



上 DNA実験の基本をマスターする

改訂第3版 序 田村隆明

初版 序 田村隆明

第1章 実験をはじめるにあたって

田村隆明 14

1 遺伝子実験とは	14
2 実験を組み立ててみる	14
3 実験法選択の基準	16
4 実験の上手な人はどこが違うのか	16
5 実験材料を準備する	17
6 遺伝子組換え実験関連法規	18

第2章 DNA実験の基本

田村隆明 21

1 実験機具、機器	21
2 溶液	25
① 実験で使う水 ② 準備する溶液 ③ 溶液の作り方	
3 濃度と単位	26
4 滅菌操作	27
5 DNAの取扱い	31
① 一般的な注意点 ② DNAを溶かす溶液	
6 DNAの検出と定量	33
① DNAの紫外線吸収能 ② 分光光度計 ③ エチジウムプロマイド	
7 DNAの濃縮	35
7-1 エタノール沈殿	35
7-2 イソプロパノール沈殿	37
7-3 有機溶媒で濃縮する	37
8 DNAの精製	38
8-1 フェノール抽出	38
① Tris/フェノールの調製 ② フェノール抽出の実際	
8-2 フェノール/クロロホルム抽出	40
8-3 DEAE-セルロース	40
8-4 ゲルfiltration	41

第3章 大腸菌の取扱い

田村隆明 43

1 はじめに	43			
2 大腸菌について	43			
① 大腸菌とは				
② 大腸菌の遺伝子型と菌株				
3 培養の準備	45			
① 培地の種類	② 培地添加物	③ 培養容器	④ インキュベーターとシェーカー	
⑤ 減菌と殺菌	⑥ 植菌器具	⑦ 実験台のセットアップ		
4 培地の作製	56			
① 培地の基礎知識	② LB 培地の作製	③ LB プレートの作製	④ M9 培地の作製	
5 いろいろな培養法	64			
5-1 液体培地での培養	64			
① 少量培養	② 大量培養			
5-2 プレート培養	67			
① 培地の乾燥	② 画線培養	③ 塗り広げ培養	④ 注ぎ込み培養	
⑤ マスタープレート作製	⑥ スポット培養			
5-3 大腸菌の増殖	72			
5-4 培養後の後処理	73			
6 菌株の保存と輸送	73			
① プレート保存	② グリセロールストック	③ スタブ保存	④ 凍結乾燥法	⑤ 輸送方法

第4章 バクテリオファージの取扱い

与五沢真吾 76

1 はじめに	76
2 ファージ力値の測定（plaques assay）	76
3 ファージの増殖	78
4 ファージDNAの調製	80

第5章 プラスミドDNAの增幅と精製 – DNAを増やす

与五沢真吾 83

1 プラスミドとは	83
1-1 プラスミドの基礎知識	83
1-2 プラスミドベクターの選択	84
2 プラスミドの調製	84
2-1 プラスミド調製の原理	85
2-2 ポイルプレップ	85
2-3 アルカリプレップ	87
① ミニスケール (2 mL)	② ラージスケール (800 mL)
3 ポリエチレングリコール (PEG) によるプラスミド精製	95
4 市販のキットを使ったプラスミド精製	96
5 形質転換（トランスフォーメーション）	99
5-1 コンピテントセルの作製	99
① 塩化カルシウム法によるコンピテントセルの作製	
② エレクトロポレーション用コンピテントセルの作製	
5-2 形質転換（トランスフォーメーション）	103
① 塩化カルシウム法によるコンピテントセルを用いた形質転換	
② エレクトロポレーション法による形質転換	

