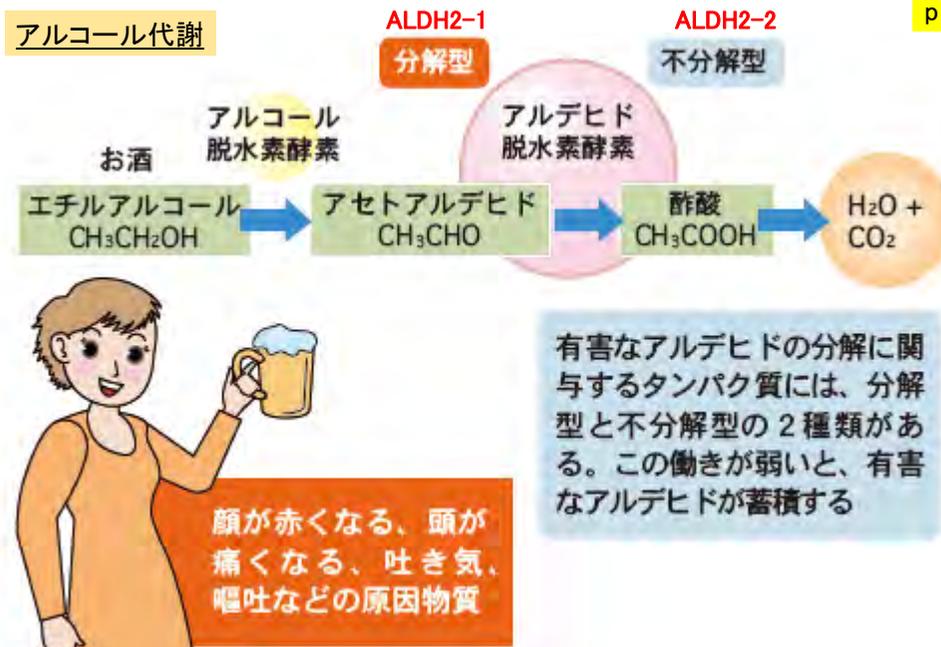


本実験では、各自の頭髪細胞からGenome DNAを抽出し、PCR法によるDNA型鑑定法によりアルデヒド脱水素酵素ALDH2の**遺伝子型**を推定する。

ALDH2遺伝子は点突然変異による**1塩基置換の対立遺伝子**が見つかったことから、**3通りの遺伝子型・表現型**があることがわかっている。

本実験では次の**3通りの方法**でALDH2遺伝子の遺伝子型を推定する。

1. 2種類のALDH2対立遺伝子間で変異している部分を**3'末端とするPCR primer**を利用し、**PCR増幅の有無**を調べることで遺伝子型を推定する。
2. **変異部位を含まないPrimer**で増幅したALDH2遺伝子の断片を、変異部位を認識する**制限酵素による切断の有無**を調べることで遺伝子型を推定する。
3. 簡易推定法である**アルコールパッチテスト**で推定した遺伝子型、および自分の**表現型**と合わせてアルデヒド脱水素酵素の遺伝子型を総合的に推定する。



