

ヒト班

DNA 調製

唾液 1~1.5 ml をファルコンチューブに集める。

溶解液 (50 mM Tris-HCl (8.0), 50 mM EDTA, 50 mM Sucrose, 100 mM NaCl, 2.4% SDS, 550 ug/ml Proteinase K) を唾液と等量加える。

53°Cで一晩加温する。

全液量 2 ml あたり 400 μ l の 5 M NaCl を加えてよく混合し、氷中に 30 分ほど置く。

ある程度透明になった上清部分を 1 ml ずつ 2 本のエッペン管に取る。

15,000 rpm で 15 分間遠心する。

上清を 800 μ l ずつ取り、それぞれ 2 ml のチューブに入れる。

そのうち 1 本に対し、エタノール 800 μ l を加えてよく混合する。必要に応じて 5 分放置。

15,000 rpm で 10 分間遠心する。

上清を吸い出す。沈殿を 70%エタノールで 2 回洗浄する。

沈殿を乾燥させ、100 μ l の TE に溶かす。

これを 5 倍希釈したものを PCR に用いる。

【文献】

江角眞理子、槇島誠 「新しい実習への取り組み：DNA 多型解析」 日大医誌 67: 16-20 (2008).
名古屋大学農学部応用生物科学科学生実験実習テキスト

ALDH2 の PCR

H ₂ O	14.8 μ l	} プレミックス液 19 μ l
10x Ex Taq Buffer	2 μ l	
2.5 mM dNTPs	1.6 μ l	
Primer ALDH2F (20 μ M)	0.2 μ l	
Primer ALDH2R (20 μ M)	0.2 μ l	
Ex Taq polymerase	0.2 μ l	
<u>DNA</u>	<u>1 μl</u>	
(Total 20 μ l)		

94°C, 4 min → (94°C, 30 sec → 58°C, 30 sec → 72°C, 30 sec) x 40 cycles
→ 72°C, 7 min → 4°C

D1S80 の PCR

H ₂ O	7.8 μ l	} プレミックス液 19 μ l
360 GC Enhancer	0.8 μ l	
Primer D1S80-F (20 μ M)	0.2 μ l	
Primer D1S80-R (20 μ M)	0.2 μ l	
AmpliTaq Gold 360 (2x)	10 μ l	
<u>DNA</u>	<u>1 μl</u>	
(Total 20 μ l)		

95°C, 10 min → (95°C, 30 sec → 65°C, 30 sec → 72°C, 60 sec) x 35 cycles
→ 72°C, 7 min → 4°C

【理解を深めるための課題】

(1) D1S80 は MCT118 と呼ばれ、足利事件の DNA 鑑定に使われた方法そのものです。配付資料の中に、「理論的には 435 通りのパターンが存在する」と書かれていますが、どのような計算をするとその数字が出てくるのでしょうか。また、繰り返しが 14 回および 42 回の DNA を持つ人は、PCR で何 bp と何 bp にバンドが現れるのでしょうか？

(2) D1S80 のような VNTR を調べる方法のほかには、DNA 鑑定ではどのような方法が用いられているのでしょうか。

(3) ALDH2 遺伝子を調べるとなぜお酒に強いかわかるのでしょうか。わかりやすく説明して下さい。