

1 目的

実験 C で調整したプラスミド DNA を制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動法により分離する。電気泳動の際には、サイズが既知のサンプルと同時に流すことで、DNA 断片のサイズを求め、プラスミド DNA の全長を推定する。

2 原理

制限酵素とは DNA 中の特定の塩基配列を認識して、そこに切れ目を入れる酵素である。そして制限酵素の種類によって切断する回数も違う。今回は pBR322DNA に 2 種類の制限酵素を入れ、電気泳動をする。

アガロースゲル電気泳動は、寒天の主成分であるアガロースを使用する電気泳動である。その移動距離は、分子量が大きいほど流れにくいために短くなり、小さいものほど流れやすいので長くなる。この時、色素は DNA の隙間に入り込み、紫外線等の励起光を照射すると蛍光を発する。この蛍光の強さは DNA の分子の長さや量に比例する。

3 実験方法

3.1 使用器具、使用機器

- ・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) 3 本/1 人
- ・ピペットマン(マイクロピペッター) 20 μ L 用 1 本/2 人
- ・ピペットマン用イエローチップ
- ・湯浴(37°C)
- ・電気泳動装置
- ・定規
- ・卓上遠心分離機
- ・ポロライドカメラ
- ・4 単位の片対数グラフ

3.2 試薬

- | | |
|---------------|-------------------|
| ・ M 緩衝液 | ・ 色素水溶液(電気泳動用緩衝液) |
| 10mM トリス塩酸緩衝液 | 0.05% BPB |
| 10mM 塩化マグネシウム | 1% SDS |
| 1mM DTT(還元剤) | 30% グリセロール |
| 50mM 塩化ナトリウム | |

- ・制限酵素 *HincII*、*PvuII*
- ・滅菌水
- ・1%アガロースゲル(1 μ g/mL)

3.3 実験操作

- ①実験 C で単離した DNA サンプルは室温で解凍した後、よく混合し、軽くスピンドウンした。
- ②下記の組成で、37°Cの湯浴中で 30 分間切断を行い、終了したら色素水溶液を 3 μ L 加え、よく混合し、軽く遠心した後、氷上に置いておいた。

| | |
|-------------------------------------|--------------|
| 実験 C で単離した DNA サンプル | 7.5 μ L |
| 10 倍濃度(10x)M 緩衝液 | 1.5 μ L |
| 制限酵素 <i>HincII</i> または <i>PvuII</i> | 0.75 μ L |
| 滅菌水 | 5.25 μ L |
| <hr/> | |
| Total | 15 μ L |

- ③サイズマーカーDNA(10 μ L)とともに 1%アガロースゲル電気泳動(100V、1 時間程度)を行った。この時、未切断 DNA 5 μ L + 色素水溶液 2 μ L も横に流した。
- ④イメージアナライザーImageQuant LAS4000 で画像を撮影していただいた。
- ⑤サイズマーカー・レーン及び切断 DNA サンプルを流したレーンの DNA 断片の移動度(cm)を定規で測定した。
- ⑥片対数グラフの横軸を電気泳動の移動度(cm)、縦軸を DNA の大きさ(bp)として、サイズマーカーDNA の検量線を作成した。
- ⑦検量線の直線領域を求めた。pBR322 の各切断 DNA 断片の大きさ(bp)を検量線から読み取り、pBR322 の全長(bp)を求めた。

4 実験結果

実験操作④について、画像はレポート末尾に添付した。

実験操作⑤における、DNA 断片の移動度(cm)の測定結果は、以下の表にまとめた。

表 1. DNA 断片の移動距離

| 塩基対数(bp) | 移動距離(cm) |
|----------|----------|
| 10000 | 1.38 |
| 8000 | 1.50 |
| 6000 | 1.73 |
| 5000 | 1.92 |
| 4000 | 2.11 |
| 3000 | 2.49 |
| 2500 | 2.74 |
| 2000 | 3.08 |
| 1500 | 3.58 |
| 1000 | 4.18 |
| 750 | 4.59 |
| 500 | 5.12 |
| 250 | 5.85 |

これを元に作成した検量線はこのレポートの末尾に添付した(図 1)。

これから読み取ると、検量線の直線領域は、700bp～3500bp であった。

また、各切断 DNA 断片の移動距離は、未切断のものは 2.75cm、*HincII* で切断したものは 2.30cm と 3.95cm、*PvuII* で切断したものは 2.00cm であった。これらのそれぞれの DNA 断片大きさを検量線から読み取った結果を以下の表にまとめた。

