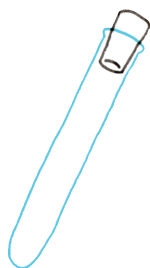


第1章 大腸菌とプラスミドを用いた実験の基本

1. 大腸菌とプラスミド	2
1-1 大腸菌とは	2
1-2 プラスミドとは	2
2. 菌体操作の基本	3
2-1 抗生物質の利用	3
2-2 滅菌操作の基本的な考え方	4
2-3 無菌状態の作り方①空間	4
2-4 無菌状態の作り方②培地等のオートクレーブ処理	5
2-5 無菌状態の作り方③炎で炙る	6
2-6 無菌状態の作り方④エタノール曝露	7
2-7 無菌状態ではなくてもある程度大丈夫な操作	8
3. 大腸菌の培養の準備	9
3-1 初めて「形質転換をとまなう大腸菌実験」を行うときに最低限必要な物品	9
3-2 LB培地の作り方	11
3-3 SOB培地の作り方	11
3-4 SOC培地の作り方	12
3-5 トランスフォーメーションバッファの作り方	13
3-6 LB寒天培地（LBプレート）の作り方	13
3-7 抗生物質入りの培地・スクリーニング関連試薬の作り方	15
3-8 青白スクリーニング用添加剤	16
4. 大腸菌の培養	17
4-1 基本的な培養条件	17
4-2 大容量の液体培養	18
4-3 グリセロールストックの作り方	18
4-4 グリセロールストックした大腸菌の増やし方	19
5. 大腸菌の形質転換	20
5-1 大腸菌のコンピテントセル	20
5-2 コンピテントセルとして使用する大腸菌株	20
5-3 株の使い分け	21
5-4 ケミカルコンピテントセルの入手方法・作り方（既製品を購入する場合）	22
5-5 ケミカルコンピテントセルの入手方法・作り方（作製する場合）	22



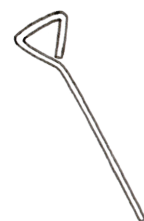
5-6 大腸菌の実際の操作手順（既に完成しているプラスミドを大腸菌に形質転換する）	27
---	----

6. 液体培養した大腸菌からのプラスミド抽出 33

6-1 プラスミド抽出の原理	33
6-2 プラスミド精製キット	33
6-3 mini prepの実際のプロトコル	35

COLUMN プラスミドの選択の仕方～薬剤耐性・コピー数～ 38

COLUMN 大きな断片の扱いBAC/Fosmid 39



第2章 逆転写

1. 逆転写酵素とその種類 42

1-1 逆転写とは	42
1-2 逆転写酵素	42
1-3 逆転写反応とプライマー	43
1-4 TdT活性	43

2. polyA精製（オプション） 45

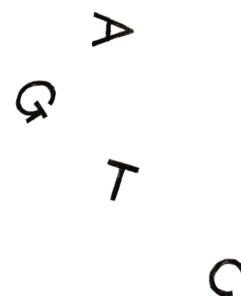
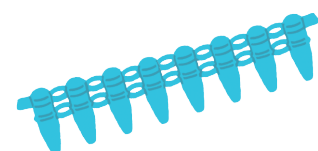
2-1 原理	45
2-2 マグネティックビーズを用いたpolyA精製	45

3. 逆転写プロトコル 47

3-1 試薬	47
3-2 プロトコル	47
3-3 逆転写PCR（reverse transcription PCR：RT-PCR）	49

4. 逆転写の際の注意点 51

4-1 RNAの精製度	51
4-2 DNase Iの残留の有無	51
4-3 適切なRNA量	51



第3章 遺伝子クローニング・配列改変とプラスミド構築

1. プラスミドの改変についての概要 54

1-1 コンストラクション法の選択	54
-------------------	----

2. TAクローニングの操作手順 55

3. プライマーによる配列付加 61

3-1 原理	61
3-2 方法	61



4. 制限酵素とライゲーションを用いたプラスミドの改変	65
4-1 制限酵素での切り貼り	65
4-2 ソフトウェアを用いた制限酵素の探し方	66
4-3 使用する制限酵素の選択	67
4-4 PCRで作製したインサートを組み込む手順	67
4-5 インサートとバックボーンプラスミドの制限酵素処理	69
4-6 バックボーンプラスミド由来のDNA断片の脱リン酸化	69
4-7 バックボーンプラスミド由来のDNA断片とインサート断片の精製	71
4-8 ライゲーション	72
4-9 トランスフォーメーション	72
5. シームレスクローニング（Gibson法など）	74
5-1 Gibson法を利用したプラスミドへのインサートの挿入	75
5-2 パソコン上でのプライマーの設計	75
5-3 シームレスクローニング後の確認・スクリーニング用プライマーの設計	77
5-4 シームレスクローニングの実際のプロトコル	77
6. プラスミドへの変異の導入（制限酵素 DpnI による導入）	80
6-1 大腸菌の性質と原理	80
6-2 プラスミドへの変異の導入①点変異を入れる	81
6-3 プラスミドへの変異の導入②配列を抜きたい	82
6-4 プラスミドへの変異の導入③配列を挿入する	82
6-5 DpnIを用いた変異導入やその他改変の実際のプロトコル	83
COLUMN オーバーラップ配列を用いたコンストラクションの方法のコンパチビリティ	86
7. オーバーラップエクステンションPCR（ふたつの断片をつなげるPCR）	87
7-1 断片増幅のイメージ	87
7-2 オーバーラップエクステンションPCRのプロトコル	88
COLUMN クローニングサービスや人工遺伝子合成の外注サービス	91
COLUMN プライマーの名前の付けかたと管理方法	92
COLUMN DNA配列をPCRで増やしたいときにまず採る方法	95

