

メダカのDNA鑑定

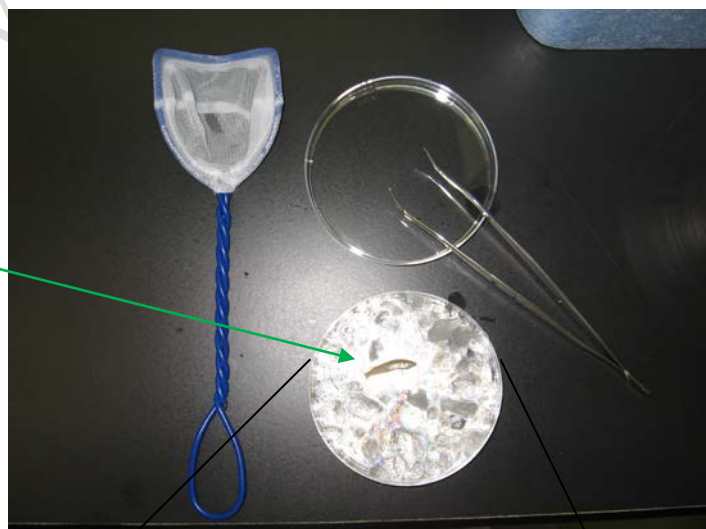
実験方法

1) メダカのオスとメスをそれぞれ 200ml ビーカーにとる。

このときに網（大で水槽からとり、小でビーカーから他に移送用に使用）



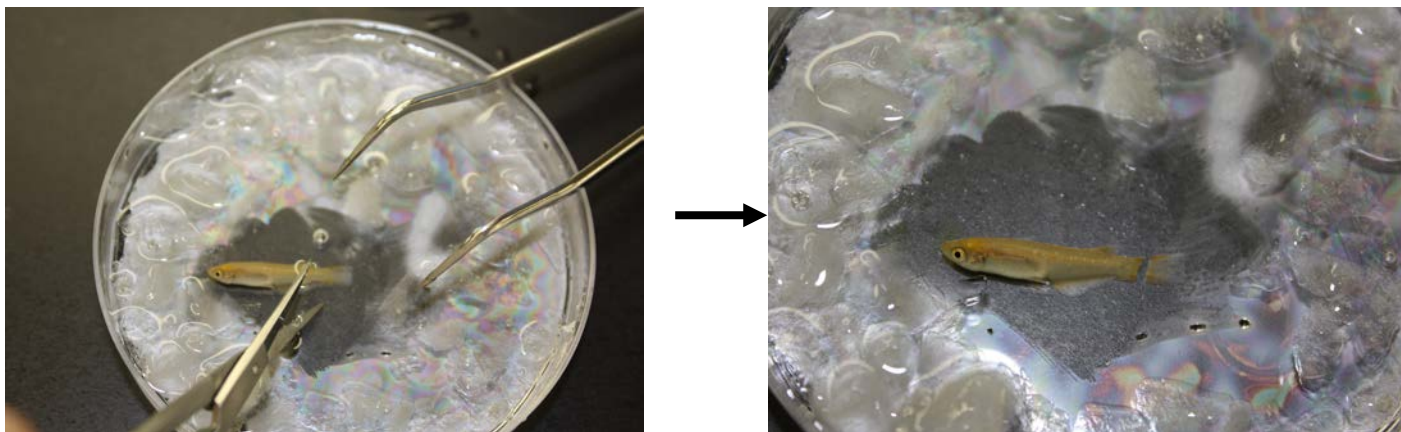
2)



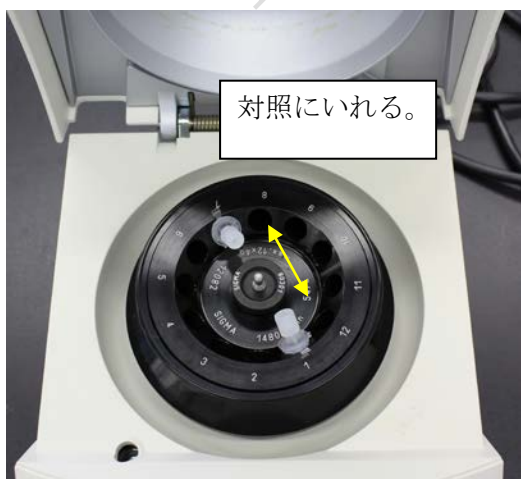
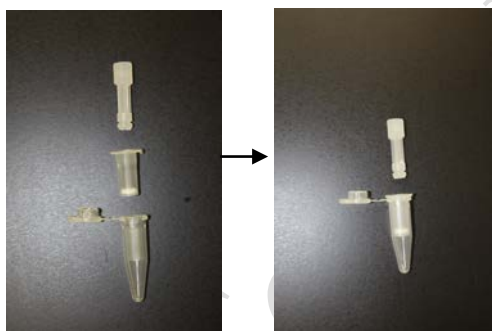
氷をハップースチロールからシャーレに移し、水を少量いれてからメダカを移す（氷でメダカに麻酔）。



3) メダカの尾びれをピンセットとはさみで切る (メダカのひれは2週間くらいで生えてくる)。



4) 破砕機 (バイオマッシャー) は3つに分かれている。下の2つを接続し、そのカップの中にメダカのひれをいれる。ひれをいれたカップにPBSを $50\mu\text{L}$ 入れる。上から破砕機の棒を差し込む。破砕機の蓋ははさみで切断する (はさみは文房具用を使用)。サンプルが入った破砕機は、対称に遠心機にいれる。(遠心機に入れるサンプルはチューブに組名と性が分かるようにマジックで印をつける)