第6章 核酸の酵素処理 – DNAを加工する

106

1 はじめに	中太智義	106
2 制限酵素処理	中太智義	107
2-1 制限酵素とその特性		107
① 制限酵素とは ② 認識配列 ③ 断片末端の構造 ④ 反応条件		
2-2 制限酵素反応の実際		110
① 基本的な反応 ② 異なる制限酵素で切斷する場合 ③ その他の注意点		
2-3 DNAをマッピングする		115
3 リガーゼ	中太智義	117
3-1 DNAリガーゼ		117
3-2 T4 DNAリガーゼの性質		117
3-3 キットについて		118
4 DNA修飾酵素	中太智義	119
4-1 アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase)		119
4-2 DNAメチラーゼ (DNA methylase)		120
4-3 クレノーフラグメント (Klenow fragment)		121
4-4 バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ (Bacteriophage T4 DNA polymerase)		121
4-5 バクテリオファージT4ポリヌクレオチドキナーゼ (Bacteriophage T4 polynucleotide kinase : T4 PNK)		122
5 ヌクレアーゼ	田村隆明	122
5-1 S1ヌクレアーゼ		123
5-2 Mung Beanヌクレアーゼ		123
5-3 Bal31ヌクレアーゼ		123
5-4 DNase I (デオキシリボヌクレアーゼ I)		124
5-5 エキソIIIヌクレアーゼ		124
5-6 ラムダエキソヌクレアーゼ		124
5-7マイクロコッカルヌクレアーゼ		124
5-8 RNase H		125
6 DNA合成酵素	田村隆明	125
6-1 末端デオキシヌクレオチド転移酵素		125
6-2 逆転写酵素		125

第7章 DNA断片のサブクローニング – 目的のDNAを手に入れる

126

1 サブクローニングの流れ	中太智義	126
2 インサートDNAの用意	中太智義	128
3 ベクターの準備	中太智義	130
3-1 制限酵素の選択とベクターの末端形状		130
3-2 脱リン酸化処理		130
3-3 ベクター調製の実際		132
4 ライゲーション	中太智義	133
5 インサートDNAの修飾・変換	中太智義	135
5-1 リンカーライゲーション		135
5-2 メチル化DNAを用いたリンカーライゲーション		139
5-3 突出末端の平滑化		141
5-4 DNAを削る		143
6 トランスフォーメーション(形質転換する)	中太智義	146

7 インサートDNAのチェック	146
7-1 プラスミドの精製と制限酵素処理によるインサートチェック	中太智義 147
7-2 カラーセレクション	中太智義 148
7-3 PCRによるチェック	青木 務 150

第8章 アガロースゲル電気泳動－大きなDNA断片の分離 153

1 電気泳動の原理と種類	田村隆明 153
2 アガロースを選択する	田村隆明 156
3 試薬の調製	田村隆明 156
4 電気泳動の実際	田村隆明 158
① 通常ゲルの場合 ② ミニゲル (MuPip [®]) を用いる方法	
5 DNAの検出	160
5-1 エチジウムプロマイドによるDNAの検出	田村隆明 160
5-2 エチジウムプロマイドを含むアガロースゲルによるDNAの分離	田村隆明 161
5-3 SYBR [®] Green染色を用いたDNAの染色	小池千加 162
6 アガロースゲルからのDNAの回収	田村隆明 163
6-1 GENECLEAN [®] を用いる方法	163
6-2 QIAGENのスピンカラムを使う方法	165
6-3 それ以外のDNA回収方法	166

第9章 ポリアクリルアミドゲル電気泳動－小さなDNA断片の分離 小池千加 168

1 ポリアクリルアミドゲルについて	168
2 試薬の調製	168
3 ゲルの作製	168
4 電気泳動の実際	171
5 DNAの検出	172
6 ポリアクリルアミドゲルからのDNAの回収	173

