

第3章 実験方法 (冊子体テキストよりかなり詳しい)

3-1. 準備・試薬 (冊子体テキストよりかなり詳しい)

3-1-1 試薬類

滅菌水、1000 ml、1 本

蒸留水をオートクレーブ滅菌済、室温保存

1X TE、50 ml、研究室、滅菌済

Proteinase K 溶液および Primer 溶液の希釈に使用、室温保存

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0)

エタノール、99.5% 特級、500 ml、1 本、室温保存

タンパク質分解酵素、Proteinase K solution、和光純薬・分子生物学用、162-22751、5 ml

20 mg/ml, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM CaCl_2 , 20% (v/v) Glycerol 溶液

Tritirachium album 由来

使用前に 1X TE で 50 倍希釈して分注、4°C 保存、冷凍不可

PCR 試薬、2X GoTaq Green Master Mix、プロメガ、M7122、100 回分×2 本

Buffer, 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3 mM MgCl_2 , *Taq* DNA polymerase, blue dye, yellow dye, and sufficient density for direct loading onto agarose gel.

300 μl 、4 本分注、冷凍保存

Primer 溶液

4 種、SIGMA GENOSYS、各 50 μM , 10 mM Tris-HCl 0.1 mM EDTA (pH 8.0) 溶液

Forward primer; 5' - CAAATTACAGGGTCAACTGCT -3' $T_m=60.6^\circ\text{C}$ ○

Normal primer; 5' - CCACACTCACAGTTTTCCTTC -3' $T_m=61.2^\circ\text{C}$ ●

Mutant primer; 5' - CCACACTCACAGTTTTCCTTT -3' $T_m=60.6^\circ\text{C}$ ●

Mismatch primer; 5' - GGCCACACTCACAGTTTCTCTT -3' $T_m=65.5^\circ\text{C}$ ●

各 Primer を 4 μM になるように 1X TE で希釈、各 4 本、冷凍保存

泳動用緩衝液、10X TAE Buffer (pH 8.3)、ナカライテスク、35430-61、1 L

400 mM Tris-acetate, 10 mM EDTA (pH 8.3)

1 本分注、室温保存

Agarose LE (低電気浸透) 電気泳動用 SP、ナカライテスク、01157-66、100 g

2 本分注、室温保存

DNA 染色試薬、GelStar Nucleic Acid Stain、タカラバイオ、F0535、250 μl ×2in DMSO

2 本分注、遮光、冷凍保存

DNA 分子量マーカー、Loading Quick 50-bp DNA Ladder、東洋紡、DNA-133、100 μg

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM NaCl, 5% Glycerol, 10 mM EDTA, 0.05% Bromophenol Blue 溶液、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800-bp DNA

1 本分注、冷凍保存

DNA 精製用キット、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System、Promega、A9282、250 Preps

Membrane Binding Solution ●

4.5 M Guanidine isothiocyanate, 0.5 M Potassium acetate (pH 5.0)

5 本分注、室温保存

Membrane Wash Solution

10 mM Potassium acetate (pH 5.0), 80% Ethanol, 16.7 μM EDTA (pH 8.0)

5 本分注、室温保存

Nuclease-Free 滅菌水 ●、5 本分注、室温保存

SV Minicolumn、人数分 分注

Collection Tube、人数分 分注

制限酵素 *Mbo*II ●、タカラバイオ、1145A、400 units 40 μl

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 0.02% Bovine serum albumin, 50% Glycerol 溶液 10 units/μl

Moraxella bovis 由来

2 本分注、冷凍保存

制限酵素用緩衝液、10X Buffer ●、制限酵素に添付、1 ml

100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol 溶液

4 本分注、冷凍保存

10X Gel-loading Buffer ●、制限酵素に添付、1 ml

1% SDS, 50% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue 溶液

4 本分注、室温保存

3-1-2 器具類

1) グループ配布用器具 (2 または 3 人用) 4 セット)

