講 座

遺伝子工学実験講座

V. 動物遺伝子の構造解析[†]

榊 佳之

九州大学遺伝情報実験施設

812 福岡市東区馬出3-1-1

Key Words: genomic deoxyribonucleic acid, animal, southern blotting, cloning, sequencing

動物細胞の染色体 DNA (ゲノム DNA) は巨大な分子であり、ヒトを例にとれば約30億塩基対の大きさを持っている。その巨大分子の中にさまざまな遺伝の情報が組み込まれているが、エキソン (exon) とイントロン (intron)、エンハンサやプロモータを初めとする発現制御領域、反復配列、偽遺伝子 (pseudogene) など特色的な構造が見い出される。動物遺伝子の構造の注意深い解析は個々の遺伝子の機能上の特色や進化の過程を明らかにしてくれる。たとえばエキソン・イントロン構成を知るばかりでなくその発現の制御や類似の配列を持った遺伝子群 (ファミリーと呼ばれる) の存在やその進化、偽遺伝子の有無などが明らかになる。ここではわれわれの研究室で行われたヒトのトランスサイレチン (別名プレアルブミン) 遺伝子と遺伝性疾患の一つの家族性アミロイドーシスの解析¹⁾⁻³⁾ を例にとって遺伝子解析の手順を示す。

1. ゲノム DNA クローンの分離

家族性アミロイドーシス (familial amyloidotic polyneuropathy, FAP と略す) は優性遺伝病で血清蛋白の一つ、トランスサイレチン (TTR と略す) がこの病氣と深く関係していることが蛋白化学的分析によって明らかにされていた。われわれはヒト肝 cDNA ライブラリーより常法によって TTRcDNA を分離し (Ⅳ. cDNA ライブラリーとその利用を参照のこと)、つぎ

に正常者と患者の TTR 遺伝子の比較から病因となる変異の同定を試みた。まず予備的なサザンブロッティング法 (後述) によって TTR 遺伝子は EcoRI の 5kb (キロ塩基対, 1000塩基対) と 7kb の切断断片上に存在することが予想された。そこで正常者および患者の白血球より分離したゲノム DNA を後の 4・1 の項に述べるように EcoRI の部分分解し、常法に従ってゲノム DNA ライブラリーを作成した (4・1項参照)。TTRcDNA をプローブとしてブラークハイブリダイゼーション法⁴⁾ (4・2項参照) により、約10⁶ 個のクローンより数個の TTR 遺伝子クローンを得た^{2), 3)}。

2. 塩基配列の決定と解析

TTR 遺伝子構造の詳細を知るために塩基配列の決定が必要であるが、そのためには上記 1 で得たファージクローン DNA を塩基配列決定に都合のよい大きさにサブクローニングすることが必要である。そのために、まず TTR 遺伝子クローンの制限地図が作成された。これに基づいて 1 - 4 kb 長の適切な制限断片がプラスミドベクター pUC 12または13にサブクローニングされた。塩基配列の決定には一本鎖 DNA フェージ M13を使ったベクターがよく使われるが、われわれは pUC プラスミドから直接塩基配列を決定する方法⁵⁾を開発したのでこの方法に従って配列決定を行った (4・3項)。この方法を用いると一種類のクローンから正逆の二つの方向のプライマーを用いることによって2倍の情報 (通常は一方のプライマーで400-500塩基長を読むことができる) を得ることができる。塩基配列の決定には常に読み誤りのミスが伴うので、必ず逆の DNA 鎖も読んで配列の確認をすることが必要である。正常者と患者由来の TTR 遺伝子の比較よ

[†] Introduction to the Experiments of Genetic Engineering. V. Structural Analysis of Animal Genes. Yoshiyuki SAKAKI: Research Laboratory for Genetic Information, Kyushu University, 1-1, Maidashi 3-chome, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

