

下 遺伝子の発現・機能を解析する

第1章 DNAシークエンシング 一遺伝子の配列を読む

14

1 はじめに	松浦 徹	14
2 アイソトープを用いるジデオキシ法（サンガー法）	松浦 徹	14
2-1 原理		15
2-2 実際の手順		17
3 オートシークエンサー（ABI 310について）	松浦 薫	21
① セットアップ ② ランの開始 ③ データ解析 ④ プリントアウトまたはデータの保存		
⑤ メンテナンス		

第2章 プローブ作製法 一遺伝子検出のアイテムをつくる

小西慶幸 31

1 二本鎖DNAプローブ		32
1-1 ランダムプライマー法		33
2 末端標識プローブ		34
2-1 T4 ポリヌクレオチドキナーゼによる標識		34
2-2 クレノーフラグメントによる標識		36
2-3 T4 DNAポリメラーゼによる標識		38
3 RNAプローブ		39
4 合成オリゴヌクレオチドプローブ		41
5 カラムを用いたプローブの精製		41
5-1 ポリプレップカラムを用いた精製		42
5-2 スピンカラムを用いた精製		43

第3章 ゲノムDNAの解析 一遺伝子構造を調べる

45

1 ゲノムDNAの調製	田村隆明	45
1-1 SDS/フェノール法による精製		46
1-2 DNA精製用キットを用いる精製		49
2 ササンプロッティング	嶋田美穂	50
2-1 制限酵素による断片化		51
2-2 アガロース電気泳動		52
2-3 プロッティング		54
① キャピラリープロッティング ② エレクトロプロッティング		
2-4 ハイブリダイゼーション		60

第4章 RNAの取扱いと調製 一遺伝子発現解析の準備

64

1 RNAの取扱いについて	田村隆明	64
1-1 RNA実験の前に		64
① RNAの物質的特徴 ② 留意すべき事柄		
1-2 実験にとりかかる		65
① 実験室とベンチ周辺の整備 ② 器具、試薬を準備する		
2 RNAの抽出		67
2-1 出発材料の準備	青木 務	67
① 培養細胞の破碎 ② 細胞の破碎		
2-2 AGPC法による抽出	青木 務	73
2-3 細胞質RNAの抽出法 (Nonidet® P-40を用いた抽出法)	青木 務	77
2-4 RNeasy®キットを用いた方法	嶋田美穂	81
2-5 TRIzol®を使う方法	田村隆明	84
2-6 セシウム-超遠心法によるRNAの大量抽出	青木 務	87
3 ポリA⁺RNAの精製	青木 務	92
3-1 Oligo-dT30 ラテックスビーズを用いる方法		92
3-2 Oligo-dTセルロースを用いたカラムクロマトグラフィー		95

第5章 遺伝子発現の解析

100

1 はじめに	青木 務	100
2 ノーザンプロッティング	青木 務	101
2-1 泳動とプロッティング		102
2-2 ハイブリダイゼーション		106
3 RNaseプロテクションアッセイ	嶋田美穂	108
4 RT-PCR法	青木 務	115
① RNAの抽出 ② 逆転写反応 ③ PCR反応		
5 RACE法	青木 務	117
5-1 5'RACE法の原理		118
5-2 TdTを用いた5'RACE法		119
① 逆転写反応 ② プライマーの除去 ③ ホモポリマーの付加 (Tailing) ④ PCR反応		
⑤ PCR産物の検出と回収		
5-3 3'RACE法		125
6 リアルタイムPCR	小池千加	126
6-1 リアルタイムPCRの原理		126
① SYBR® Green (サイバーグリーン) 法 ② TaqMan® (タックマン) 法		
6-2 リアルタイムPCRと必要な準備		128
① プライマー、プローブの設計 ② RNAサンプルのDNase処理		
③ cDNA合成 ④ リアルタイムPCR		
6-3 解析方法		134
① 標準曲線の作成 ② 融解曲線解析 ③ Threshold line		
④ Comparative Ct法 ($\Delta\Delta Ct$ 法)		



7 DNAマイクロアレイ	関 直彦	138
7-1 DNAマイクロアレイ開発の歴史		138
7-2 DNAマイクロアレイの基礎知識		139
① DNAマイクロアレイの種類と原理		
② DNAマイクロアレイを用いた遺伝子解析研究の組み立て方		
7-3 DNAマイクロアレイによる遺伝子解析の流れ		141
7-4 DNAマイクロアレイを用いたゲノム医学解析への応用例		143
7-5 DNAマイクロアレイの展望		145