カゴ大、1 個

三角フラスコ、300 ml、1 個

メスシリンダ、50 ml、1 個

タッパ (ふた付き)、ゲル洗浄用、1 個

紙製チューブボックス、冷凍保存用、紙製、1 個

紙製チューブ立て、1.5 ml チューブ用・室温用、紙製、人数分

極細マジック、1 個

ガーゼ付き絆創膏、人数分

つま楊枝、1 箱

滅菌カゴ、1 個

マイクロチューブ 1.5 ml (ラック入り)、滅菌済、1 箱

イエローチップ (ラック入り)、滅菌済、2 箱

ブルーチップ (ラック入り)、滅菌済、1 箱

ピペットマン、Nichiryo 00-NLE-20、2-20 μl 用、1 本

ピペットマン、Nichiryo 00-NLE-200、20-200 μl 用、1 本

ピペットマン、Nichiryo 00-NLE-1000、100-1000 μl 用、1 本

はさみ、美容用、人数分

クーラーボックス、ふた付き、1 個

マイクロチューブポート浮つき一、1.5 ml チューブ用・氷冷用、スポンジ製、1 個

96 穴チューブラック、0.2 ml チューブ用・氷冷用、1 個

電気泳動用カゴまたは箱、1 個

Mupid-2 plus 電気泳動槽、カバー付き、ADVANCE、1 台

Mupid-2 plus パワーサプライ、1 個

(Mupid-2 電気泳動槽、カバー付き、ADVANCE、1 台)

(Mupid-2 パワーサプライ、1 個)

ゲルメーカースタンド、1 個

ゲルメーカー用ゲルトレイ、1 枚

ゲルメーカー用コーム、1 本

洗浄瓶、イオン交換水用、500 ml、1 個

洗浄瓶、75%エタノール用（イオン交換水で希釈）、500 ml、1 個

消毒用エタノール、健栄製薬、500 ml、1 個

ポリビーカー、廃棄物用、1000 ml、1 個

キムワイプ、1 個

ペーパータオル、1 巻

2) 共通の機器

PCR 装置、プログラムテンプコントロールシステム、アステック、PC-708-02、1 台

トランスイルミネータ、UVP、White/UV Transilluminator, TMW-20, 302nm/White, 100V, 8W、1 台

ヒートブロック中温用、TAITEC、HTB、1 台

ヒートブロック高温用、YAMATO、HF-21、1 台

マイクロチューブ用高速遠心機、エッペンドルフ、ミニスピンドル、2 台

8 連式 PCR チューブ用ミニ遠心機、LMS、GMG-060、1 台

ミニ遠心機、LMS、MCF-2360、1 台

ボルテックスミキサー、VORTEX-GENIE 2 Mixer、1 台

電子レンジ、MAX8402A6、1 台

電子レンジ用タッパー、1 個

イオン交換水用タンク、10 L、1 個

冷凍冷蔵庫（化学実験準備室）、東芝、GR-22T、1 台

3) 共通の器具・消耗品

1X TAE Buffer 用保存ビン、500 ml、1000 ml、各 1 本

1X TAE Buffer 用メスシリンダ、500 ml、1 個

エッペンドルフチューブ キャップロック、20 個

サランラップ、1 個

アルミホイル、1 個

ラテックス手袋、Diamond Grip Plus S サイズ、100 枚、1 箱

ラテックス手袋、Diamond Grip Plus M サイズ、100 枚、1 箱

ラテックス手袋、Diamond Grip Plus L サイズ、100 枚、1 箱

バイオハザード用ゴミ袋、オートクレーブ袋、1 個

三角コーナーゴミ箱、1 個

三角コーナーゴミ箱用水切り袋、1 個

大学指定難燃用廃液タンク、1 個

可燃ゴミ箱（市指定赤ゴミ袋）、1 個

共通試薬用ラック

PCR 試料用 96 穴チューブラック（ふた付き）、0.2 ml 96 穴、2 個

マイクロチューブ立て、1.5 ml チューブ用・室温用、紙製、2 個

マイクロチューブボート浮っきり、1.5 ml チューブ用・氷冷用、スポンジ製、1 個

コロコロラック、15 ml と 50 ml チューブ用・室温用、紙製、4 個

4) ストック、予備

マイクロチューブ 0.2 ml、1,000 本、1 袋

マイクロチューブ 1.5 ml、500 本、1 袋

イエローチップ、1000 本、2 袋

ブルーチップ、250 本、2 袋

イエローチップ用ラック、2 個（予備）

ブルーチップ用ラック、2 個（予備）

クラッシュアイス用クーラーボックス、ふた付き、2 個（予備）

3-2. 方 法 (冊子体テキストよりかなり詳しい)