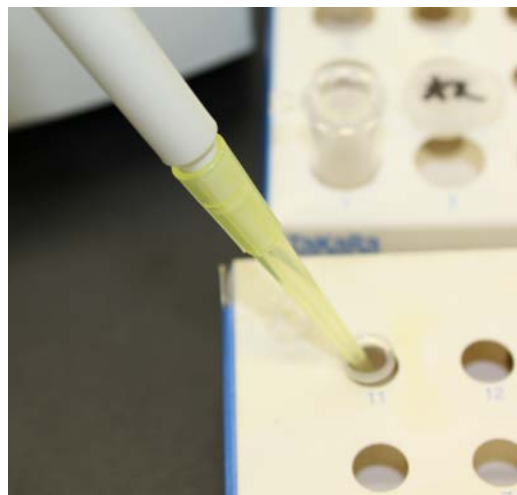


- 5) 9000 回転/分、で 30 秒間遠心すると高速で破砕機の棒が回り、ひれがすりつぶされる。遠心後に、破砕機の棒を 2 - 3 回まわし、壊れにくい細胞をすりつぶす。
- 6) 5 の操作を後、2 回おこなう。

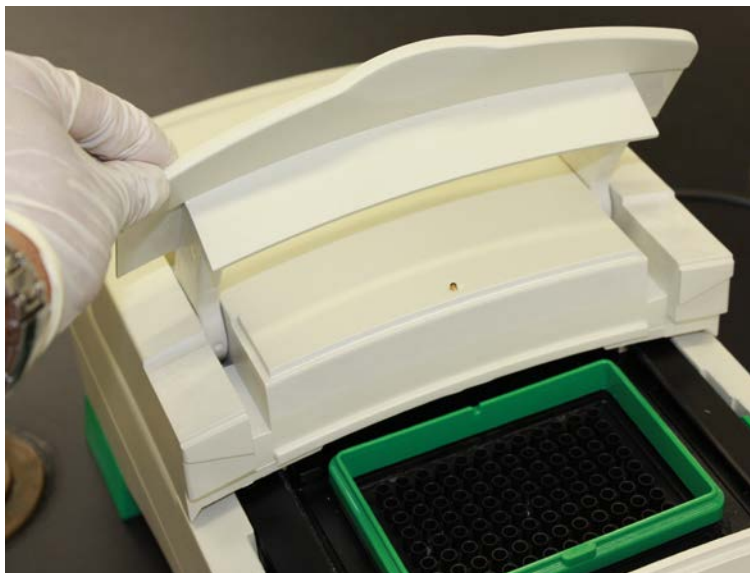


- 7) 破砕されたサンプルは、蓋をする。

- 8) PCR チューブ (2mM dNTPs 10uL, 10pmol/uL F プライマー 1.5 uL, 10pmol/uL R プライマー 1.5 uL, KOD FX (1U/ul) 1uL, DW 6uL の合計 25 μ L 入っている小さいチューブ) に破砕したサンプルを 5 μ L 入れる。



10) サーマルサイクラーの蓋をあけて、PCRチューブをいれる（入れた場所を各自が覚えておく）



操作：①F 2—create を押す②F 4 で温度条件を入力。入力時に矢印キーと enter キーを使用する③F 5 を押し、enter④run set は、30cycles にする⑤begin run

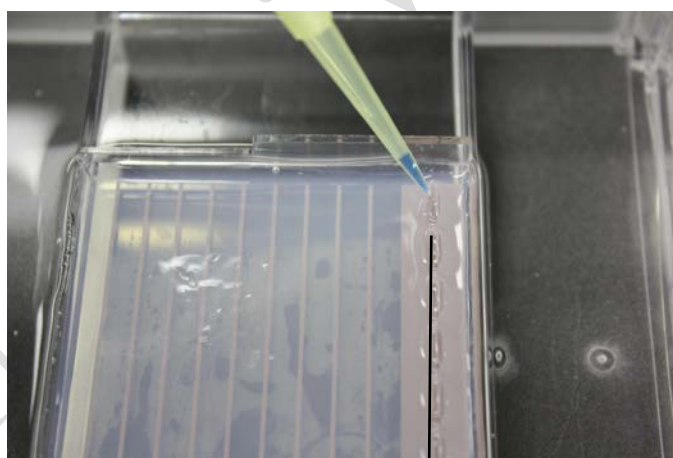
*94℃ 2分—(98℃10 秒、55℃30 秒、68℃ 1分) ×30cycles—68℃ 5分—4℃ 5分

1 1) PCR後のサンプル（オス、メス）と、DNAラダーを先生から受け取る。

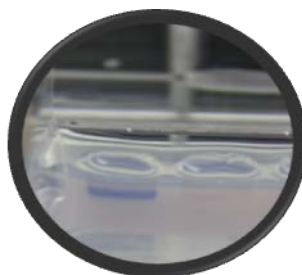
1 2) PCR後のサンプルは、アガロースの電気泳動を行う。機械は、はじめは上の電流がOFFになっている。



1 3) 穴の上から順番に、DNAラダー、サンプル（オス）、サンプル（メス）に5 μ Lずつ入れる。



(うまく入れることができると、線状に底にしずむ。)



14) 蓋をして100Vで30分間、電気泳動する。(蓋をしないと電気はながれません)



15) ラップの上に泳動したゲル(寒天から精製したもので壊れやすいので丁寧に扱う)をのせる。



16) 蛍光機械でゲル中のDNAを解析する。