図1 患者型トランスサイレチン遺伝子に生じた変異による新しい制限部位の成立

り、FAP 患者の TTR 遺伝子のエキソンには唯一の塩基置換が存在することが判明した^{2),3)}。この塩基置換 G→A は TTR の30番目の Val の Met へのアミノ酸置換を伴い、蛋白化学的分析の結果と一致するものであった。さらにこの G→A 変化に伴って患者 TTR 遺伝子には新たに Nsi I と Bal I の制限部位が出現することが分かった(図1)。この事実は FAP という病気に強く関連していると思われる遺伝子上的変異を制限酵素を用いて検出できることを示している。すなわち、TTR 遺伝子の Nsi I または Bal I による切断パターンによって変異の有無を知ることができるはずである。

FAP 患者特有の変異の同定とは別に、既知の種々の遺伝子シグナルと TTR 遺伝子の配列を比較することによって、TTR 遺伝子には Alu ファミリー配列やエンハンサー様配列、グルココルチコイドレセプターの結合配列などが存在することが示された²⁾。このような塩基配列の解析にはコンピュータによる分析が強力な武器となった(本講座 Appendix 参照)。

3. サザーン法によるゲノム DNA の分析

FAP と深く関連した変異を制限酵素 Nsi I または Bal I による切断パターンによって検出できると予想されたので、それを実際に患者 DNA の分析に応用した。正常者および患者の血液を約 10 ml とり、白血球を分離し、そこから DNA を抽出した。それを Nsi I, Bal I で切断しサザンブロッティング法⁶⁾(4.4項参照)によって解析したのが図2である^{1),3)}。予想通りに

FAP 患者の TTR 遺伝子は正常者と異なる切断パターンを示した。図の右側は TTR 遺伝子の構造から予想される切断パターンの解釈図であり、予想された第二エキソンに新しい制御部位の出現したことを示している。また患者 DNA は正常者と同一のバンドを持つことから、FAP 患者はこの変異をヘテロに持つことが分かり、FAP が優性遺伝病である事実とよく一致する。われわれはこの検出法(診断法)を日本各地の FAP 患者に適用し、日本の FAP のすべてがこの変異を持つことを確認した。

4. 実験技術

ここではわれわれの実験の例を紹介するが、これらの技術のほとんどは、基本的にはすでに他の実験書(たとえば文献7)~9)参照)にも述べたものである。

4.1 ゲノム DNA ライブラリー作成

ゲノム DNA ライブラリーの作成は図3に示すように①ベクター DNA (λファージ系ベクターが用いられることが多い)の調製、②適当な大きさの外来 DNA の調製、③ベクター DNA と外来 DNA の結合(ligation)、④ *in vitro* でのパッケージングによるファージ粒子の形成、の各ステップから成る。以下この順に実験法を述べる。なお、ベクターファージの増殖、精製、DNA の純化および組織または細胞からのゲノム DNA の抽出、精製その他一般的技術については文献7)~9)などを参照してほしい。

4.1.1 Charon 4A ファージのアーム DNA の調製

図2 サザンブロッティング法による FAP 患者の解析: 制限酵素 Bal I で切断したものの分析パターン(左)とバンドの由来を示す解釈図(右)が示されている。

図3 ゲノム DNA ライブラリー作成の手順

われわれの実験では EcoRI 切断断片をうまくクローニングすることで TTR 遺伝子を分離できる可能性が高いことがわかっていたので（1項参照），Charon 4A をベクターとし，ゲノム DNA の EcoRI 断片を持つライブラリー作成を行った。

ファージ DNA は，両端に互いに付着する cos 部位を持っているため，まず cos 部位での各ファージ DNA の結合（ligation）を行う。反応液（600 μ l）の組成は以下の通りである。

10 $\times$ ligation buffer	60 μ l
〔660 mM Tris-HCl (pH 7.6), 66 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM TP〕	
ファージ DNA 溶液（200 - 300 μ g 分）	500 μ l
H ₂ O	30 μ l
T4 ligase（200 u/ μ l）	10 μ l