[参考] Nakamura, K. *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, **31**, 439-445 (1993)
PCR primer の設計や制限酵素実験などはこの文献を参考にした。

3-2-1 毛髪の準備と DNA の抽出

1. 紙製チューブ立てに立ててある Proteinase K (0.4 mg/ml、タンパク質分解酵素) 溶液入りの 1.5 ml マイクロチューブに油性マジックでマーキングする。
2. 各自の側頭部より **毛根を含む頭髮** を 3~5 本採取する。
他人の試料 (細胞、DNA など) が混入しないよう細心の注意を払う。沈黙。
毛髪は 75%エタノールで拭いたはさみを使ってキムワイプの上で調達する。
使用する毛髪をキムワイプに染み込ました 75%エタノールで洗浄する。
なるべく整髪剤や染料を使用していない毛根部がある清潔な毛髪を使う。
毛根部がしっかりと確認できるなら、眉毛などの頭髮以外の毛を使ってもよい。

3. 毛根側の毛髪を毛根部から約 5 mm の部分で切断しながら、Proteinase K 溶液入りのマイクロチューブに入る。

毛髪を滅菌済つま楊枝で反応溶液中に沈める。毛根部分が溶液に浸っていることを視認する。

4. マイクロチューブをスピンドウンし、黄色のチューブキャップでチューブのふたをロックしてから、55℃のヒートブロック (図 3-1 左) で 1 時間インキュベートする。スピンドウンは図 3-2 の説明参照。



図3-1 2種類のヒートブロック

<<反応中に本実験の解説とピペットマン練習>>

5. マイクロチューブを 100℃のヒートブロック (図 3-1 右) に移し、10 分間熱処理して、タンパク質分解酵素を失活させる。毛髪は完全溶解せずに残っているが、DNA は溶出している。
6. マイクロチューブをクラッシュアイスにさして冷却し、**DNA 溶液**として保存する。黄色のチューブキャップは元の場所に返却する。

チューブのふちやふたなどについている溶液を遠心機 (図 3-2) で 3 秒間遠心分離することでチューブの底に沈める (スピンドウン)。
黄色のチューブキャップは外しておくこと。

○ 1.5 ml チューブのスピンドウン (図 3-2)

1. 対角線上に同じ重量の同型チューブをセットし、ふたを閉める。
2. 少し強めにふたを閉めると回転が始まる。
3. 3 秒ほど遠心させ、ふたを持つ手をゆるめる。
4. **回転が完全に止まってから**ふたを開け、静かにチューブを取り出す。



図3-2 小型遠心機
1.5 mlチューブ用

3-2-2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応

- ▶ ピペットマンは正しく使用する（＜4-1. ピペットマンの使い方＞参照）。
- ▶ ピペットマン操作中は**沈黙**を保つ。すべてのピペット操作で、新しいチップに交換する。
- ▶ 試薬の入ったチューブを持つときはチューブのキャップ付近を持ち、チューブに入っている溶液を指で温めないように注意する。
- ▶ すべてのチューブは、反応をはじめるまで氷（クーラーボックス）の中で保存（図 3-3）。
- ▶ マイクロチューブやチップ類は使い捨てとし、使用済みの消耗品はポリビーカーに一時保管。使用済みの消耗品を実験台などに放置しない。

配布試薬（クーラーボックス内）

- ✚ Primer 反应用チューブ（0.2 ml）、3 種、人数分
Forward○に加えて、Normal●、Mutant●、Mismatch●の各 Primer が入っている
- ✚ PCR 試薬（2X GoTaq Green Master Mix・専用チューブ） 1 本



図3-3 クラッシュアイス

1. クーラーボックス内にある 3 種類の PCR 用 0.2 ml マイクロチューブ各 1 本に油性マジックで自分の 3 種が識別できる印を付け、クーラーボックスに戻す。