表 2. 各 DNA 断片の大きさ

| DNA の状況 | 移動距離(cm) | 塩基対数(bp) |
|-------------------|----------|----------|
| 未切断 | 2.75 | 2550 |
| <i>HincII</i> で切断 | 2.30 | 3380 |
| | 3.95 | 1120 |
| <i>PvuII</i> で切断 | 2.00 | 4400 |

これより、*Hinc*II で切断したものは 2 カ所で切断され、DNA 断片は二つあることが分かり、元の pBR322 の全長は、

$$3380 + 1120 = 4500 \text{ bp}$$

である。これは *Pvu*II で切断したものとほぼ一致する。

5 考察

5.1 DNA の構造

原理より、CCC(閉環状)、OC(開環状)、直線状のうち、直線状のものが一番大きいために、電流は流れにくいと言える。これは実験結果より、*Pvu*II で切断したものが直線状であると考えられる。また、*Hinc*II で切断したのもも直線状であると考えられる。*Hinc*II で切断した DNA の二つの塩基対数の数を足し合わせると *Pvu*II で切断したものとほぼ一致するからだ。

未切断 DNA は、は電気泳動をしたものの中で一番塩基対数が小さく、その色の濃さは *Hinc*II で切断したもののうち、塩基対数が小さい方とほぼ同じである。未切断にもかかわらず塩基対数が 2550bp であるのに対し、直線状である *Pvu*II で切断した DNA は 4400bp であることから、直線状ではないことは明らかである。色素は DNA の隙間に入り込むということだが、CCC と OC では、その構造の複雑さから CCC はあまり入り込めず、OC は直線状と同じくらい入り込めると考えられる。電気泳動は、未切断 DNA は 5 μ L、切断した DNA は 7.5 μ L で行った。それを考慮しても未切断 DNA のバンドの色の濃さは直線状のものより非常に薄い。これは DNA の構造が複雑だったために色素が入り込めなかったためである。したがって、未切断 DNA は閉環状であると考えた。

5.2 検量線について

検量線は、直線領域と、そうでない領域がある。図 1 をみると、移動距離が短いほど、塩基対数は大きいほうにずれ、移動距離が長いほど、塩基対数は小さいほうにずれている。

写真や検量線をみると、塩基対数、つまり分子の大きさが大きくなると、その移動距離は短く、ほぼ変わらなくなっている。オームの法則 $I = V/R$ より、抵抗すなわち分子の大きさが大きくなると、反比例的に電流が流れなくなり移動距離は小さくなる。これが、検量線が移動距離が短い領域は、塩基対数は大きいほうにずれている理由である。

これに対し、塩基対数、つまり分子の大きさが小さくなると、その移動距離は長くなっている。これもオームの法則 $I = V/R$ と照らし合わせると、分子の大きさすなわち抵抗が小さ

くなると、反比例的に電流値はおおきくなり、移動距離は長くなる。これが、移動距離が長い領域が、塩基対数は小さいほうにずれている一因であると考えた。

また、マーカー色素移動度も影響していると考えた。株式会社ニッポン・ジーンの HP に記載されている、ゲル電気泳動マーカー色素移動度の目安によると、1%アガロースゲル電気泳動における BPB の移動度の目安は約 900bp とあった。タカラバイオ株式会社の HP に記載されている、BPB および XC のアガロース各濃度における移動度によると、1%アガロースゲル電気泳動における BPB の移動度は 650bp とあった。図 1 をみると、直線領域は 700~3500bp である。塩基対数が小さい領域が直線でないのは、色素の移動度外であるという理由もあるのではないかと考えた。

6 参考文献・HP

・『Essential 細胞生物学 原書第 4 版』 南江堂出版

・コスモ・バイオ株式会社

URL:http://www.cosmobio.co.jp/product/detail/agarose-gel-electrophoresis.asp?entry_id=14478

・株式会社ニッポン・ジーン 遺伝子工学研究用試薬

URL:https://www.nippongene.com/siyaku/product/buffer/electrophoresis/data_mobilities-dyes.html

・タカラバイオ株式会社

URL: http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100007890