第6章 動物細胞へのDNA導入 一遺伝子のはたらきを調べる① 147

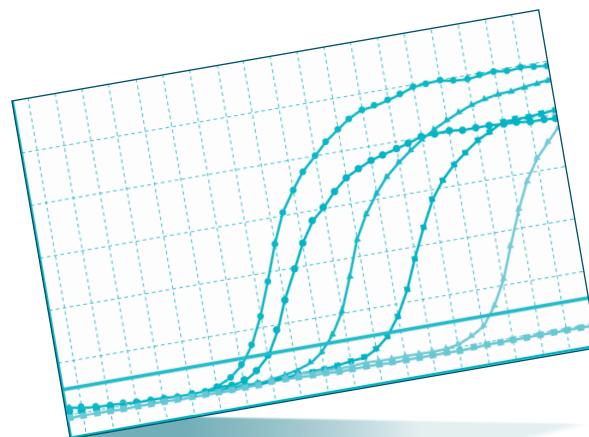
1 DNA導入の基礎知識	田中祐司	147
① はじめに		
② 細胞へのDNA導入の意義		
③ 細胞へのDNA導入方法の種類		
④ DNA導入を行う培養細胞について		
⑤ DNA導入効率の検討について		
2 リポフェクション法		150
2-1 原理	田中祐司	150
2-2 Lipofectamine TM 2000を用いる方法	田中祐司	151
2-3 HiliMaxを用いた方法	与五沢真吾	153
2-4 Fugene [®] 6を用いる方法	田中祐司	155
3 エレクトロポレーション	田中祐司	156
4 ヌクレオフェクション	田中祐司	158
5 リン酸カルシウム法	小西慶幸	159
5-1 原理		159
5-2 実験方法		160

第7章 RNAiによる遺伝子抑制 一遺伝子のはたらきを調べる② 163

1 はじめに	小西慶幸	163
1-1 背景と原理		163
1-2 RNAiの手法		164
① siRNA法		
② shRNA法		
2 RNAi実験の準備	小西慶幸	165
2-1 抑制配列の決定の基本		165
2-2 RNAi効果の評価方法		166
3 siRNAの調製		167
3-1 siRNA配列のデザイン	小西慶幸	167
3-2 Silencer [®] siRNA Construction Kitを用いる	白石征士	168
3-3 Stealth TM RNAi	小西慶幸	172
4 RNAiベクターの作製	小西慶幸	175
4-1 pSUPER RNAi System TM		175
4-2 それ以外のベクター		178
5 細胞へのRNAi用核酸の導入		178
5-1 導入方法の検討	小西慶幸	178
5-2 RNAi専用リポフェクション	与五沢真吾	179

第8章 遺伝子情報の取得と解析 一バイオデータベースを活用する 与五沢真吾 181

1 はじめに	181
2 データベースへのアクセス -配列情報の取得	181
2-1 特定遺伝子および遺伝子産物の情報 (DNA 塩基配列, アミノ酸配列等)	181
2-2 SNP 情報	184
2-3 プロモーター情報	186
2-4 スプライシング部位	189
3 ホモロジー (相同性) 検索	193
4 おわりに	199
● トラブルシューティング	200
● 付録 インターネットを利用した情報収集	210
与五沢真吾	210
● 索引	212





▶▶ 上巻：DNA実験の基本をマスターする 目次

第1章 実験をはじめるにあたって

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

第2章 DNA実験の基本

1. 実験機具、機器
2. 溶液
3. 濃度と単位
4. 減菌操作
5. DNAの取扱い
6. DNAの検出と定量
7. DNAの濃縮
8. DNAの精製

第3章 大腸菌の取扱い

1. はじめに
2. 大腸菌について
3. 培養の準備
4. 培地の作製
5. いろいろな培養法
6. 菌株の保存と輸送

第4章 バクテリオファージの取扱い

1. はじめに
2. ファージ力価の測定（plaques assay）
3. ファージの増殖
4. ファージDNAの調製

第5章 プラスミドDNAの増幅と精製 (DNAを増やす)

1. プラスミドとは
2. プラスミドの調製
3. ポリエチレンリコール(PEG)による
プラスミド精製
4. 市販のキットを使ったプラスミド精製
5. 形質転換（トランスフォーメーション）

第6章 核酸の酵素処理 (DNAを加工する)

1. はじめに
2. 制限酵素処理
3. リガーゼ
4. DNA修飾酵素
5. ヌクレアーゼ
6. DNA合成酵素

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)

1. サブクローニングの流れ
2. インサートDNAの用意
3. ベクターの準備
4. ライゲーション
5. インサートDNAの修飾・変更
6. トランスフォーメーション（形質転換する）
7. インサートDNAのチェック

第8章 アガロースゲル電気泳動

(大きなDNA断片の分離)

1. 電気泳動の原理と種類
2. アガロースを選択する
3. 試薬の調製
4. 電気泳動の実際
5. DNAの検出
6. アガロースゲルからのDNAの回収

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)

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

第10章 PCR法 (DNAを試験管内で増やす)

1. PCR法の原理
2. プライマーのデザイン
3. 耐熱性ポリメラーゼの選択
4. PCR反応の実際
5. PCR産物のサブクローニング

● トラブルシューティング

● 付録 (実験で役立つ便利なデータ集)