反応は15℃で一晩行う。Ligation が効率よく行われた場合には溶液は非常に粘稠となる，その後，TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 2.4 ml を加え，フェノール処理，クロロホルム処理，エタノール沈殿を行い，乾燥後 TE buffer 1.5 ml に溶解する。

ファージ DNA が完全に溶解したら，以下のような反応系で制限酵素による消化を行う。

10 $\times$ EcoRI buffer	50 μ l
〔500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 70 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 70 mM 2-メルカプトエタノール〕	

ファージ DNA 溶液 （40 - 60 μ g 分）	300 μ l
H ₂ O	140 μ l
EcoRI（6 u/ μ l）	10 μ l
計 500 μ l（ $\times$ 5 本）	

消化中にその一部をとり，アガロースゲル電気泳動で完全に消化された事を確認した後，エタノール沈殿を行い，最終的に5本分を合わせて TE buffer 200 μ l に溶解させる。制限酵素消化した DNA 断片のエタノール沈殿のさいには，3 M の酢酸ナトリウム溶液を 1/9 (V/V) 加えた後，エタノールを 2.5 倍量加える。

4.1.2 外来 DNA の調製

組み換える DNA はベクターに挿入可能な長さの（この場合は 15 - 20 kb）断片を調製するため，制限酵素による部分分解を行う。普通完全消化の時間を

1 として，たとえばその 1/2, 1/4, 1/8, 1/10... といった適当な反応時間のサンプルを調製し高濃度の EDTA 溶液（pH 8.0）を加え反応を停止し，その切断の程度を電気泳動で確認する。DNA の切断の程度が経時的に一樣に変化していくようであればこれを適切な条件とするが，消化の程度が経時的にみて完全消化や未消化の方へ傾いている場合には，制限酵素量や DNA 濃度を変化させ条件の設定を行う。適切な条件が設定できれば同一条件下，150 - 200 μ g 分の DNA を約 10 回に分けて消化した後，これらをすべて混合しエタノール沈殿を行い，最終的に TE buffer 200 μ l に溶解させる。

4.1.3 ショ糖密度勾配遠心による DNA の分画

ファージベクターの DNA はアーム部分のみを分画する，一方組み換えるべき DNA は目的とする大きさの断片あるいはファージベクターに入りうる大きさの断片のみを分画するため，それぞれショ糖密度勾配遠心にかける。密度勾配は 10% と 40% のショ糖溶液 [1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0)] を用い，遠心チューブに総量 32 ml の系を作製する。これに先に調製したそれぞれ 200 μ l のサンプルを静かに重層し，TE buffer にてバランスをとった後，超遠心を行う。たとえばローター RSP 27（日立）では，26 000 rpm，18 時間遠心した後，ペリスタポンプ，スラクションコレクターを用いて下層より 800 μ l ずつ分画する。各分画はゲル電気泳動パターン

ンを調べて、ファージに入りうる DNA 断片 (約 20 kb 以下) を含む画分のうち、比較的大きい DNA のみ (15 kb 以上) を含むフラクションをエタノール沈殿で回収し、それぞれ 40 μ l の TE buffer に溶解する。ベクターである Charon 4A を分画し不要な insert 断片をまったく含まないフラクションをエタノール沈殿で回収し、最終的に TE buffer 100 μ l に溶解させる。

4.1.4 ベクターアーム DNA と外来 DNA の結合と *in vitro* パッケージング反応

ファージベクターと外来遺伝子の DNA リガーゼによる結合は、ベクターと外来遺伝子の量比が 3:1-2:1 の割合で行う。今回は以下のような反応系で行う。

Charon 4A アーム DNA (2.1 μ g 分)	$x \mu$ l
ゲノム DNA (0.8 μ g 分)	$y \mu$ l
10 $\times$ ligation butter	1.5 μ l
H ₂ O	$z \mu$ l
T4 リガーゼ (200 u/ μ l)	1 μ l
計	15 μ l

