

実験プロトコール集
テクノロジーセミナー資料

初版 2006年4月

第2版 2011年3月

第3版 2014年4月

第4版 2015年5月

熊本大学大学院薬学教育部

遺伝子機能応用学分野

目次

第1章 分子生物学実験の基礎	
第1節 実験器具の取り扱い方（小松）	1
第1項 器具洗浄法	1
第2項 オートクレーブ	2
第3項 乾熱滅菌法	3
第4項 ピペット操作	4
第5項 液体窒素	6
第2節 汎用機器の使用法（小松）	7
第1項 電子天秤	7
第2項 pH メーター	7
第3項 分光光度計	8
第4項 ピペットマン	9
第5項 遠心機	11
第6項 シェーカー	13
第7項 インキュベーター	14
第8項 アスピレーター	15
第3節 試薬の調製法（島崎）	16
第1項 試薬の取り扱い方	16
第2項 試薬の計り方	17
第3項 水	18
第4項 各実験系における試薬組成	21
第2章 遺伝子操作の汎用実験	28
第1節 DNA, RNA の取り扱い（杉山）	28
第2節 基本操作（杉山）	30
第1項 フェノール・クロロホルム抽出	30
第2項 エタノール沈殿	31
第3節 プラスミド抽出（杉山）	32
第1項 確認Mini prep	32
第2項 Kit prep (Mini, Midi, Maxi)	34
第4節 各種酵素（杉山）	38
第1項 制限酵素	38
第2項 RNase	39
第3項 耐熱性DNA polymerase	40
第4項 逆転写酵素 (RT)	41

第5項 アルカリ性フォスファターゼ	41
第6項 T4 ポリヌクレオチドキナーゼ	41
第7項 DNA ligase	42
第5節 DNA 断片の分析と精製 (杉山)	42
第1項 電気泳動	42
第2項 ゲルからのDNA 抽出 (Gene Clean)	47
第3項 シークエンス	49
第6節 核酸の抽出 (杉山)	54
第1項 組織および細胞からのDNA の抽出	54
第2項 組織および細胞からのRNA の抽出	56
第7節 大腸菌の培養 (及川)	58
第8節 サブクローニング (及川)	61
第1項 概論	61
第2項 Insert, Vector の調製	62
第3項 制限酵素	69
第4項 ULTRA FREE	77
第5項 BAP, SAP	78
第6項 Ligation	79
第7項 形質転換 (Transformation)	80
第8項 コンピテントセル	81
第9項 PCR (宮田)	84
第10項 colony PCR (菅原)	92
第11項 TOPO cloning (田浦)	94
第9節 RT-PCR (田浦)	98
第1項 半定量的RT-PCR	98
第2項 定量的RT-PCR	101
第10節 PCR-RFLP (GENOTYPING) (杉山)	104
第11節 MUTAGENESIS (宮田)	105
第3章 蛋白質操作の汎用実験	107
第1節 蛋白質の取り扱い (野口)	107
第2節 蛋白質回収 (野口)	110
第3節 タンパク定量 (野口)	113
第4節 SDS-PAGE (関本)	119
第5節 ゲル染色 (関本)	122
第1項 CBB 染色	122
第2項 銀染色法	123

第3項	ゲル乾燥	124
第6節	WESTERN BLOTTING (関本)	125
第1項	ブロットイング	125
第2項	ボンソー染色	125
第3項	抗体の取り扱いおよび抗体反応	127
第4項	化学発光による検出	131
第5項	LAS	132
第6項	リプロービングおよびメンブレンの保存	132
第7項	データ解析法 (Image Gauge)	133
第7節	免疫沈降法 (原田, 河野)	134
第8節	PULSE-CHASE 法 (橋本)	139
第9節	BIOTINYLATION 法 (河野)	141
第10節	IMMUNOFLUORESCENT STAINING (新堀)	145
第11節	共焦点レーザー顕微鏡 (新堀)	148
第4章	細胞操作の汎用実験	151
第1節	細胞培養法 (矢野)	151
第2節	クリーンベンチ (矢野)	152
第3節	CO ₂ インキュベーター (矢野)	153
第4節	継代培養 (矢野)	154
第5節	細胞計数, トリパンプルー染色 (TEA)	155
第6節	細胞の立ち上げ, 保存 (矢野)	156
第7節	液体窒素 (矢野)	157
第8節	滅菌 (矢野)	162
第1項	オートクレーブ滅菌	162
第2項	乾熱滅菌	162
第3項	濾過滅菌	162
第4項	エタノール滅菌	162
第5項	UV 滅菌	162
第9節	MEDIUM, 各種試薬の調製 (矢野)	163
第10節	血清	164
第1項	ロットチェック (境)	164
第2項	非働化 (Tea)	165
第11節	遺伝子導入法	167
第1項	リン酸カルシウム法 (新堀)	167
第2項	リポフェクション法 (佐藤)	170
第3項	エレクトロポレーション法 (島崎)	178

