

6/2(日)開催 身近な食べ物のDNAを見てみよう プロトコル

主催:iGEM Grand Tokyo

協賛:株式会社リバネス

[実験1]

<納豆菌のDNA抽出>

[試薬・材料]

納豆	1/4パック
DNA抽出液	計50ml
- 水	45ml
- 中性洗剤	5ml
- NaCl	5g
エタノール(冷却済み)	20ml
割り箸	1膳
TEバッファー	500μl
100mlビーカー	2個
1.5mlチューブ	1個

[方法]

1. 納豆が入っているビーカーにDNA抽出液を50ml加える。
2. 割り箸で静かに混ぜ5分ほど待つ。
3. 豆を避けて、ピペットで液体のみ10ml程度別のビーカーに移す。
4. 移した液にエタノール20mlを静かに流し入れ、二層に分かれることを確認する。
5. 上澄みのエタノール層の糸状DNAを割り箸で採取し新たな2mlチューブに移し、室温、10000rpmで20~30秒程度遠心する
※バランスを取る、チューブの蓋の固定部分が外側を向くように配置する。
6. 遠心後の上澄み液をマイクロピペットでそっと吸い上げ、極力取り除く。
※沈殿したDNAに触れないようにする
7. TEバッファーを100μl入れ、チップの先で混ぜ溶かす。混ぜたらさらに400μl加える。

<ブロッコリーのDNA抽出>

[試薬・材料]

ブロッコリー	100g程度
DNA抽出液	計50ml
- 水	45ml
- 中性洗剤	5ml
- NaCl	5g
エタノール(冷却済み)	20ml
割り箸	1膳
TEバッファー	500μl
100mlビーカー	2個
1.5mlチューブ	1個

[方法]

1. ブロッコリーが入っているビーカーにDNA抽出液を50ml加える。
2. 割り箸で静かに混ぜ5分ほど待つ。
3. 遠心機にかけ、固形物を落とす。上澄みのみ別のビーカーに移して固形物を除く。
4. 移した上澄みにエタノール20mlを静かに流し入れる。二層に分かれることを確認する。
5. 上にできたエタノール層の糸状DNAを採取する。マイクロピペットで2ml (2000μl)採取し、別の1.5mlチューブに入れる。室温、10000rpmで1分間遠心する。
6. 遠心後の上澄み液をマイクロピペットでそっと吸い上げ、極力取り除く。
※沈殿したDNAに触れないようにする
7. TEバッファーを100μl入れ、チップの先で混ぜ溶かす。混ぜたらさらに400μl加える。

[実験2]

<PCR実験>

<Template DNAの100倍希釈>

[試薬・材料]

MilliQ	198 μ l + 18 μ l
抽出したDNA	各2 μ l
1.5mlチューブ	4個

DNAの濃度により、電気泳動のバンドの濃さが変化するの観察するために希釈を変えたDNAでPCRする。

1. Milli-Q水を198 μ l入れる。
2. 抽出したDNAを2 μ l取り、3本線の書いてある1.5mlチューブに入れる。
(納豆は青、ブロッコリーはピンク)
3. 指でタッピングして混ぜ、1秒程度遠心する(蓋についた水滴を落とす。)

<Template DNAの1000倍希釈>

DNAの濃度により、電気泳動のバンドの濃さが変化するの観察するために希釈を変えたDNAでPCRする。

4. Milli-Q水を18 μ l入れる。
5. 抽出したDNAを100倍希釈したものを2 μ l取り、1.5mlチューブに入れる。
(納豆は青、ブロッコリーはピンク)
6. 指でタッピングして混ぜ、1秒程度遠心する(蓋についた水滴を落とす。)

<PCR溶液の作製>

[試薬・材料]

PCR Mix A - MilliQ - 2 \times gotaq - 納豆用FPrimer - 納豆用RPrimer	各22.5 μ l 9.5 μ l 12.5 μ l 0.25 μ l 0.25 μ l
PCR Mix B - MilliQ - 2 \times gotaq - ブロッコリー用FPrimer - ブロッコリー用RPrimer	各22.5 μ l 9.5 μ l 12.5 μ l 0.25 μ l 0.25 μ l
1/100 DNA	各5 μ l