Ligation を行った溶液は、そのまま *in vitro* package 反応に供する。われわれは Hohn の方法¹⁰⁾に従ってこの反応を行っている。Extract は市販のものを使用するのが簡便でよい。*In vitro* packaging 反応は、ファージの頭部・尾部を供給する 2 種の extract と ligation した溶液 4 μ l を混合、室温で 2 時間放置し、その後、SM buffer 500 μ l、クロロホルム 20 μ l を加え、ゆっくりと攪拌する。これを 7 000 rpm、2 分間遠心し上層のみを別にとり、その一部を何段階かに希釈後、指示菌 (LE392) に吸着、上層寒天とともにプレートにまき、そのタイターを測定する。1 枚のシャーレ (9 $\times$ 13 cm) のプレーティングには、一晚培養した LE 392 を半分量の 10 mM MgSO₄ 溶液に再懸濁したうちの 250 μ l を指示菌として使用する。測定結果から得られた全クローン数が推定され、それがライブラリーのサイズとなる。ヒトの場合は、全ゲノムを 99% 以上の確率でカバーするには最低でも 10⁶ 個のクローンが必要となる。

ライブラリーはそのままスクリーニングに用いてもよいが、種々の目的に使用したい時のために増幅して保存するのがよい。100-150 万個のクローンを同時に増幅させることが望ましい。プレート当たり数万個のファージを指示菌 (LE392) とともに常々通りまいて (上層寒天は 0.5-0.7%) 一晚ファージを増幅させ各プレートに SM buffer または L 培地を加えて上清にくるファージを回収するが、あるいは寒天も含めて回

収して寒天を除くようにする。

4.2 プラークハイブリダイゼーション⁴⁾

ヒトゲノム中の単コピー DNA は Charon 4A をベクターとして各クローンが約 20 kb の大きさの DNA を含むライブラリーの場合、約 100 万個のクローンをスクリーニングすれば 95% 以上の確率で見出すことができる。プラークハイブリダイゼーションは多数のクローンをスクリーニングするのによい方法である。

4.2.1 DNA フィルタの作成

以下の手順で行う。

ファージ粒子からニトロセルロースフィルタ上への DNA の移行は、以下のような手順で行う。

- (1) プレート (9 $\times$ 13 cm) 1 枚に約 5-8 万個のプラークを形成させるようにライブラリーを希釈してまき、37℃で一晩培養する。
- (2) プラーク形成後、4℃で 1 時間以上冷却する。
- (3) プレートおよび 9 $\times$ 13 cm に切ったニトロセルロースフィルタに通し番号をつける。フィルタはプレート 1 枚に対して 2 枚用意する。
- (4) フィルタをプレート上に気泡が入らぬように置き、非対称に注射器を使ってマークをつける。1 枚目は 50 秒後にはがし、アルカリ変性液 (0.1 M NaOH, 1.5 M NaCl) に 20 秒、中和液 [2 $\times$ SSC, 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)] に 20 秒つけた後、風乾する。2 枚目はプレートとの接触を 90 秒以上にすればよい。
- (5) フィルタをよく風乾させたら 80℃で 2 時間焼きつけを行う。焼きつけを行ったフィルタはそのまま保存可能である。

4.2.2 ハイブリダイゼーション

プラスチックの袋の中ですべての処理を行う。

1 枚当たり約 8 万個程度のプラークを作らせるようにまいたプレート 10 枚から、フィルタを各 2 枚、計 20 枚のフィルタをとり、10 枚ずつバック 2 袋に分けて入れる。ハイブリダイゼーション溶液 (6 $\times$ SSC, 10 $\times$ Denhardt 溶液, 0.1% SDS, 50 μ g/ml 変性サケ精子 DNA, 以下、ハイブリ液と呼ぶ) 60 ml を各袋に入れ、68℃で数時間、プレハイブリダイゼーションを行う。なお、SSC と Denhardt 溶液の組成は以下の通りである。

SSC (1 X)

