

目次

本書の使い方	iv
目次	vii

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	4
2-1 抗生物質の利用	5
COLUMN 抗生物質と熱	6
2-2 滅菌操作の基本的な考え方	7
2-3 無菌状態の作り方①空間	8
2-4 無菌状態の作り方②培地等のオートクレーブ 処理	10
2-5 無菌状態の作り方③炎で炙る	12
2-6 無菌状態の作り方④エタノール曝露	13
2-7 無菌状態ではなくてもある程度大丈夫な操作	15
3. 大腸菌の培養の準備	16
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	16
3-2 LB培地の作り方	19
3-3 SOB培地の作り方	21
3-4 SOC培地の作り方	22
3-5 トランスフォーメーションバッファの 作り方	25
3-6 LB寒天培地 (LBプレート) の作り方	27

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	30
3-8	青白スクリーニング用添加剤	32
4.	大腸菌の培養	33
4-1	基本的な培養条件	33
4-2	大容量の液体培養	36
4-3	グリセロールストックの作り方	37
4-4	グリセロールストックした大腸菌の増やし方	39
5.	大腸菌の形質転換	41
5-1	大腸菌のコンピテントセル	41
5-2	コンピテントセルとして使用する大腸菌株	42
5-3	株の使い分け	44
5-4a	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）	45
5-4b	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）	47
5-5	大腸菌コロニーのスクリーニング	54
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）	59
COLUMN	精製されたプラスミドを形質転換した実験に おけるトラブルシューティング	65
6.	液体培養した大腸菌からのプラスミド抽出	70
6-1	プラスミド精製キット	70
6-2	mini prep の実際のプロトコル	74
COLUMN	プラスミドの選択の仕方～薬剤耐性・コピー 数～	81
COLUMN	大きな断片の扱い BAC/Fosmid	84

第2章 逆転写

1. 逆転写酵素とその種類	88
1-1 逆転写とは	88
1-2 逆転写酵素	89
1-3 逆転写反応とプライマー	90
1-4 TdT 活性	92
2. poly A 精製 (オプション)	93
2-1 マグネティックビーズを用いた polyA 精製	93
3. 逆転写プロトコル	95
3-1 試薬	95
3-2 プロトコル	96
3-3 逆転写 PCR (reverse transcription PCR : RT-PCR)	100
4. 逆転写の際の注意点	102
4-1 RNA の精製度	102
4-2 DNase I の残留の有無	102
4-3 適切な RNA 量	103
4-4 逆転写産物は1種類とは限らない (スプライスバリエーション)	104

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 106

1-1 コンストラクション法の選択 106

2. TAクローニングの操作手順 108

3. プライマーによる配列付加 120

3-1 原理 120

3-2 方法 121

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 128

4-1 制限酵素での切り貼り 128

4-2 ソフトウェアを用いた制限酵素の探し方 131

4-3 使用する制限酵素の選択 133

4-4 PCRで作製したインサートを組み込む手順 134

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 138

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 139

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 143

4-8 ライゲーション 144

4-9 トランスフォーメーション 145

COLUMN トラブルシューティング 146

5. シームレスクローニング（Gibson法など） 148

5-1 Gibson法を利用したプラスミドへのインサ ートの挿入 149

5-2 パソコン上でのプライマーの設計 151

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 154

5-4 シームレスクローニングの実際のプロトコル	155
--------------------------------	-----

6. プラスミドへの変異の導入 (制限酵素 DpnI による導入) 161

6-1 大腸菌の性質と原理	161
6-2 プラスミドへの変異の導入①点変異を入れる	163
6-3 プラスミドへの変異の導入②配列を抜きたい	164
6-4 プラスミドへの変異の導入③配列を挿入する	165
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	167
COLUMN コロニーのチェックのポイント	170
COLUMN うまくいかないときのトラブルシューティング	171
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	172

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) 175

7-1 断片増幅のイメージ	176
7-2 オーバーラップエクステンション PCR のプロトコル	179
COLUMN プライマーの名前の付けかたと管理方法	184
COLUMN DNA 配列を PCR で増やしたいときにまず採る方法	192

1. アダプター配列の付加による未知の配列の PCR増幅	196
1-1 具体的な手段	197
2. 3' RACE, 5' RACEとその関連手法の技術的 説明	198
2-1 RACEとゲノムウォーキングの概要	198
2-2 nested PCRのプロトコル	200
2-3 3' RACE, 5' RACEの全体的な流れ	202
2-5 配列の決定(サンガーシーケンス)	206
2-6 縮重プライマー(degenerate primer)	207
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	209
3. RACEにおける実際のプロトコル	212
3-1 RACEのためのpolyA精製(オプション)	212
3-2 3', 5' RACEテンプレートの作製とnested PCR	212
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(PCR)	218
3-4 2回目のPCR産物の電気泳動～シーケンス	222
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	223
4. ゲノムウォーキング	226
4-1 ゲノムウォーキングとは	226

第5章 リアルタイムPCR

1. 原理 (SYBR Green® I を使用した場合)	235
1-1 通常のPCRと似ている点	234
1-2 通常のPCRと異なる点	234
2. 定量・Cq値・スタンダードと計算	236
2-1 希釈と蛍光強度	236
3. Cq値と定量の方法	238
3-1 Cq値とは	238
3-2 スタンダードサンプルと定量	239
3-3 スタンダードの作製方法：相対定量	241
3-4 スタンダードサンプルの作製方法：絶対定量	247
COLUMN 絶対定量のポイント	250
4. リアルタイムPCRのプライマー設計と プロトコル	251
4-1 リアルタイムPCRのプライマー設計	251
4-2 リアルタイムPCRのプロトコル	253
4-3 メルティングカーブの見方	258
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～	261
5. リアルタイムPCR装置を用いたジェノタイ ピング	269
5-1 簡易的なゲノムDNAの抽出① Proteinase Kを用いた場合	270
5-2 簡易的なゲノムDNAの抽出② アルカリ抽出法の場合	271
5-3 リアルタイムPCR	272
5-4 ジェノタイピングの結果の見方	274
COLUMN CRISPR・Casシステムを用いたノックアウト 系統の作製法	277

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 284

1-1 種類 284

1-2 原理 284

2. ショートリードシーケンサー(RNA-seqを例に) 285

2-1 RNA-seqの流れ 285

2-2 RNAのクオリティチェック 288

2-3 Bioanalyzerの場合(RNA 6000 nano kitを例に) 288

2-4 TapeStationの場合(High Sensitivity RNA
ScreenTapeを例に) 296

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) 303

3-1 RIN値とは 303

COLUMN RNA-seqライブラリ調整後のクオリティ
チェック 305

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 307

4. ロングリードシーケンサー 314

4-1 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 314

COLUMN 外部業者へRNAシーケンスを委託するとき
のポイントとシーケンスデータの保管 316

巻末付録 319

単位の基本/ユニバーサルプライマー・汎用性のあるタグ一覧/
コドン表/アミノ酸/TE(Tris-EDTAバッファー)の作り方/50 × TAEの
作り方/アガロースゲル濃度と分離するDNAサイズ/LB培地の作り
方/LB寒天培地(LBプレート)の作り方/主な抗生物質と使用濃度/ス
トック溶液を10mL作製する場合の試薬の必要量/プレートに塗る添
加剤10mL作製時の試薬量/核酸の長さ と質量換算表(DNA)/核酸の
分子量(目安)/遠心機の回転半径・回転数によるg(目安)/主な大腸菌
株/使用するベクターの抗生物質耐性、シーケンスプライマー