マーキングにはマジックを使い、ラベルを使用しないこと。チューブは常に氷冷状態に保つ。
以下の 2 と 3 の操作で、試薬を加える順番を変えない。氷中で操作。

2. ピペットマン（P-20）を使用して、氷冷した 15 μ l の DNA 溶液を 3 本の PCR 用チューブにそれぞれ加え（表 3-1）、スピンドウンする。

表 3-1 PCR 実験に使う試薬

説明	試 薬	終濃度	Normal	Mutant	Mismatch
	Forward primer 4 μ M○	0.4 μ M	5 μ l	5 μ l	5 μ l
	Reverse primer 4 μ M	0.4 μ M	Normal 5 μ l●	Mutant 5 μ l●	Mismatch 5 μ l●
2.	DNA solution		15 μ l	15 μ l	15 μ l
3.	2X GoTaq PCR 試薬	1X	25 μ l	25 μ l	25 μ l
	Total		50 μ l	50 μ l	50 μ l

Forward primer○； Reverse primer と組み合わせて使う

Reverse primer（3 種）

Normal primer●；ALDH2-1（正常型）に相補的な Primer

Mutant primer●；ALDH2-2（変異型）に相補的な Primer

Mismatch primer●；制限酵素 MboII の切断部位をデザインした Primer

3. ピペットマン（P-200）を使用して、PCR 試薬（GoTaq Green Master Mix）を 25 μ l を 3 本の PCR 用チューブにそれぞれ加え、指ではじいて軽く攪拌し、スピンドウンする。

GoTaq 溶液は粘性が高いので注意深くはかる。

チューブのキャップがしっかり閉まっているか視認する。

○ 0.2 ml チューブ（PCR チューブ）のスピンドウン（図 3-4）

1. 対角線上に同じ重量の同型チューブをセットし、ふたを閉める。
2. 少し強めにふたを閉めると回転が始まる。
3. 3 秒ほど遠心させ、ふたを持つ手をゆるめる。
4. 回転が完全に止まってからふたを開け、静かにチューブを取り出す。



図3-4 8連式 PCR チューブ用遠心機

4. PCR 用チューブを PCR 装置（Thermal Cycler；図 3-5）にセットし、PCR 反応を行う。

PCR 反応は 94℃、2 分間の後に、次の 3 段階を 30 サイクル行う。

- 94℃、30 sec（熱変性）
- 60℃、30 sec（アニーリング）
- 72℃、20 sec（伸長反応）

PCR 用チューブをキムワイプでぬぐい、キャップが完全に閉まっていることを再度確認してから PCR 装置（4℃に設定）にセットする。セットした場所を控えておくこと（図 3-5 右）。



図3-5 PCR装置とそのヒートブロック部分

PCR 反応は全員の試料がそろってから開始する。

残った DNA 溶液（髪の毛の入り溶液）のチューブはフタを開けてバイオハザードゴミ袋に廃棄。

（約 90 分の PCR 反応終了後、チューブは 96 穴チューブラックに移し、冷凍庫保管：教官）

（「第 1 日」終わり）

3 種類の PCR 反応産物は 4℃に設定した PCR 装置に置いてある。各自のサンプルをクラッシュアイスに入れた 96 穴チューブラックに移し、実験開始まで冷却保管しておく。

3-2-3 PCR 反応産物の検出（実験日が週 2 日の場合は省略）

配布試薬 （教官使用のクーラーボックス内）

- 🚦 DNA 染色試薬 GelStar（遮光・専用チューブ）1 本 白い円柱ボックス内
- 🚦 DNA 分子量マーカー 50-bp ladder（専用チューブ）1 本

