

目次

| | |
|--------|-----|
| 本書の使い方 | iv |
| 目次 | vii |

第1章 分子生物学実験器具・物品の取り扱い方

| | |
|--|----|
| 1. 実験ノートと実験データ | 2 |
| 1-1 実験ノートと実験データの重要性 | 2 |
| 1-2 実験ノートの書き方と保存方法 | 3 |
| 2. 実験器具(素材と基本的な使い方) | 7 |
| 2-1 分子生物学実験関連器具の素材の特性 | 7 |
| 2-2 ガラス器具 | 9 |
| COLUMN 瓶のラベル | 13 |
| 2-3 チューブ・プレート | 14 |
| COLUMN サンプルのラベル | 18 |
| 2-4 ピペット類 | 20 |
| 2-5 遠沈管・シャーレ・シリンジ・メンブレン フィルター・凍結保存用チューブ | 24 |
| 2-6 その他 | 29 |
| 3. 実験器具の洗浄と滅菌 | 36 |
| 3-1 ガラス器具の洗浄 | 36 |
| COLUMN 水の種類 | 38 |
| 3-2 プラスチック器具の洗浄 | 40 |
| 3-3 オートクレーブ処理 | 40 |
| 3-4 乾熱滅菌処理 | 43 |
| 4. RNAワークに用いる器具 | 45 |
| 4-1 ガラス器具(RNase freeのガラス器具) | 45 |
| 4-2 プラスチック器具(RNase freeのプラスチック器具) | 46 |

| | |
|---|----|
| 5. 液体窒素 | 48 |
| 5-1 液体窒素の取り扱い | 48 |
| 5-2 液体窒素によるサンプルの凍結 | 50 |
| 6. 電子天秤 | 51 |
| 6-1 電子天秤の使い方 | 51 |
| 7. pHメーター | 55 |
| 7-1 pHを測る方法 | 55 |
| 7-2 pHメーターの使い方 | 57 |
| 8. マイクロピペット | 62 |
| 8-1 マイクロピペットとは | 62 |
| 8-2 基本的な使い方 | 64 |
| 8-3 応用的な使い方 | 67 |
| COLUMN マルチチャンネルピペットと電動マイクロ ピペット | 70 |
| 8-4 ピペット検定 | 72 |
| 9. メスピペット | 75 |
| 9-1 メスピペットの種類 | 75 |
| 9-2 メスピペットの選び方 | 76 |
| 9-3 メスピペットの使い方 | 76 |
| 10. 分光光度計・微量分光光度計 | 84 |
| 10-1 分光光度計 | 84 |
| 10-2 使い方 | 85 |
| 10-3 微量分光光度計によるDNAやRNAの定量 | 88 |
| 11. 遠心機 | 91 |
| 11-1 遠心機の種類 | 91 |
| 11-2 ローターの種類 | 92 |
| 11-3 遠心機の使い方 | 93 |
| 12. シェーカー | 95 |

| | |
|--------------|----|
| 13. インキュベーター | 97 |
| 14. デジタルカメラ | 99 |

第2章 試薬の調製方法

| | |
|--|-----|
| 1. 各種バッファーの特徴 | 104 |
| 2. 各種バッファーの調製方法 | 107 |
| 2-1 Tris-HCl (1Mストック溶液) の作り方 ～濃塩酸で合わせる方法～ | 108 |
| 2-2 Trisバッファーの作り方 ～2種類の塩を混ぜて作る方法～ | 110 |
| 2-3 1M MOPS (pH 7.4) の作り方 | 112 |
| 2-4 リン酸緩衝液 (0.1M PB) の作り方 | 113 |
| 2-5 リン酸緩衝生理食塩水 (10 × PBS) の作り方 | 116 |
| 3. その他ストック溶液や一般的な溶液の調製 | 118 |
| 3-1 5M 塩化ナトリウム (NaCl) | 118 |
| 3-2 エタノール | 119 |
| 3-3 5N 水酸化ナトリウム (NaOH) | 121 |
| 3-4 0.5M EDTA | 122 |
| 3-5 TE (Tris-EDTAバッファー) | 124 |
| 3-6 50 × TAE | 125 |
| 4. フェノール試薬の調製 | 126 |
| 4-1 酸性フェノールの作り方 | 127 |
| 4-2 中性フェノールの作り方 | 129 |
| COLUMN 簡易的な中性フェノールの調製 | 132 |
| 5. クロロホルム, その他 | 133 |
| 5-1 クロロホルム (クロロホルム + イソアミルアルコール : CIA) の作り方 | 133 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 5-2 | フェノールクロロホルム (PCI) | 134 |
| 5-3 | 1M 硫酸マグネシウム (MgSO ₄) | 135 |
| 5-4 | 3M 酢酸ナトリウム (NaOAc, pH 5.2) | 137 |
| 5-5 | 10mg/mL RNase A (DNase free) | 138 |
| 5-6 | 20 × SSC (3M NaCl-0.03M クエン酸ナトリウム, pH 7.0) | 139 |