第4項 アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入 (菅原)	179
第5項 siRNA 法	183
第12節 リポーターアッセイ法 (LUCIFERASE ASSAY) (境)	192
第13節 フローサイトメトリー法 (TEA)	196
第14節 LDH ASSAY (大庭)	207
第5章 動物の汎用実験	209
第1節 動物飼育の基礎 (森野)	209
第2節 無菌動物飼育の基礎およびクリーンルーム使用上の注意点 (森野)	210
第3節 解剖法 (マウス) (橋本)	212
第4節 麻酔法 (村上)	214
第5節 病態モデル動物	216
第1項 糖尿病モデル (森野)	216
第2項 胃潰瘍モデル (野口)	217
第3項 エンドトキシンショック (境)	219
第4項 潰瘍性大腸炎 (冨田)	221
第5項 担ガンマウス (村上)	223
第6節 GENOTYPING 法と動物管理 (橋本)	225
第7節 免疫組織染色法 (冨田)	229
第6章 その他	240
第1節 MET GENERATOR 使用法 (森野)	240
第2節 EMSA (内川)	241
第3節 BISULFITE SEQUENCE 法 (古田)	245
第4節 I^{125} EFFLUX 法 (橋本)	253
第5節 EVOM 法およびUSSING CHAMBER 法 (上野)	255
第6節 クロマチン免疫沈降法 (古田)	259
第7節 GST 融合蛋白質 (HIS 融合蛋白質) 沈降法 (森川)	262
第8節 SUMO 化検出法 (中村)	271
第9節 TET-ON, TET-OFF 法 (島崎)	272
第10節 2次元電気泳動法 (小松)	275
第11節 ICP-MS 法, 灰化 (薄)	283
第12節 ENDOH, PNGASE による糖鎖修飾の切断 (河野)	289
第13節 リポソーム作製法 (橋本)	291
第7章 2011年追加項目	293
第1節 Invitrogen Neon Transfection systemを用いたTHP-1への遺伝子導入 (福田)	293
第2節 小胞体ストレス研究ツール (島崎)	295
第3節 線虫 (C.elegans) を用いた実験の基礎 (松山)	296

第4節 DNAマイクロアレイの原理 (島内)	301
第5節 T細胞研究 (島内)	303
第6節 代謝ケージを用いた採尿 (古賀)	304
第7節 クレアチニン定量 (Jaffe法) (古賀)	305
第8節 アルブミン定量 (古賀)	306
第9節 Glomeruli extraction from mouse kidney (古賀)	307
第10節 Podocyte培養 (MPC5) (古賀)	310
第11節 Conditionally Immortalized Mouse Podocyte Cell lines (古賀)	315
第12節 AI, AIT, AIVG podocytes handling (古賀)	318
第13節 Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) cell preparation (古賀)	328
第14節 免疫沈降法	336
第15節 プロテオーム解析	341
第16節 MALDI-TOF MS	342
第17節 Pulse-chase analysis (迫)	349
第18節 Primer作成時の注意点	355
第19節 既知遺伝子のcloning用Primerの作成	356
第8章 2014年追加項目	358
第1節 新規導入機器とその使用方法について	358
第1項 マルチウェル吸光度測定	358
第2項 Life ECO サーマルサイクラー	364
第3項 pHメーター	366
第4項 Thermo Scientific 96 well plate washer	368
第5項 Western blot	373
第6項 Blotting	382
第7項 Keyence, BioRevo	385
第8項 生化学自動分析装置 富士ドライケム 7000 VZ	391
第9項 パーソナルフローサイトメーターBD Accuri C6™ Flow Cytometry	396
第10項 小動物用無加温型非観血式血圧計 Model MK-2000ST	418
第2節 新規導入試薬とその実験法について	427
第1項 Cloning, Sub-cloning, Mutagenesis	427
第2項 Stable 細胞株の作成	468
第3節 最近の in vivo 実験とその実験法	473
第1項 マウス飼育・管理	473
第2項 マウスの保存 (外部委託)	476
第3項 各種投与方法 (腹腔、静脈、経口、皮下、経気管)	480
第4項 保有マウス一覧	485

第5項	Genotype 法	507
第6項	解剖	513
第7項	サンプル回収 (採血、採尿、BALF、RNA、protein)	520
第8項	MEF の回収	531
第9項	PBMC、腹腔マクロファージ回収	534
第10項	初代骨格筋細胞の回収	539
第11項	糸球体の回収	541
第12項	呼吸機能測定	546
第13項	MLI (平均肺胞径) 測定	552
第14項	ITT、GTT	555
第15項	パラフィンブロック作成・染色 (PAS、HE、Masson、TUNNEL、IHC)	558
第16項	凍結ブロック作成・染色 (IF)	571
第17項	走査性電子顕微鏡	576
第18項	各種アッセイ (タンパク尿スコア、Albuwell、BUN、ELISA)	580
第19項	BioMetronome® 処置	594
第20項	病態モデル作成 (UUO、LPS 腎症)	601
第4節	最近の in vitro 実験とその実験法	606
第2項	FACS (集団解析, 細胞周期解析, ソーティング)	606
第3項	免疫沈降 (magnetic beads)	610
第4項	細胞分画回収法	612
第5項	免疫染色	618
第6項	semi-PCR,quantitative-RT-PCR	621
第7項	Western Blot	625
第8項	TTR aging とチオフラビン T assay	628
第9項	ANS アッセイ	629
第10項	ライブラリースクリーニング	632
第11項	トランスフェクション	643
第12項	ミトコンドリア活性	654
第13項	ChIP	656
第14項	細胞内微量金属測定法	674
第15項	インキュサイト	677
第16項	Function Generator	682
第17項	transcriptional microarray	683
第18項	次世代シーケンサー	691
第19項	TALEN	694
第20項	CRISPR	706

第 2 1 項	マイクロアレイ解析	712
第 2 2 項	プロテオーム解析	720
第 2 3 項	線虫関係	726
第 2 4 項	試薬作成	732
第 2 5 項	Primer blast 等を用いた Primer の設計	737
第 2 6 項	特定遺伝子領域のゲノム配列の入手方法	743
第 2 7 項	その他の有用な研究ツールと統計解析	763
第 5 節	2015 年度 Technology seminar	820
第 1 項	Crispar/Cas9 system	820
第 2 項	リン酸化部位の予測と検出	828
第 3 項	DNA マイクロアレイ解析の実際	830
第 4 項	レンチウイルスを用いた遺伝子導入	840