

泳動用緩衝液

トリスーホウ酸－E D T A 緩衝液(pH8.6)

トリス 10.9 g

ホウ酸 3.0 g

E D T A · 2 N a 0.7 g を蒸留水で 1 L に調整する。

※ 冷蔵庫で長期保存可能。

ゲル調整用緩衝液

泳動用緩衝液：蒸留水＝3：7で調整

寒天ゲルの組成

アガロース 1 g (電気泳動用)

ポリビニルピロリドン (PVP) 2 g

ゲル調整用緩衝液 100 ml

※ フラスコにゲル調整用緩衝液を入れ、アガロース粉末を加える。アガロースが底に沈んだら、PVPを液の表面全体に散らばるように少しずつふりかける。そのまま静置してPVPが底に沈むのを待つ（攪拌は厳禁）。沈殿したら電子レンジで断続的に加熱し溶解させる。細かい泡が出て溢れそうになったら加熱を止め、おさまったらまた加熱する。ゲルは冷蔵庫で長期保存可能。再加熱して使用する。

ADH発色試薬

イソプロピルアルコール（基質） 1 ml

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) 20 mg

ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 2 mg

フェナジンメソサルフェート (PMS) 5 mg

0.1M トリスー塩酸緩衝液 (pH8.5) 100 ml

※ 作り置きは不可。実験の直前に調整してください。

※ 0.1M トリスー塩酸 B u f f e r の調整法。

トリスは分子量 121.1 なので、12.1 g / 100 ml で 1M のトリス塩酸緩衝液ができる（これを滅菌して冷蔵庫保存しておくとかかなり長期に渡って使えます）。染色の際は、これを十倍希釈して使用する。トリスは相当アルカリ寄りなので、pH8.5に調整するのに塩酸を結構消費します。メスアップの量（最後に合わせる量。例えば上記なら 100 ml）よりかなり少なめの時から HCl で pH を見ながら調整します。

麻酔薬

トリエチルアミン

※ ポリエチレンの洗瓶に綿をひとつまみ入れ、トリエチルアミンを少量染み込ませる。ショウジョウバエの入った管ビンに気化したトリエチルアミンを吹きこむ。空気より重いので、ショウジョウバエを下に落として麻酔する。麻酔が強ければ、ねむったまま死んでしまう（生態系を乱さない配慮が必要である）。

ゲル板の作成

ガラス板（5 * 10 cm程度）の裏面に、マジックで線を引く（長辺を4 : 3 : 3に区切るように。4が+極側）。おもて面は70%アルコールでよく拭いておく。お湯で温めた10ml駒込ピペットで熱い寒天ゲルを吸い取り、ガラス面に均一になるように手早く流し広げる。表面張力で、ゲルはガラスの縁で盛り上がり止まる。固化すると白くなる。実験の直前に作る。

タンパク質の抽出と泳動

- ・ハエをすり潰すときの水滴は多すぎないように（直径3 - 4 mmの水滴）
- ・ろ紙細片（5 * 1 mm程度）に染み込ませる抽出液は多すぎないように。乾かしてもいけない。
- ・ろ紙細片をゲル上に並べるときは左右の端から数mm間隔をあける。ピンセットでゲルを傷つけないように置く（ゲルに埋め込まない）。
- ・ろ紙細片をのせたら、冷蔵庫で10分おく。ここまでの作業は手早く行う（酵素を失活させない）。
- ・冷蔵庫から出したら、ろ紙細片をていねいに取り除く。通電用ろ紙（5 * 7 cm程度）を泳動用緩衝液でぬらし、ゲル板の両端に垂らす（ゲルにろ紙を密着させる）。+極-極を間違えないように泳動槽に設置する。
- ・泳動槽の泳動用緩衝液は冷蔵庫で冷やしておく。泳動は授業時間に間に合うように400V35分で行った。300V45分、100V1時間などでもOK。通電中は感電が怖いので生徒を近づけない。
- ・スイッチを切って、電源のコンセントも抜いてからゲル板を取り上げる。
- ・泳動槽には100円ショップのプラスチックケース2つを使った。+極は白金線の変わりに炭素電極（画材店で買ったグラファイト鉛筆HB2本）を差し込み、-極はむき出しの銅線にした。市販の泳動装置（ミューピッド等）があればもちろん使える（100V35分）。

発色とザイモグラムの観察

- ・発色試薬はゲル板を浸すぐらいの深さでバットに入れ、アルミホイルで遮光し、37℃の恒温装置で温めておく。
- ・ゲル板を沈めて15分~25分保温しながら反応させる。発色の具合を確かめてバットから引き上げる（薬品に手が触れても危険はないが、そのあとすぐに手洗いさせる）。
- ・水道水を満たした水槽の中で、ガラス板からゲルをはがし取り、厚手の角形ろ紙（5 * 10 cm程度）ですくい上げる。ろ紙ごと乾燥させるとザイモグラムが保存できる。