

実験Ⅱ：PCR産物の制限酵素処理

《実験内容》

PCR処理して増幅させたメダカのDNAを5種類の制限酵素で処理する。

《実験材料（2人で1班）》

各班 マイクロピペットP20（1本）・P200（1本）、1.5mL エッペンドルフチューブ（6本）

共有 DNAサンプル（25μL×6）、チップ+廃チップ入れ（1セット）、恒温槽（教室に2台）、遠心器（教室に数台）、ボルテックスミキサー（教室に数台）
制限酵素（①HaeⅢ・②MboⅠ・③MspⅠ・④AfaⅠ・⑤TaqⅠ）

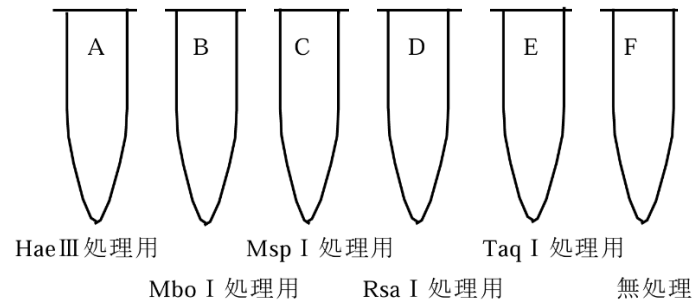
	制限酵素の切断特性	
①HaeⅢ	5' . . . GGCC . . . 3'	3' . . . CCGG . . . 5'
②MboⅠ	5' . . . GATC . . . 3'	3' . . . CTAG . . . 5'
③MspⅠ	5' . . . CCGG . . . 3'	3' . . . GGCC . . . 5'
④RsaⅠ（AfaⅠ）	5' . . . GTAC . . . 3'	3' . . . CATG . . . 5'
⑤TaqⅠ	5' . . . TCGA . . . 3'	3' . . . AGCT . . . 5'

《実験方法》

1. 各班に割り当てられたDNAサンプルナンバーを確認する → 【 （ ） 】

2. 6本の新しいチューブに「班名+制限酵素名」を書く。

（例）「701①HaeⅢ」、「701②MboⅠ」、「701③MspⅠ」、「701④AfaⅠ」、「701⑤TaqⅠ」、「701⑥PCR」



3. 下表を参考に、①～⑥のエッペントチューブにDNAサンプルを取り分ける。

4. 各テーブルを回り、①～⑥に制限酵素等を入れていく。

※ 少量なので、ピペッティングをしながら確実に入れていく。

	① HaeⅢ (紫)	② MboⅠ (黄)	③ MspⅠ (橙)	④ AfaⅠ (橙)	⑤ TaqⅠ	⑥ PCR産物 (酵素なし)
DNAサンプル (μL)	17	17	15	15	15	15
制限酵素 (μL)	1	1	1	1	1	なし
10×buffer (μL)	2 (10×M)	2 (10×K)	2 (10×T)	2 (10×T)	2 (Taq buffer)	なし
BSA (μL)	なし	なし	2 (赤)	2 (赤)	2	なし
酵素反応	37℃	37℃	37℃	37℃	65℃	なし

※ buffer、BSA…緩衝作用や反応速度の調整のために入れる。

5. 必要があれば、ボルテックスミキサーや遠心器にかける。

6. ①～④を37℃、⑤を65℃の恒温槽に30分間入れ、酵素反応させる。

※ ⑥は酵素反応を行わない。

3年（ ）組（ ）番（ ）班 実験者（ ）
共同実験者（ ）

