液玉を作って、先に **UltraPower DNA Stain** 希釈液と混ぜ、次にローディング・ダイの液玉と混ぜると良い。  
※UltraPower DNA Stain のマニュアルには、「混ぜてから 3~5 分待つ」とあるが、生徒の作業の速さから考えるとその必要はない。
4. 一般的には、電気泳動槽にセットした状態でウェルにサンプルを入れる（アプライ）が、ペトリ皿で行った方が初心者にはやりやすい。2班のゲルを同時に行う場合は、順番待ちをなくすこともできる。
5. パラフィルム上のサンプルを取るときに、チップを押しつけるのではなく、斜めにして取ると良い。ゲルのウェル（くぼみ）にサンプルを出すとき、チップの先がウェルの中に入っていることを確認する。液を出すときに、**1st stop** まで押し出せばよく、**2nd stop** まで押しなくてもよい。
6. 電気泳動装置にセットするとき、ゲルの方向を間違えないこと。
7. ゲルのウェルが十分に浸かるように **TAE** バッファーを入れる。ペトリ皿に残った **TAE** バッファーも加える。  
※ローディング・ダイは DNA を染色しているわけではないことに留意する。

IV 電気泳動像を見る

1. ディスポペトリ皿に移したゲルの下部に空気が入っていないことを確認する。取り出した直後は熱を持っているので、少し放置して冷やした方が良い。**TAE** バッファーは何回か繰り返し使用できるので、捨てないで保存する。
2. 電気泳動像をデジタルカメラで撮影するとき、室内を暗くするか、全体を暗箱で覆うと見やすくなる。

重要なポイント

核 DNA は F1 には両親のバンドが重なったものが出る。

ミトコンドリア DNA は母親のみから受け継がれる。(F1 には母親のパターンが出る)



## ○ 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。

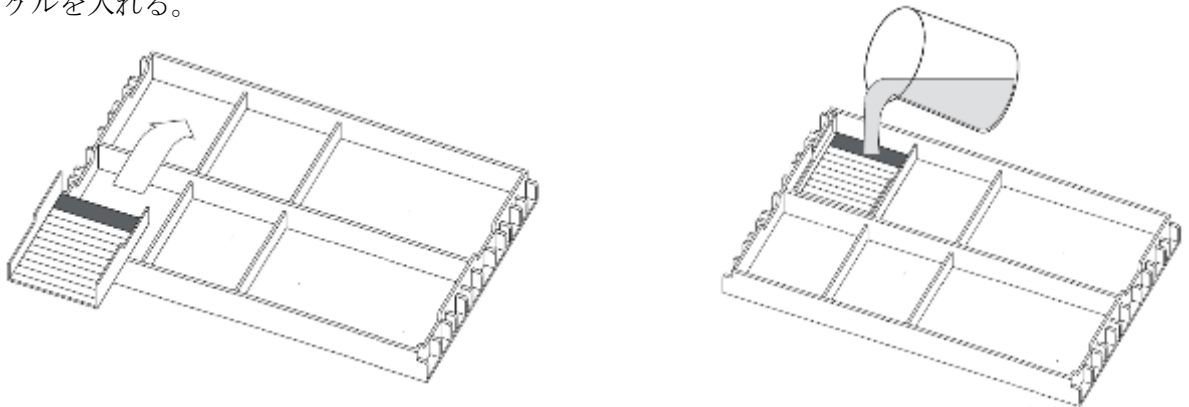
### 器具と試薬

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<sup>1)</sup>

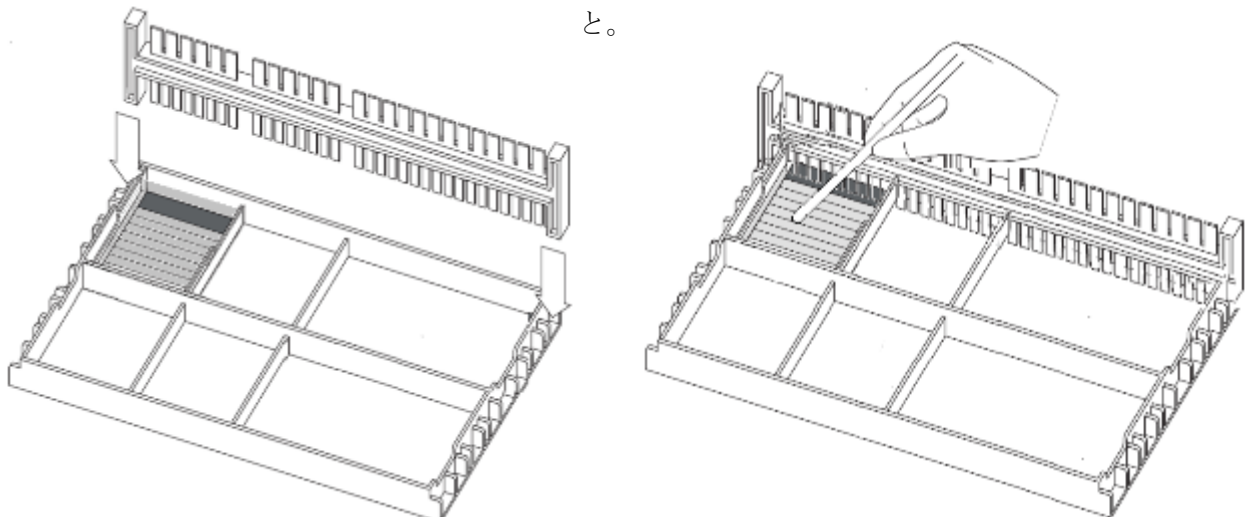
- 1) TAE バッファー：電気泳動の際に用いるバッファー。TAE バッファー50 倍液 [ Tris 121 g, 酢酸 28.6 mL, 0.5 M EDTA pH 8.0 50 mL, メスアップで 500 mL にする。] 50 倍液を 50 倍に希釈して使用する。電気泳動装置の泳動槽に入れるほか、アガロースゲルの作成にも用いる。

