

1 目的

細菌細胞からアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調整し、純度を検定する。

2 原理

プラスミドは、細胞内で宿主染色体とは独立して自律複製を行い、安定に遺伝する遺伝因子であり、実態は二本鎖環状の DNA 分子である。以下の試薬を用いてそれを抽出する。

○Solution I（菌体の懸濁のため）

50mM グルコース（DNA 分子の安定化のため）

10mM EDTA

25mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)

○Solution II（溶菌、染色体 DNA の変性のため）

0.2M 水酸化ナトリウム（染色体 DNA の変性のため）

1% SDS（溶菌、タンパク質変性のため）

○Solution III（染色体 DNA、膜各分の沈殿化のため）

3M 酢酸ナトリウム(pH4.8)

○TE 緩衝液（核酸懸濁用の緩衝液）

10mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)

1mM EDTA

○フェノール・クロロホルム(1:1)液（除タンパク質のため）

○95%エタノール水溶液（塩存在下で核酸を沈殿化するため）

○75%エタノール水溶液（核酸沈殿のリンス）

○RNase 溶液（RNA の加水分解のため）

10mg/mL RNaseA

10mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)

15mM NaCl

3 実験方法

3.1 使用器具・機器

- ・アイスバス(発泡スチロール) 1個/4人
- ・サンプルチューブ(1.5mL) 4本/1人
- ・ピペットマン(マイクロピペッター) 20 μ L用、200 μ L用各1本、1000 μ L用適宜
- ・ピペットマン用イエローチップ(20、200 μ L用)、ブルーチップ(1000 μ L用)
- ・ピペットマンチップ回収用ビーカー
- ・ミキサー
- ・卓上遠心分離機
- ・フェノール・クロロホルム廃液瓶 1瓶/4人

3.2 実験操作

1. プラスミドを保持する大腸菌の一晩培養液(1.4mL)を、10,000rpmで1分間遠心した。
2. 上清(以下 sup = supernatant)をアスピレーターで除き、沈殿(以下 ppt = precipitate)を100 μ LのSolution Iにミキサーを用いて完全に懸濁した。
3. 200 μ LのSolution IIを加え、やさしく混合した。
4. アイスバス上で5分間静置した。
5. 150 μ LのSolution IIIを加え、やさしく混合した。
6. アイスバス上で5分間静置した。
7. 15,000rpmで10分間遠心した。
8. supを予め150 μ Lのフェノール・クロロホルム(1:1)液を取り分けたサンプルチューブに移し、約3分間よく混合した。
9. 7,000rpmで3分間遠心した。
10. 水層の約300 μ L(150 μ Lを2回)を、予め1,000 μ L(1,000 μ Lで1回、または200 μ Lを5回)の氷冷95%エタノールを取り分けたサンプルチューブに移し、よく混合した。
11. 12,000rpmで5分間遠心した。
12. supはアスピレーターで吸い取り、pptには400 μ Lの70%エタノールを加えた(リンス)。
13. 12,000rpmで1分間遠心した。
14. supをアスピレーターで除き、スピンドダウンした。supを完全に除いたら、キャップを開けてドラフト内でpptを自然乾燥させた。
15. 100 μ LのTE緩衝液に懸濁した。よく混合したのち、スピンドダウンした。
16. 1 μ LのRNase溶液を加え、緩やかに混合した。
17. 37°Cの湯浴内で約45分保温した。

18. 100 μ L のフェノール・クロロホルム(1:1)液を加え、よく混合した。
19. 7,000rpm で3分間遠心した。
20. 水層を新しいサンプルチューブに移し、10 μ L の3M 酢酸ナトリウム液を加えて混合した。次に、300 μ L の氷冷95%エタノールを加え、よく混合した。
21. 12,000rpm で5分間遠心した。
22. sup をアスピレーターで吸い取り、ppt に400 μ L の70%エタノールを加えた。
23. 12,000rpm で1分間遠心した。
24. sup をアスピレーターで除き、スピンドウンした。sup を完全に除いたら、キャップを開けてドラフト内でppt を自然乾燥させた。
25. 100 μ L のTE 緩衝液に懸濁した。よく混合したのち、スピンドウンした。
26. このうち10 μ L を新しいサンプルチューブに移し、TE 緩衝液290 μ L と混合して30倍希釈しスピンドウンした。そして吸光度 A_{260} 、 A_{280} 、 A_{320} を測定した。