0.15 M NaCl

0.05 M クエン酸ナトリウム

Denhardt 溶液 (1 X)

0.02% ウシ血清アルブミン (画分 V)

0.02%ポリビニルピロリドン

0.02%フィコール (4×10^5 ダルトン)

その後、溶液を捨て再度同じ組成のハイブリ液60 mlを入れる。Amersham などから市販のマルチプライマーのキットを用いてラベルしたプローブを熱変性後、等分してハイブリ液に加える。ラベルする DNA は約20 ng, [^{32}P] dCTP は50 μCi を使用する。68℃で一晩ハイブリダイゼーション後、2×SSC 約60 ml で一度ゆすぎ、再び2×SSC 60 ml 加え68℃で1時間置く。同様に3回溶液を換えた後、フィルタをとり出して風乾し、風乾したフィルタはろ紙に貼り、目印として適量の ^{32}P または ^{14}C を混ぜたインクでマークをつけた後、X線フィルム、増感紙とともにカセットに入れ、-70℃で2日間露出させる。フィルム現象・定着、2枚のフィルタ上で重なるようなシグナルを探す。シグナルがみつければ、その位置に対応する複数個のブラックを上層寒天ごとかきとり、SM buffer に懸濁し、今度は、一つ一つのブラックが他と重ならない程度に希釈し、プレートをまく。このプレートから再びフィルタを作製、ハイブリダイゼーションを行い純粋なファージクロンを単離する。

4.3 塩基配列の決定法⁵⁾

塩基配列の決定には Maxam と Gilbert の開発した化学的方法と Sanger の開発したジデオキシ法がある。ここではジデオキシ法について紹介する。一本鎖 DNA フェージM13のベクターにクローニングしたものをテンプレートとする場合と二本鎖プラスミドにクローニングしたものを変性して用いる場合がある。ここでは筆者らが改良した後者の例を紹介する。なお、各社よりシーケンス用のキットが種々売り出されており、基本反応にはそれらを用いるのが实际的である。

4.3.1 プラスミドテンプレート DNA の調製

(1) コロニーを1.5 ml L培地に植え、37℃で8時間振盪培養する。(または5 ml L培地で一晩培養する)。

(2) 上記培養液1.5 ml をエッペンドルフチューブに移し、遠心(12 000 rpm×2分)する。

(3) 上清をパスツールピペットで除き、もう一度遠心し、マイクロピペットを用いて上清をほぼ完全に除く。

(4) ベレットを60 μl の50 mM グルコース/25 mM Tris-HCl (pH 8.0)/10 mM EDTA に懸濁させる(Vortex)。

(5) 40 μl の10 mg/ml リゾチーム溶液(使用直前

に上記グルコース溶液にて10 mg/ml に調整)を加え、おだやかに混合し、室温で5分間放置する。

(6) 200 μl の0.2 N 水酸化ナトリウム/1% SDS 溶液を加え、おだやかに混合し、氷中で5分間放置する。

(7) 150 μl の5 M酢酸カリウム(pH 5.2)溶液を加え、おだやかに混合し、氷中で少なくとも5分間放置する。

(8) 遠心(12 000 rpm×10分, 4℃)

(9) 上清を別のエッペンドルフチューブに移し、TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) 飽和フェノールで1回抽出する(5分間)。この時はおだやかに混合し、vortex はかけない。

(10) 遠心(12 000 rpm×5分)し、上清350 μl を別のエッペンドルフチューブに移す。

(11) 2倍量のエタノール(700 μl)を加え、混合後室温で2-3分放置する。

(12) 遠心(12 000 rpm×5分, 室温)し、上清を除く。

(13) ベレットを75%エタノールで1回リンスし、真空乾燥する。

(14) ベレットを50 μl のTE (pH 8.0) に溶解させ、10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度になるようにRNase A (0.5 mg/ml) 溶液を1 μl 加え、37℃で30分間インキュベートする。