1/1000 DNA	各5μl
0.2mlチューブ	7本

[方法]

PCR Mix A	計112.5μl
納豆のDNA (100倍希釈)	2.5μl
納豆のDNA (1000倍希釈)	2.5μl

1. PCR MixAを4本のチューブ(1-3、ナ)に22.5μlずつ分ける。

2. それぞれ以下のようにDNAを加えていく。

1 納豆のDNA (100倍希釈) 2.5μl

2 納豆のDNA (1000倍希釈) 2.5μl

3 枯草菌のDNA 2.5μl

ナ 用意された納豆菌のDNA 2.5μl

PCR Mix B	計112.5μl
ブロッコリーのDNA (100倍希釈)	2.5μl
ブロッコリーのDNA (1000倍希釈)	2.5μl

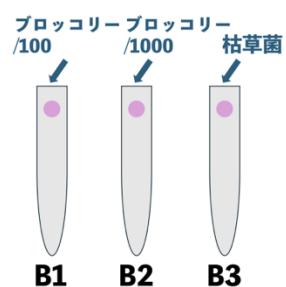
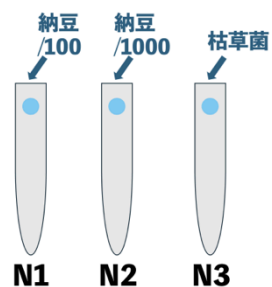
1. PCR MixBを3本のチューブ(1-3)に22.5μlずつ分ける。

2. それぞれ以下のようにDNAを加えていく。

1 抽出したブロッコリーのDNA (100倍希釈) 2.5μl

2 抽出したブロッコリーのDNA (1000倍希釈) 2.5μl

3 枯草菌のDNA 2.5μl



<PCR>

[試薬・材料]

PCR溶液	各25 μ l
サーマルサイクラー	1つ

1. 作製したPCR溶液の入った0.2mlチューブをサーマルサイクラーにセットする。
2. 以下のサイクル条件を設定し、実行する。

95°C 1分30秒

95°C 30秒

60°C 30秒

72°C 1分 ×30サイクル

72°C 5分

12°C キープ

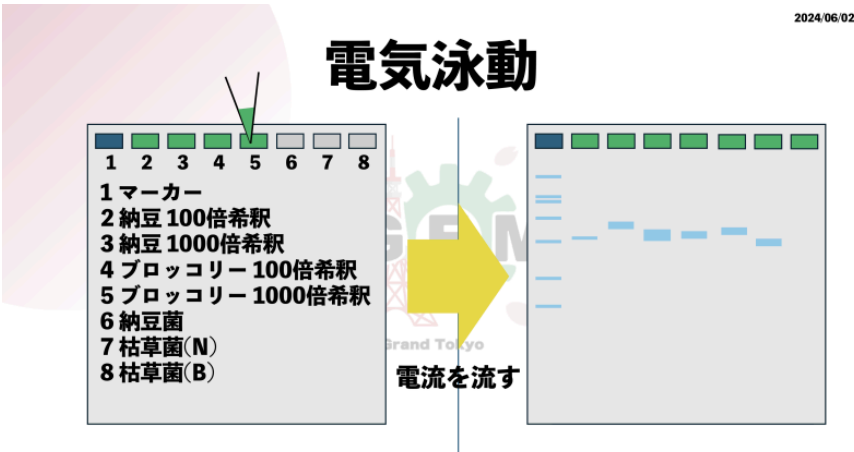
[実験3] 電気泳動

[試薬・材料]

PCR産物	5 μ l
DNAラダー	5 μ
2%アガロースゲル	1枚
TAEバッファー	ゲルが浸かるまで(400ml)
エチジウムブロマイド	20 μ l
電気泳動槽	1つ

[方法] ※バッファーに含まれているEtBr(エチジウムブロマイド)は発がん性があるため、絶対に触らないこと!!!

1. アガロースゲルの孔にPCR産物を順に入れる



2. 100Vで20分間泳動する。
3. UVランプ下でゲルを観察し、以下の図を照らし合わせながらバンドの位置を確認する。
※極力直視しない