### 手順

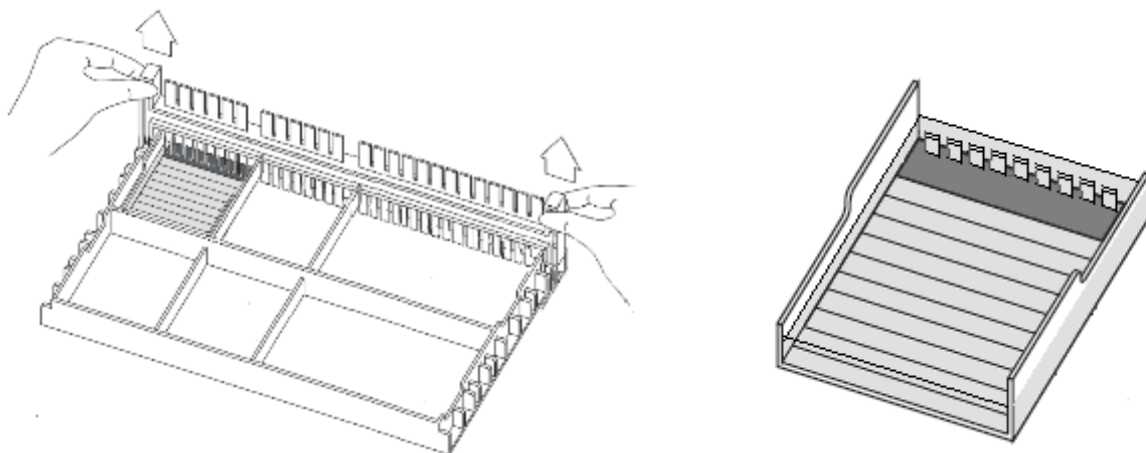
- ① ビーカーに電気泳動用アガロース 0.4g を TEA バッファー20mL に加え、ビーカーを振って混ぜる。2%アガロース溶液となる。この段階では溶解しない。
- ② ビーカーを電子レンジで加熱する。(突沸しないように注意する。突沸すると気泡が入って扱いにくくなる。電子レンジの中を見ながら、突沸しそうになったら止める。) ※透明で均一な状態になるまで加熱を繰り返す。熱いので気をつける。
- ③ 60°C程度に冷えた段階（ビーカーをさわって持てる程度なら良い）で、枠をゲルメーカーにセットしてゲルを入れる。



- ④ 溶液が全体に広がった段階でコウムを差し込み、ゲルが固まるまで放置する。コウ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と。



- ⑤ ゲルが固まったらコウムを外し、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。

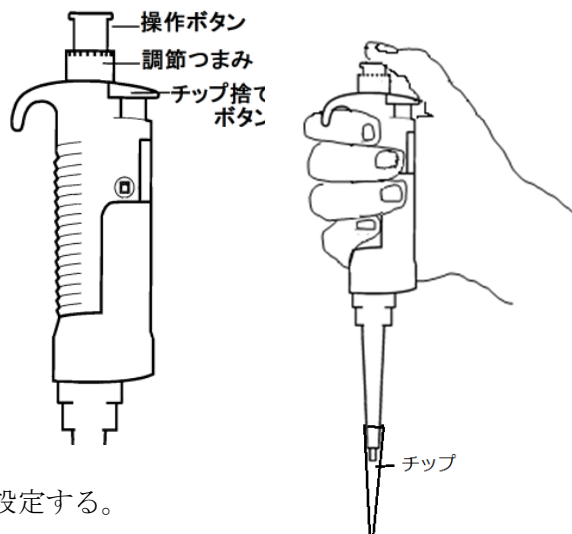
| %Agarose | 分離に適した DNA サイズ |
|----------|----------------|
| 0.7% gel | >5 kbp         |
| 1.0% gel | 1 kbp ~ 5 kbp  |
| 1.5% gel | 200 bp ~ 3 kbp |
| 2.0% gel | <500 bp        |

# 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。吸引するときはマイクロピペットを垂直に持って操作すること。  
（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。）  
（チップの先に溶液が入っている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。）
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。）出すときはマイクロピペットを斜めに傾けてもよい。
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。）



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。  
Eppendorf社 のリサーチVシリーズのマイクロピペットの場合を記してある。