第10章 PCR法－DNAを試験管内で増やす 青木 務 175

1 PCR法の原理	175
2 プライマーのデザイン	177
2-1 Tmとプライマーのデザイン	177
2-2 構造上避けるべきデザイン	178
2-3 その他のデザイン上の注意点	179
2-4 nested プライマー	179
3 耐熱性ポリメラーゼの選択	180
3-1 pol I型DNAポリメラーゼ	180
3-2 α型DNAポリメラーゼ	181
3-3 混合型DNAポリメラーゼ (LA-PCR用ポリメラーゼ)	182
3-4 Hot start用DNAポリメラーゼ	182
4 PCR反応の実際	183
4-1 PCRに用いられる機器の分類	184
① 温度管理方式による分類 ② オイルフリーかどうか ③ 使用チューブ(プレート)の違い ④ 冷却方式の違い	

4-2 PCR 反応液の組成	185
4-3 サイクルの設定	186
① プライマーのアニール温度 ② 各ステップの時間 ③ サイクル数 ④ 代表的なPCRサイクル ⑤ 修飾を加えたサイクル	
4-4 PCR 反応の例	189
4-5 コンタミネーションの防止について	190
① 試薬 ② ピペッティング ③ ネガティブコントロール	
4-6 Hot start	192
① 後から成分を添加する方式 ② ワックスで隔壁を作る方式 ③ Hot start用ポリメラーゼを用いる方式	
5 PCR 産物のサブクローニング	195
5-1 PCR 産物の精製	196
5-2 平滑末端化	197
5-3 TA クローニング法	199
① TAベクターの作製 ② TAベクターへのサブクローニング	
5-4 制限酵素認識配列の付加	202
① プライマーのデザイン ② 制限酵素サイトへのサブクローニング	
● テーマ別トピック	205
● 付録 実験で役立つ便利なデータ集	田村隆明 215
1. 汎用溶液の組成と調製	215
2. 主なプラスミドベクター	218
3. マスタープレート用台紙	219
4. 主な制限酵素の性質	220
5. DNA分子量マーカーの泳動パターン	223
6. 主なバッファーの組成表	224
7. 遠心回転数と重力加速度	225
8. 遺伝コード	225
9. ヌクレオチドデータ	225
10. DNAに関する換算式	225
11. カルタヘナ法の概要（二種使用等に関連するものについて）	226
● 索引	228

下巻：遺伝子の発現・機能を解析する 目次

第1章 DNA シークエンシング (遺伝子の配列を読む)	6. リアルタイムPCR 7. DNAマイクロアレイ
1. はじめに 2. アイソトープを用いるジデオキシ法（サンガー法） 3. オートシークエンサー（ABI 310について）	第6章 動物細胞へのDNA導入 (遺伝子のはたらきを調べる①)
第2章 プローブ作製法 (遺伝子検出のアイテムをつくる)	1. DNA導入の基礎知識 2. リポフェクション法 3. エレクトロポレーション 4. ヌクレオフェクション 5. リン酸カルシウム法
1. 二本鎖DNAプローブ 2. 末端標識プローブ 3. RNAプローブ 4. 合成オリゴヌクレオチドプローブ 5. カラムを用いたプローブの精製	第7章 RNAiによる遺伝子抑制 (遺伝子のはたらきを調べる②)
第3章 ゲノムDNAの解析 (遺伝子構造を調べる)	1. はじめに 2. RNAi実験の準備 3. siRNAの調製 4. RNAi用ベクターの作製 5. 細胞へのRNAi用核酸の導入
1. ゲノムDNAの調製 2. サザンブロッティング	第8章 遺伝子情報の取得と解析 (バイオデータベースを活用する)
第4章 RNAの取扱いと調製 (遺伝子発現解析の準備)	1. はじめに 2. データベースへのアクセス－配列情報の取得 3. ホモロジー（相同性）検索 4. おわりに
1. RNAの取扱いについて 2. RNAの抽出 3. ポリA+RNAの精製	● テーマ別トピック ● 付録 (インターネットを利用した情報収集)
第5章 遺伝子発現の解析	
1. はじめに 2. ノーザンブロッティング 3. RNaseプロテクションアッセイ 4. RT-PCR法 5. RACE法	