- 3 種類の PCR 反応産物各 10 μ l と DNA 分子量マーカー 10 μ l をピペットマン（P-20）でアガロースゲルのウェルに注入する。

注入する前に、必ず指ではじいて転倒攪拌し、スピンドウンする。

アガロースゲル電気泳動法の詳細は＜4-2. アガロースゲル電気泳動＞参照。

GelStar 染色試薬（2 μ l）を含む 28 ml の 1.5%（w/v）アガロースゲルをグループごとに作成。

DNA 分子量マーカーの 50-bp ladder は 50, 100, 150, 200, 250-bp 等の DNA 断片を含む。

bp = base pair

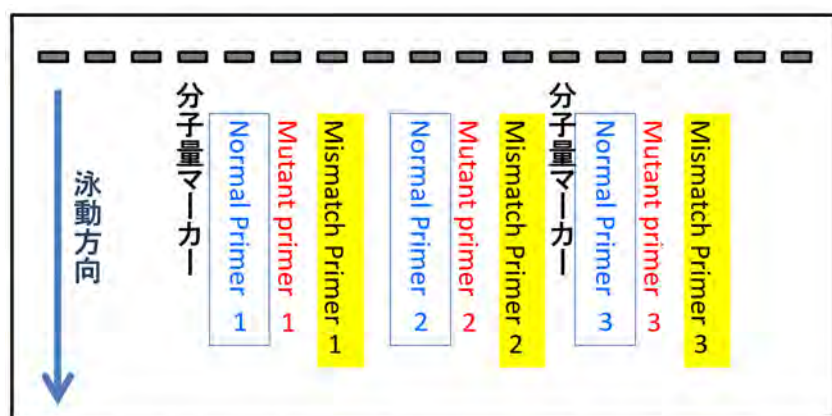


図3-6 アガロースゲル電気泳動 サンプルアプライの例

DNA 分子量マーカーは、2 人グループの場合は中央に 1 レーン、3 人グループの場合は 2 レーンに 10 μ l 注入する（図 3-6 参照）。トラブル防止のため、左右非対称が望ましい。

アガロースゲル電気泳動装置の電源周辺を濡らさないように。

2. 100V でアガロースゲル電気泳動を行い、紫外線を照射してアガロースゲルを撮影する。

GoTaq に含まれる黄色い色素がゲルトレイ先頭の泳動指標線（茶色線）に達するまで泳動（図 3-7）。

撮影済のアガロースゲルは、流しの三角コーナーにあるゴミ箱に捨てる。

泳動用緩衝液 (1X TAE Buffer) は再利用できるので、使用後は泳動装置を洗浄しなくてよい。

残った PCR 反応産物 (Normal) と PCR 反応産物 (Mutant) は翌日も使用するため、グループごとに紙製チューブボックス (丸いシールで色分け) で冷凍庫保管する。



図3-7 アガロース源電気泳動 泳動終点近く

DNA 分子量マーカーのレーンと PCR 反応産物 (Normal)、PCR 反応産物 (Mutant) のレーンから目的の増幅断片を推定し、両者のバンドの濃淡から遺伝子型を推定する (2-2-4、3-2-8、5-1-9 参照)。PCR 反応産物 (Mismatch) の推定増幅断片はどの遺伝子型の人でも現れる。

3-2-4 DNA 断片 (PCR 反応産物 [Mismatch]) の精製

配布試薬

- ✚ Membrane Binding Solution (● 1.5 ml チューブ) 1 本 紙製チューブ立て
- ✚ Nuclease-Free 滅菌水 (● 1.5 ml チューブ) 1 本 紙製チューブ立て
- ✚ Membrane Wash Solution (50 ml チューブ) 1 本 紙製のコロコロラック

1. Mismatch primer を使って増幅した PCR 反応産物 (Mismatch) を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製し (室温で操作)、冷凍庫で保管する (3-2-3 の残り試料と一緒に)。

<実験日が週 2 日の場合>は、すぐに制限酵素反応に使うため、氷冷しておく。

PCR 反応産物の精製方法は<4-3. PCR 増幅断片の精製>参照。

(実験日が週 3 日の場合の「第 2 日」終わり)

3-2-5 制限酵素による DNA 断片 (PCR 反応産物) の切断

配布試薬 (各グループのクーラーボックス内)

- ✚ 制限酵素用 10X Buffer (● 1.5 ml チューブ) 1 本
- ✚ 制限酵素 *Mbo*II (● 1.5 ml チューブ) 1 本
- ✚ 10X Gel-loading Buffer (● 1.5 ml チューブ) 1 本
- ✚ Nuclease-Free 滅菌水 (● 1.5 ml チューブ) 3-2-4 を使用