(15) 20%ポリエチレングリコール6 000/2.5 M NaCl を30 μl 加え、よく混合し、氷中で少なくとも1時間放置する。

(16) 遠心(12 000 rpm×5分)し、上清を除く。

(17) ベレットを75%エタノールで1回リンスし、真空乾燥する。

(18) ベレットを50 μl (この量は任意)のTE (pH 8.0) に溶解させ、うち1 μl を電気泳動し、だいたいのDNA濃度を見積る。この方法で5-10 μg のプラスミドDNAが得られる。

(19) 上記DNA溶液45 μl に2 N NaOH 5 μl を加え、室温で5分間放置する。

(20) 5 M酢酸アンモニウム20 μl を加え、つぎにエタノール450 μl を加える。

(21) -80℃で5分間放置する。

(22) 遠心(12 000 rpm×5分間)し、上清を除く。

(23) 75%エタノールで1回リンスし、真空乾燥する。

4.3.2 ジデオキシ反応

基本的には市販のキットに従って反応を行う。まずアニーリングは、変性プラスミドDNA 9.5 μl (0.5

pmolを含む)使用直前に適量に溶解するのがよい。0.5 pmol 以上でもよい。プライマーより少ないとパターンが汚なくなるので量には注意すること、プライマー 1 μ l (0.5 pmol), 1.5 μ l の10 $\times$ Klenow 酵素反応液(70 mM TrisHCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 70 mM MgCl₂, 1 mM EDTA)を混合し、全量 12 μ l で60 $^{\circ}$ C 10-20分の加熱、軽く遠心後に室温で10-20分間放置する。以下

(1) 上記アーニリング混合物に2 μ l (20 μ Ci)の α -³²PdCTP (400 Ci/mmol)と1 μ l (2 ユニット) Klenow 酵素を加え、おだやかに混合する。

(2) 上記混合物の3.2 μ l ずつを前もって用意した dNTP+ddNTP 混合液2 μ l に加え、混合後37-42 $^{\circ}$ C で15分間放置する。

(3) Chase 溶液(市販キットに入っている)1 μ l を加え、さらに同温度で15分間放置する。

(4) 最後に6 μ l の95%ホルムアミド色素(0.1%プロムフェノールブルー, 0.1%キシレンシアノール, 95%ホルムアミド, 10 mM EDTA)を加え、氷中におく。

4.3.3 電気泳動

0.35mm厚のシャークおよびスぺーサーを用いる。ガラス板は20 $\times$ 40 $\times$ 0.5 cmの大きさで、この他放熱板として20 $\times$ 30 $\times$ 0.3 cmのアルミ板を使用する。

(1) G.A.T.C. おおののジデオキシ反応液の2 μ l をエッペンドルフチューブにとり、95 $^{\circ}$ Cで3分間加熱する。氷中で急冷し、ゲルに apply する。

(2) ゲルは、6% wedge ゲル(40cmの長さで下5cmにはスぺーサーをもう一枚重ねてガラス板をはさみゲルを作成する)および6%アクリルアミド尿素ゲル(60cmの長さ)を用いる。泳動は電圧2000 Vで行い、色素の移動度または時間により泳動距離を決める。たとえば、6% wedge ゲルを使用する場合、BPBが一番下まできたとき、挿入されたDNAの1塩基から250塩基前後の解読可能なパターンが得られる。6% (60cmゲル)のときは、2000 V (約15 mA)で14時間泳動する。これにより、200塩基から500塩基が読み取れる。

4.3.4 オートラジオグラフィ

(1) 片方のガラス板をゲルから外し、ゲル固定液(10%メタノール, 5%酢酸水溶液)に15分間浸す。

(2) Whatmann 3 M ろ紙にゲルを移し、サランラップでゲル表面をおおって、ゲル乾燥機で乾燥させる。

(3) サランラップを取り除き、ゲルに直接X線フィルムをあて、このものをガラス板に挟むか、カセット

中で室温にて15-24時間感光させる。

図3に最終的なオートラジオグラムの例を示した。

4.4 サザーン・ブロッティング法⁶⁾

サザーン(Southern)ブロッティング法は特定のDNA断片を多数の断片の中から同定するのに広く用いられるが、ヒトゲノム中の単コピー遺伝子を同定したりするには少々注意が必要である。以下順を追ってポイントを説明する。