遺伝子型と表現型



両親からどの組み合わせの遺伝子を受け取るかで、お酒に対する許容度が決まる

ヒトアルデヒド脱水素酵素mRNAの一部

```

1  otggggcct tggagacct ggacaatggc aagccctatg toatoccta octggggat ttggacatgg toctcaaatg totocggat
1  L A A L E T L D N G K P Y V I S Y L V D L D M V L K C L R Y
91  tatgcccgt gggctgataa gtaccacggg aaaaaccatcc ccattgacgg agacttotto agctacacac gocatgaacc ttgegggtg
31  Y A G W A D K Y H G K T I P I D G D F F S Y T R H E P V G V
181  tggggcaga toattcoegt gaattcoogc ctocctgatgc aagcatgaa gctggggcca gcoottggcaa ctgaaaacgt gtttggatg
61  C G Q I I P W N F P L L M Q A W K L G P A L A T G N V V V M
271  aaggtagctg agcagacacc cctcaccgcc ctctatgtgg ccaacctgat caaggagct ggccttcccc ctgggtggt caacattgtg
91  K V A E Q T P L T A L Y V A N L I K E A G F P P G V V N I V
361  cctggattg gccocacggc tggccocgcc attgccctcc atgaggatg ggacaagtg gcaatccag gctocacatg gattggccgc
121  P G F G P T A G A A I A S H E D V D K V A F T G S T E I G R
451  gtaatccagg ttgctgtg gagcagcaac ctoaagagag tgacctgga gctggggc cca acatcatcat gtcagatgcc
151  V I Q V A A G S S N L K R V T L E L G
541  gatattgatt gggcogtggc acaggcocaac ttgocctgt tottcaacca gggocagg cgg gctocgggac ctctgtcag
181  D M D W A V E Q A H F A L F F N Q G G
631  gggacatct atgatgatt tgtggtcgg agcgttgccc gggccaagtc tccgtgtg cct ttgatagcaa gaocgagcag
211  E D I Y D E F V V R S V A R A K S R V F D S K T E Q
721  gggcogcagg tggatgaac tcagttaaag aagatocog gotacatcaa cacgggg ggg cgaactgct gttggtggg
241  G P Q V D E T Q F K K I L G Y I N T G A K L L C G G
811  ggcattgctg ctgaccgtg ttaactcact cagccactg tgtttggaga tgtgcag cca tcgccaagga ggagatctc
271  G I A A D R G Y F I Q P T V F G D V O I A K E I F
901  gggcogcagg tgcagatcct gaagttoag accatagagg aggttgtgg gagagcc cgt acggctggc cgcagotgt
301  G P V M Q I L K F K T I E E V V G R A Y R L A A V Y R L A A V
991  ttocaaagg atttggacaa ggocaaatlc ctgtccagg cctocagcc gggcact tctatgatg ttggagcc
331  F T K D L D K A N Y L S Q A L Q A G T C Y D F G A
1081  cagtaccct ttggtgcta caagatgctg gggagtgccc gggagttgg cgagtac pat acac taaat gaaaactgtc
361  O S P F G G Y K M S G S G R E L G E Y Y T E V K T V
1171  acagtcaagg tgcotcagaa gaaotcataa gaatcatgoa agottctoc ctcagccatt gatggaagt toagaaagt cagcaacaa
391  T V K V P O K N S *
1261  accaagaaa atgatcctg cgtgctgat atcgaaaa agaaatctt octacaaa ctctgggtc aagaagttc tagaatttg
1351  attgataaac atggtggtt gctgaggtt aagatata gaggaaocct taaacgaca acaatacgc tagctttcag gatgatttt
1441  aaaaaataga ttcaaatgtg ttatcctctc totgaaacc ttocataac tcgatttat aggggagaa aagcattgt ttacaattc
1531  tatoacatt aaggcaact ctacacocgt ctttgtatto tgggtaaga ttcaataaa actagotgt ott

```

この部分が分解型と不分解型の間で異なる部分

お酒が飲めるか飲めないかは、この塩基が1個ちがうだけ！

ヒトアルデヒド脱水素酵素 変異部位

分解型遺伝子 (ALDH2-1 gene)

1141 ctgcaggcat acactgaagt gaaaactgtc
 381 L Q A Y T E V K T V



不分解型遺伝子 (ALDH2-2 gene)

1141 ctgcaggcat acactaaagt gaaaactgtc
 381 L Q A Y T K V K T V

お酒が対する許容度は、この塩基が1個違うだけ！
 この1塩基多型の部分を末端に持つPCRプライマーを使って、
 特異的に増幅します。

- 1) 正常型ALDH2-1 遺伝子, exon 12 付近の塩基配列
 (センス鎖のみ、Accession No. = M20455)
 1→10 intron(小文字) 11→125 exon(大文字) 126→137 intron(小文字)

1 caaattacag GGTCAACTGC TATGATGTGT TTGGAGCCCA GTCACCCTTT GGTGGCTACA
 61 AGATGTCGGG GAGTGGCCGG GAGTTGGCGC AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTGAAGTGA
 121 AACTgtgag tgtggcc

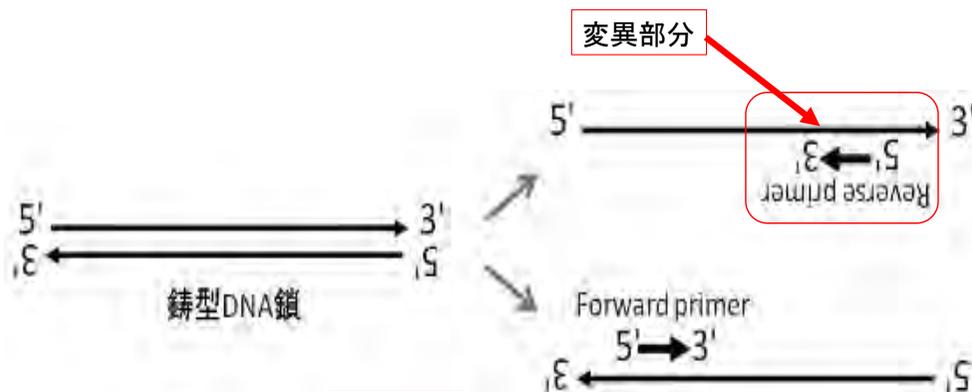
Forward primer: 5' - CAAATTACAGGGTCAACTGCT -3'