1. ピペットマン (P-20) を使用して、2 本の 1.5 ml のマイクロチューブに、精製した PCR 反応産物 (Mismatch) 16 μ l と制限酵素用 10X Buffer ● 2 μ l をそれぞれ加える。最後に Nuclease-Free 滅菌水 ● または制限酵素 *Mbo*II ● をそれぞれ 2 μ l 加えて、指ではじいて軽く混ぜスピンドアウンする。試薬を加える順番を変えない。

制限酵素は不安定な酵素のため、常に氷の中に入れておく。試薬を体温で暖めない。

2. 2 本マイクロチューブを 37°C のヒートブロックに移し、30 分間インキュベートする。

<<この間にアガロースゲルを作成する>>

3. 酵素反応の終わった 2 本のマイクロチューブに 1/9 量以上の 10X Gel-loading Buffer ● を加え、ボルテックスミキサー (図 3-8) でよく攪拌し、スピンドアウンする。攪拌-スピンドアウンは 2 回くり返す。この操作で制限酵素反応が止まる。



図3-8 ボルテックスミキサー

3-2-6 制限酵素反応による DNA 切断有無の検出

配布試薬 (教官使用のクーラーボックス内)

-  DNA 染色試薬 GelStar (遮光・専用チューブ) 1 本 白い円柱ボックス内
-  DNA 分子量マーカー 50-bp ladder (専用チューブ) 1 本

- 前項の 3-2-5 で制限酵素反応した 2 本の PCR 反応産物(Mismatch)、3-2-2 の PCR 反応産物(Normal)と PCR 反応産物(Mutant)、および DNA 分子量マーカーをアガロースゲルのウェルに注入する (実験日が週 2 日の場合は精製する前の PCR 反応産物(Mismatch) も注入する)。注入する体積は以下に説明。

アガロースゲル電気泳動法の詳細は<4-2. アガロースゲル電気泳動>参照。

GelStar 染色試薬(2 μ l)を含む 28 ml の 2.0% (w/v) アガロースゲルを作成。

○注入するレーンについて

アガロースゲルのウェルは 17 個ある。ほぼすべて使い切るように。ウェルに 1~17 の番号を振り、どのウェルに何を何 μ l 注入するかノートに書き、ノートを確認しながら注入すること。

○注入する体積について

a: PCR 反応産物(Mismatch)の制限酵素反応産物

3-2-5 で調製した 2 本の試料はそれぞれ 20 μ l 超注入する (増幅断片の分子量の大小を確認するため、ウェルからあふれない程度に、できるだけ多く[濃くなる]注入する)。微小な泳動距離で遺伝子型を判定するため、ゲルの中央付近に注入する。

<実験日が週 2 日の場合> 上記に加えて、3-2-4 で精製する前に小分けした PCR 反応産物(Mismatch)を 10 μ l 注入する。

b: PCR 反応産物(Normal)と PCR 反応産物(Mutant)

<実験日が週 3 日の場合> PCR 反応産物(Normal)と PCR 反応産物(Mutant)も同時に泳動する。前日の泳動像を参考にして注入する量を判断する。遺伝子型をバンドの濃淡で判定するため、2 種で等量になるように注入。40 μ l 残っているはず。ゲルの厚みによるがウェルには 25 μ l まで入る。最少量は 5 μ l。ピペットマンで測れる最小量は 2 μ l。3 倍希釈以上する場合は、Nuclease-Free 滅菌水と 10X Gel-loading Buffer で 1X Gel-loading Buffer を作り、1X Gel-loading Buffer で希釈する。前日と異なる濃度の試料を注入するように(原液 10 μ l 以外)。2 人グループの場合、1 人あたり 6 ウェル残っているため、3 セットの濃度のサンプルを注入する。3 人グループの場合、1 人だけ 2 セット、残り 2 人は 1 セット。

<実験日が週 2 日の場合> 3 人グループの場合、PCR 反応産物(Normal)と PCR 反応産物(Mutant)をそれぞれ 10 μ l 注入する。2 人グループの場合、10 μ l の他に 5 μ l ずつの 2 セット注入する。

c: DNA 分子量マーカー

DNA 分子量マーカーは、2 人グループの場合は中央に 1 レーン、3 人グループの場合は 2 レーンに 10 μ l 注入する。

- 100 V でアガロースゲル電気泳動を行い、紫外線を照射してアガロースゲルを撮影する。
(実験日が週 2 日の場合は、「3-2-3 PCR 反応産物の検出」の項も参考に)