6. 試薬やサンプルの取り扱い・保存

| | | |
|---------------|--------------------|-----|
| COLUMN | 凍結サンプル・試薬の解凍 | 143 |
|---------------|--------------------|-----|

第3章 DNA/RNAの抽出

1. サンプルの保存方法 (DNA・RNA・タンパク質)

| | | |
|-----|-------------|-----|
| 1-1 | ラベリング | 146 |
| 1-2 | 核酸の保存 | 147 |

| | | |
|---------------|--------------------------------|-----|
| COLUMN | RNA抽出前の組織のための“RNA保存液”の利用 | 148 |
|---------------|--------------------------------|-----|

| | | |
|-----|----------------|-----|
| 1-3 | タンパク質の保存 | 150 |
|-----|----------------|-----|

| | | |
|---------------|-------|-----|
| COLUMN | | 152 |
|---------------|-------|-----|

2. 組み換え体の管理

| | | |
|-----|---------------------------|-----|
| 2-1 | 保管・輸送・譲渡 | 153 |
| 2-2 | ゲノム編集技術で得られる生物の取り扱い | 155 |

3. DNA/RNAの抽出作業

| | | |
|-----|---------------------------|-----|
| 3-1 | ホモジェナイズ | 156 |
| 3-2 | ホモジェナイズの方法 | 156 |
| 3-3 | 酵素によるDNA抽出(ゲノムDNA) | 160 |
| 3-4 | RNAを抽出する際のホモジェナイズ | 162 |
| 3-5 | シリカを用いた核酸精製の原理 | 163 |
| 3-6 | カラムキットによるDNA/RNAの抽出 | 164 |

| | | |
|---------------|---------------------------------|-----|
| 3-7 | ビーズによるDNA/RNAの抽出 | 172 |
| 3-8 | フェノールクロロホルムを用いた抽出試薬によるゲノムDNAの抽出 | 175 |
| COLUMN | Proteinase Kによる簡易精製 | 161 |

第4章 ゲノムデータベースの使い方

| | |
|-------|-----|
| | 182 |
|-------|-----|

第5章 PCR

1. PCRの原理と準備 186

| | | |
|-----|-------------|-----|
| 1-1 | PCRの3つのステップ | 186 |
|-----|-------------|-----|

2. プライマー設計 188

| | | |
|-----|--------------------------------|-----|
| 2-1 | プライマー設計とは | 188 |
| 2-2 | T _m 値 | 188 |
| 2-3 | GC含有率 | 190 |
| 2-4 | プライマー設計で気を付けた方がよいこと チェックリスト | 191 |
| 2-5 | ソフトウェアやウェブサイトを用いた プライマー設計 | 191 |

3. 酵素の選択・エキソヌクレアーゼ活性・ ホットスタート 192

| | | |
|-----|-------------|-----|
| 3-1 | 酵素の選択 | 192 |
| 3-2 | エキソヌクレアーゼ活性 | 193 |
| 3-3 | TdT活性 | 193 |
| 3-4 | ホットスタート | 194 |

4. PCRの基本プロトコル 195

| | | |
|-----|---------|-----|
| 4-1 | 試薬・温度条件 | 195 |
|-----|---------|-----|

| | |
|---|-----|
| 5. 電気泳動 | 198 |
| 5-1 切り出し・定量(吸光度, 蛍光) | 198 |
| 5-2 ゲルの作り方・泳動 | 200 |
| 5-3 染色方法 | 204 |
| 5-4 溶出方法 | 208 |
| 5-5 DNAの濃度の測定 | 211 |
| 6. PCR・電気泳動のトラブルシューティング (2 step PCR, touch down PCR) | 212 |
| 6-1 「目的の長さ」が増えない | 212 |
| 6-2 収量が少ない | 215 |
| 6-3 電気泳動したときのバンドが不明瞭 | 215 |
| 6-4 複数のバンドがみられる | 215 |
| 6-5 電気泳動のバンドがゆがむ | 219 |

第6章 シーケンス

| | |
|---|-----|
| 1. シーケンス時の注意点 | 222 |
| 1-1 ジデオキシ法(サンガーシーケンス法) | 222 |
| 1-2 プライマー設計時の注意点 | 224 |
| 2. PCR産物からのシーケンスの準備 | 225 |
| 2-1 酵素を使う方法 | 225 |
| 2-2 ビーズを使う方法(ビーズ精製) | 229 |
| 3. プラスミドのシーケンス | 232 |
| 3-1 プラスミドとは | 232 |
| 3-2 プライマー設計時の注意点 | 232 |
| 3-3 プライマー不要のサービス | 232 |
| 4. サイクルシーケンス反応 | 233 |
| 4-1 BigDye™ terminator v3.1を使用したシーケンス | 234 |