4.4.1 DNAの消化と電気泳動

レーン当たりヒトゲノムDNA 3-5 μ gを目的の制限酵素で完全に消化する。完全消化されたか否かの判定はゲノムDNAでは容易でないが、過剰量の酵素で3時間から一晩の消化を行い、電気泳動によってスミアの中に反復配列のバンドが出現することを一つの目安にする。不完全消化の場合、後のブロッティングで余分なバンドが出て解釈に苦しむことが多い。電気泳動は通常の0.7-1%アガロースゲル電気泳動でよいが、分離を良くするためにはゆっくりと一晩くらいで泳動するのがよい。エチジウムブロミドで染めて写真をとる。

4.4.2 サザーン・トランスファー

(1) 写真を撮ったゲルの不要部分をカッターで切除する。

(2) ゲルを変性液(0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl), 250 ml に浸し、30分間ゆっくり振とうしながらDNAを変性させる。

(3) 変性液を捨て、数回水で洗って完全に変性液を除く。

(4) ゲルを中和液(1 M Tris pH 8.0, 1.5 M NaCl) 250 ml に浸し、60分間ゆっくり振とうする。途中30分たったところで新しい中和液と交換する。

(5) 中和している間にニトロセルロースフィルタまたはナイロンメンブレンフィルタをゲルよりやや大きめ(5 mm程度)に切り取り、まず純水の上に浮かべるようにそっとフィルタをのせて湿らせた後(空気が取り込まれないように注意する)水の中に沈める。つぎに、フィルタを20 $\times$ SSC 溶液1 $\times$ SSC: 4:2参照)に浸して10分間以上放置しよく染み込ませる。

(6) バスに20 $\times$ SSCを満たし、ガラス板の上にワットマン3 mm ろ紙(20 $\times$ SSCに浸して湿らせておく)2枚→裏面を上にしたゲル→フィルタ→3 mm ろ紙3枚→キムタオル→ガラス板の順にのせてゆく(図4参照)。この時3 mm ろ紙、ゲル、フィルタの間に空気(泡)が残らないように注意する。また、ゲルの周囲は

4・4・4 ラベルしたプローブ DNA の調製

Amersham 社, ファルマシア, ペーリンガーなどから販売されているマルチプライマーを用いたシステムを用いるのがよい。単コピー遺伝子 (DNA) の検出には高い比活性のプローブが要求されるので 3000 Ci/mmol の比活性の α - 32 P-dNTP を用いる (通常は dCTP)。ラベルされた DNA は使用直前に 100°C 2 分間の処理をしてからハイブリダイゼーションに用いる。このラベル法では 300 塩基対以下の小断片 DNA はあまり効率よくラベルされないので、その場合はベクター DNA などを付加したままの状態にラベルして用いる。

文 献

- 1) Sasaki, H., Sakaki, Y., Matsuo, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 636 (1984)
- 2) Sasaki, H., Yoshioka, N., Takagi, Y. and Sakaki, Y.: *Gene*, **37**, 191 (1985)
- 3) Yoshioka, K., Sasaki, H., Yoshioka, N. et al.: *Mol. Biol. Med.*, **3**, 319 (1986)
- 4) Benton, W.D. and Davis, R.W.: *Science*, **196**, 180 (1977)
- 5) Hattori, M. and Sakaki, Y.: *Analyt. Biochem.*, **152**, 232 (1986)
- 6) Southern, E.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975)
- 7) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)
- 8) 高木康敬編:「遺伝子操作マニュアル」, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1982)
- 9) 榎 佳之:「ベクター DNA」, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1986)
- 10) Hohn, B.: *Methods Enzymol.*, **68**, 299 (1979)