Reverse primer:

Normal primer: 5' - CCACACTCACAGTTTTCACTTC -3'

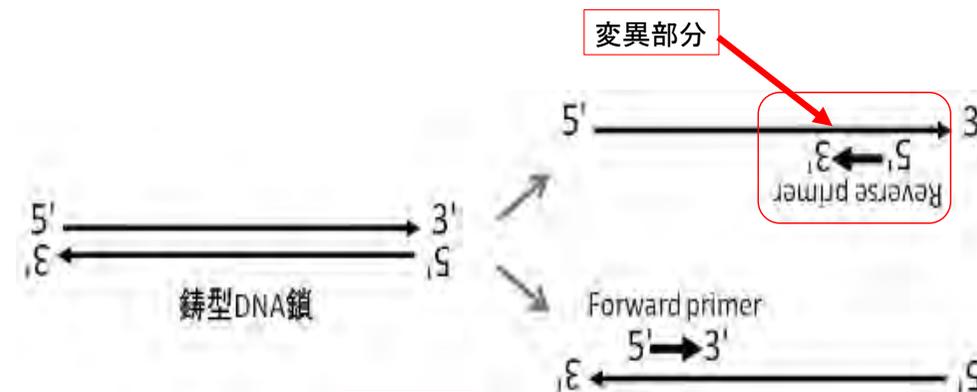
Mutant primer: 5' - CCACACTCACAGTTTTCACTTT -3'

Mismatch primer: 5' - GGCCCACTCACAGTTTTCTCTT -3'



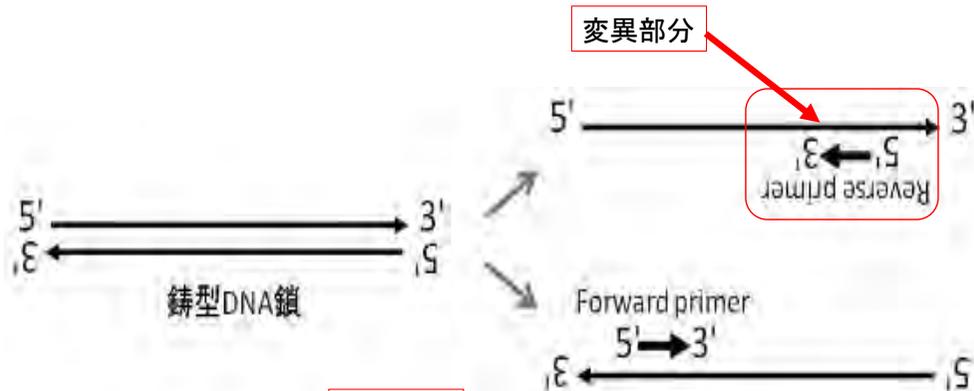
ALDH2-1 101 5' - GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'
 Normal primer 3' - ← ← ← Cttcact tttgacactc acacc -5'

ALDH2-1 101 5' - GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'
 Mutant primer 3' - × Tttcact tttgacactc acacc -5'



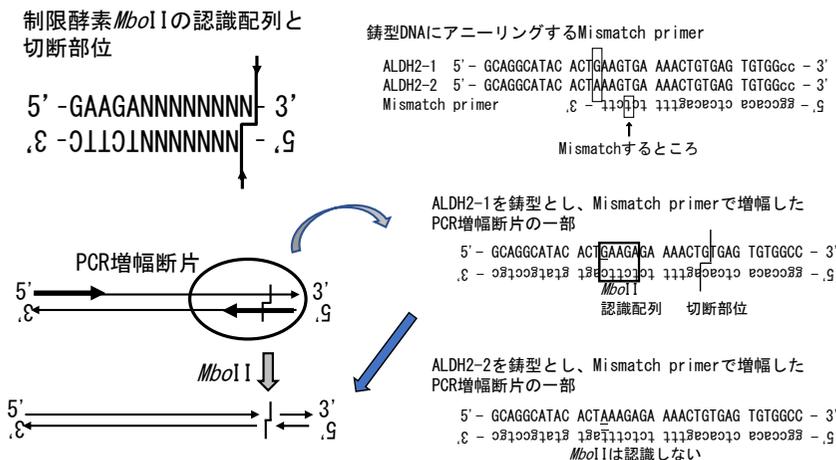
ALDH2-2 101 5' - GCAGGCATAC ACTAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'
 Normal primer 3' - × Cttcact tttgacactc acacc -5'