- 撮影済のアガロースゲルは、メイン流しの三角コーナーゴミ箱に捨てる (有害固形扱い)。
- 使用後の泳動装置は洗浄しなくてよい(故障の原因になる。防塵して窓側に)。
- 保存溶液以外の使用済みチューブなどは、バイオハザード用ゴミ袋に捨てる。

3-2-7 エタノールパッチテスト

用意された資材を使って、各自工夫して実験する。対照実験（イオン交換水を使用）を必ず含める。

ガーゼ付き絆創膏を使う場合、エタノールが絆創膏の隙間から蒸発しやすいため、エタノール保持に工夫を要する（試験している腕を屈伸させないなど）。撮影するとき、時間（0、5、12分）、対照実験とエタノール実験の区別がわかるように工夫すること。

1. 2枚のガーゼ付き絆創膏を上腕内側（なるべく白いところ）に貼り、ガーゼが皮膚に触れる部分がわかるように写真撮影（片側のみ貼り付け、めくった状態で撮影するとガーゼ部分が触れる予定の場所が撮影できる）。
2. 2枚のガーゼ部分にイオン交換水と75%エタノールをそれぞれ染み込ませ、皮膚に貼り付ける。
3. 5分後に絆創膏を半分はがし（片側は貼り付けたまま）、はがした直後の皮膚の色を観察し、絆創膏を半分剥がした状態で写真撮影。
4. 3.の状態ですらに7分間、ガーゼをはがした部分の皮膚の色を観察し、ガーゼが皮膚に触れた部分がわかるように（片側は貼り付けたまま）写真撮影。

推定の目安（必ず対照実験と比較。この試験だけで正確な判定ができるわけではないことに注意）

- | | | | | |
|--------------------|---|-------------------|---|----------------|
| 3. の5分後に皮膚が赤くなっている | → | $ALDH2-2/ALDH2-2$ | = | 変異型ホモ接合体 |
| 4. のさらに7分後に皮膚が赤くなる | → | $ALDH2-1/ALDH2-2$ | = | 正常型と変異型のヘテロ接合体 |
| 最後まで皮膚の色に変化がない | → | $ALDH2-1/ALDH2-1$ | = | 正常型ホモ接合体 |

自分の表現型、PCR法による遺伝子型の推定結果と異なるときは、**繰り返し試験**すること。

3-2-8 遺伝子型の推定

「2-2-4 本実験の戦略」を十分理解した上で、次のように $ALDH2$ 遺伝子の**遺伝子型**を推定する。

1. アガロースゲル電気泳動で得られたバンドのサイズをDNA分子量マーカーから推定し、自分の $ALDH2$ 遺伝子の**遺伝子型**を推定する。
本来ならPCR増幅断片は1種類（1バンド）のはずだが、目的の断片以外に増幅される場合がある。
DNA分子量マーカーから目的の増幅断片を推定し、そのバンドの濃淡などから $ALDH2$ 遺伝子の**遺伝子型**を推定する。

「**遺伝子型**」を推定するのであって、 $ALDH2$ 遺伝子が正常型か変異型かだけを推定するのではない。表現型を判定するのでもない。

2. エタノールパッチテストの結果および自分の表現型と合わせて遺伝子型を総合的に推定する。
遺伝子型や表現型については「2-5. 遺伝子の基礎知識」や「やさしいバイオテクノロジー カラー版」の「1-4 具体的な遺伝子の構造」に詳しく解説してある。

アガロースゲル電気泳動によるバンドの見え方と遺伝子型・表現型の対応がわからないなら、「2-2-4 【本実験の戦略】」の図2-4を参照。

レポートには「3-2-8 遺伝子型の推定」までを**結果**に書くこと。

結果は実験を行った順に書くのではなく、意味のある項目毎に整理して書く。

考察は結果とは別の項に改め、実験操作や実験結果などについて項目毎にまとめる。