4 結果

4.1 各操作における様子及びスケッチ

・手順1

遠心分離後、薄黄色の溶液の下に黄白色の沈殿物が見られた。また、大腸菌特有の匂いがした。

図1 サンプルチューブのスケッチ その1

・手順2

Solution I で懸濁後、溶液は白濁した。

図2 サンプルチューブのスケッチ その2

・手順3

Solution II を混合した後、白濁は少し薄くなった。粘り気があった。

図3 サンプルチューブのスケッチ その3

・手順4

アイスバスで静置後、白濁はさらに薄くなり、粘り気は増した。大腸菌特有の匂いもした。

図4 サンプルチューブのスケッチ その4

・手順5

SolutionIII混合後、白い生成物が生じ、溶液がさらに白濁した。上の方が白色が濃かった。

図5 サンプルチューブのスケッチ その5

・手順6

アイスバスで静置後、手順5の時より白濁が濃くなっていた。

図6 サンプルチューブのスケッチ その6

・手順7

遠心後、溶液は透明になり、黄白色の沈殿物が見られた。

図7 サンプルチューブのスケッチ その7

・手順 8

sup をフェノール・クロロホルム(1:1)液と混合後、溶液は黄白色になった。

図 8 サンプルチューブのスケッチ その 8

・手順 9

遠心後、下から順に、黄白色、白色、無色の 3 つの層に分離した。

図 9 サンプルチューブのスケッチ その 9

・手順 10

水層とエタノールと混合後、溶液はほぼ無色透明になった。

図 10 サンプルチューブのスケッチ その 10

・手順 11

遠心後、無色透明の溶液の下に、白色の沈殿物が見られた。

図 11 サンプルチューブのスケッチ その 11

・手順 12

ppt にエタノールを加えた後、手順 11 のものと変化は見られなかった。

・手順 13

遠心後、手順 12 のものと変化は見られなかった。

・手順 14

自然乾燥後、透明がかった白色の固形物が見られた。

図 12 サンプルチューブのスケッチ その 12

・手順 15

TE 緩衝液に懸濁後、溶液はほぼ無色透明になった。

図 13 サンプルチューブのスケッチ その 13

・手順 16

RNase 溶液を加えて混合後、色に変化は見られなかったが、表面張力は強くなっていた

図 14 サンプルチューブのスケッチ その 14

・手順 17

保温後は特に変化は見られなかった。

・手順 18

フェノール・クロロホルム(1:1)液と混合後、溶液は若干白濁した。

図 15 サンプルチューブのスケッチ その 15

・手順 19

遠心後、液体は下から順に黄白色、無色の層に分かれた。層の合間には白い生成物が見

られた。

図 16 サンプルチューブのスケッチ その 16

・手順 20

水層と 3M 酢酸ナトリウム液を加えて混合後、溶液は若干白濁した。

図 20 サンプルチューブのスケッチ その 20

・手順 21

遠心後、サンプルチューブの側面に白い生成物が見られた。溶液は無色であった。

図 21 サンプルチューブのスケッチ その 21

・手順 22

ppt にエタノールを加えてリンス後、生成物は溶け、溶液はほぼ無色のままだった。

図 22 サンプルチューブのスケッチ その 22

・手順 23

遠心後、サンプルチューブの側面に白い生成物が見られた。

図 23 サンプルチューブのスケッチ その 23

・手順 24

少量の DNA が見られた。

図 24 サンプルチューブのスケッチ その 24

4.2 吸光度の測定結果

測定した吸光度は以下ようになった。1 回目の測定結果では数値が低すぎるという指摘を受けたので 2 回測定した。

表 1. 吸光度の測定結果

	A_{260}	A_{280}	A_{320}
1 回目	-0.0049	-0.0223	-0.0429
2 回目	0.0163	-0.0011	-0.0278

教員に確認して頂いたところ、2 回目の方が良いと言われたので、以降は 2 回目の測定結果を元に述べていく。

まず、希釈前の濃度を計算した。 $A_{260} = 1$ のとき濃度は $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ より、

$$(0.0163 - (-0.0278)) \times 0.05 \times 30 \cong 0.0662 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

と算出できた。

また、 A_{260}/A_{280} の値は、

$$\frac{0.0163 - (-0.0278)}{(-0.0011) - (-0.0278)} = 1.65$$

と算出できた。

5 考察

吸光度が低かったのは、操作 22、24 において、アスピレーターで沈殿物も sup と一緒に吸ってしまったか、スピンドダウンが不十分であった可能性が考えられる。

Solution II に含まれる SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)は、その変性界面活性剤としての性質をもって、細胞膜を完全に破壊し、その中のタンパク質成分を変性させる。

タンパク質は、水溶液中においては、疎水性のアミノ酸を内側に、親水性のアミノ酸を外側に向けて構成されている。そのため、熱や酸、塩基にさらされると、その構造は壊れてしまう。フェノールも同様に、作用させると構造が変わり、疎水性のアミノ酸外側に出てきて水溶性がなくなり、沈殿物として生成することができる。フェノールと同時にクロロホルムも加えるのは、水槽に残ったフェノールを有機物であるクロロホルムの層に移動させるためである。のちにエタノールを加えることで、これも除去している。

核酸は、そのリン酸による負の電荷を帯びているため、極性があり、水溶性がある。しかし、エタノールには不溶である。そこで、エタノール溶液に核酸が溶けている溶液を加えると、核酸を沈殿させることができる。しかし、その帯びている電荷のためお互いに反発して沈殿ができないことがあるため、核酸の電荷を中和するという意味で、塩存在下で行う必要があった。

DNA を構成しているヌクレオチドにある塩基、すなわちアデニン、グアニン、シトシン、チミンの最大吸光度は、それぞれ 259nm,267nm,253nm,267nm である。よって核酸もそれらの平均と近い波長 260nm で吸光度を測定できた。

A_{260}/A_{280} の値によって純度を検定できたのは、 A_{260} は核酸における吸光度であり、 A_{280} はタンパク質における吸光度であるからだ。

6 参考文献

- ・ 編纂・自然科学研究機構国立天文台 『理科年表 平成 28 年』 丸善出版
- ・ 著・Bruce Alberts 他 『Essential 細胞生物学』 南江堂出版