



改訂
第3版

遺伝子工学実験ノート

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 エチジウムブロマイド	
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 ゲル濾過	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 滅菌と殺菌 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 ファージカ価の測定（プラークアッセイ）	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の増幅と精製 – 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 ボイルプレップ	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断する場合 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・改変	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 (MuPid [®]) を用いる方法	
5	DNAの検出	160
5-1	エチジウムブロマイドによるDNAの検出	田村隆明 160
5-2	エチジウムブ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нка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	T _m 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	

● トラブルシューティング	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**

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