第4章 PCR を利用した遺伝子クローニング技術の応用

1. アダプター配列の付加による未知の配列のPCR増幅	98
1-1 具体的な手段	98

2. 3'RACE, 5'RACEとその関連手法の技術的説明 99

- 2-1 RACEとゲノムウォーキングの概要 99
- 2-2 nestedPCRのプロトコル 100
- 2-3 3'RACE, 5'RACEの全体的な流れ 101
- 2-4 3'RACE, 5'RACEテンプレートを用いた nested PCRの原理 103
- 2-5 配列の決定 (サンガーシーケンス) 104
- 2-6 縮重プライマー (degenerate primer) 104
- 2-7 配列未知の種における縮重プライマーの設計の仕方 106

3. RACEにおける実際のプロトコル 108

- 3-1 RACEのためのpolyA精製 (オプション) 108
 - 3-2 3', 5'RACEテンプレートの作製と nested PCR 108
 - 3-3 3'あるいは5'RACEテンプレートを用いた目的遺伝子配列の増幅
..... 110
 - 3-4 2回目のPCR産物の電気泳動～シーケンス 112
- COLUMN** 比較的バンドがクリアでなくても配列を増幅できていることもある
..... 112

4. ゲノムウォーキング 115

- 4-1 ゲノムウォーキングとは 115
- COLUMN** 古典的なコンセプトが近年の次世代シーケンサーを用いた解析にも！
..... 116
- COLUMN** サーマルサイクラーの便利な機能 117

第5章 リアルタイムPCR

1. 原理 (SYBR Green®Iを使用した場合) 120

- 1-1 通常のPCRと似ている点 120
- 1-2 通常のPCRと異なる点 120

2. 定量・Cq値・スタンダードと計算 122

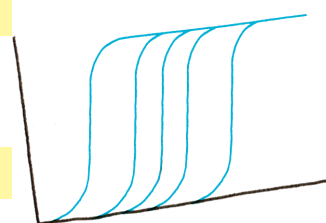
- 2-1 定量の原理 122
- 2-2 希釈と蛍光強度 123

3. Cq値と定量の方法 124

- 3-1 Cq値とは 124
- 3-2 スタンダードサンプルと定量 124
- 3-3 スタンダードの作製方法：相対定量 125
- 3-4 スタンダードサンプルの作製方法：絶対定量 127

4. リアルタイムPCRのプライマー設計とプロトコル 130

- 4-1 リアルタイムPCRプライマー設計 130
- 4-2 リアルタイムPCRのプロトコル 130



4-3	メルティングカーブの見方	133
COLUMN	(参考) TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR	134
COLUMN	統計～差に期待しつつもバイアスを入れないで観察する目～	136

5. リアルタイム PCR 装置を用いたジェノタイピング 140

5-1	簡易的なゲノム DNA の抽出① Proteinase K を用いた場合	140
5-2	簡易的なゲノム DNA の抽出② アルカリ抽出法の場合	140
5-3	リアルタイム PCR	141
5-4	ジェノタイピングの結果の見方と原理	142
COLUMN	CRISPR・Cas システムを用いたノックアウト系統の作製法	143

第 6 章 次世代シーケンサー（超並列シーケンサー）

1. 次世代シーケンスの種類と原理 148

1-1	種類	148
1-2	ショートリードシーケンサーの原理	148
1-3	ロングリードシーケンサーの原理	150

2. ショートリードシーケンサー（RNA-seq を例に） 153

2-1	RNA-seq のライブラリ作製の原理	153
2-2	RNA-seq の流れ	153
2-3	RNA のクオリティチェック	155
2-4	Bioanalyzer の場合（RNA 6000 nano kit を例に）	155

3. ショートリードシーケンサーにおける RNA のクオリティ（RIN 値） 166

3-1	RIN 値とは	166
COLUMN	DNA のサイズ選択が可能な自作 PEG 磁気ビーズ溶液の調整方法	167

4. ロングリードシーケンサー 170

4-1	ライブラリ調整の原理	170
4-2	ロングリードシーケンサーを用いたゲノム DNA 解析の流れ	170
COLUMN	外部業者へ RNA シーケンスを委託するときのデータ量とシーケンスデータの保管	171

索引	174
----	-----