ALDH2-2 101 5' - GCAGGCATAC ACTAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'
 Mutant primer 3' - ← ← ← Tttcact tttgacactc acacc -5'



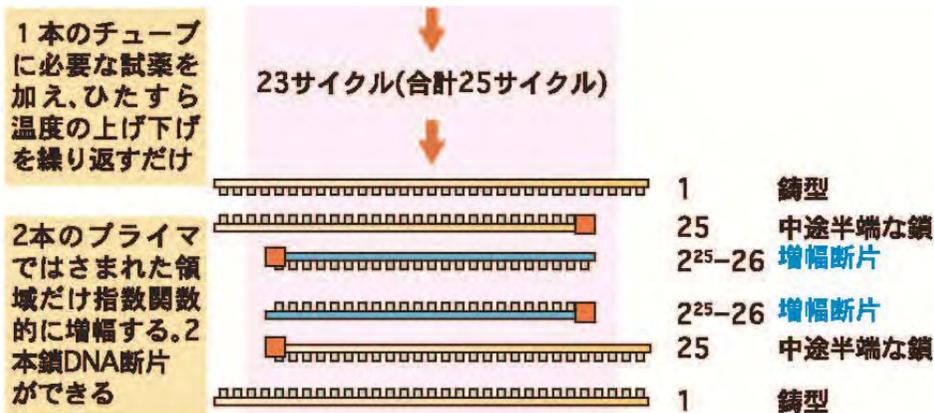
ALDH2-1 101 5' - GCAGGCATAC ACT**GAAG**TGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'
 ALDH2-2 101 5' - GCAGGCATAC ACT**AAAG**TGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'
 Mismatch primer 3' - ← ← ← ttc**T**ct ttgacactc acaccgg -5'

2. 変異部位を含まないPrimerで増幅したALDH2遺伝子の断片を、変異部位を認識する制限酵素による切断の有無を調べることで遺伝子型を推定する。



- 2種類のALDH2対立遺伝子間で変異している部分を3'末端とするPCR primer を利用し、PCR増幅の有無を調べることで遺伝子型を推定する。
- 変異部位を含まないPrimerで増幅したALDH2遺伝子の断片を、変異部位を認識する制限酵素による切断の有無を調べることで遺伝子型を推定する。

PCR法のプライマーと鎖伸長



特異的なPCRプライマーで増幅されたDNA断片 (135-bp or 137-bp) や制限酵素による切断の有無をアガロースゲル電気泳動法で確認します。

アガロースゲル電気泳動法の原理 増幅断片の確認

ゲルをのせるところ

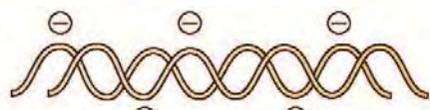
パワーサプライ: 100Vと50V

この簡単な装置で泳動する

穴のあいたアガロースゲル(寒天状)をつくる。6cm四方と小さい

粉末の寒天を泳動溶液に懸濁し、電子レンジで温めて溶かし、左図の型に流し込んで冷やし固める

アガロースゲル電気泳動法の原理



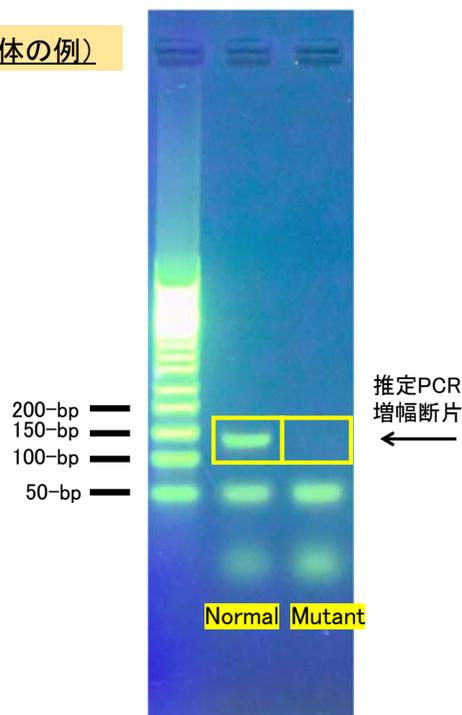
DNAは-の電荷をもっているので+極に移動する

アガロースと呼ばれる寒天で凹みつきのゲルをつくり、試料を凹みに入れて電気を通すことで、DNAをゲルの中で泳動させる

アガロースゲル電気泳動法の原理



電気泳動像(ホモ接合体の例)



電気泳動像(ヘテロ接合体の例)

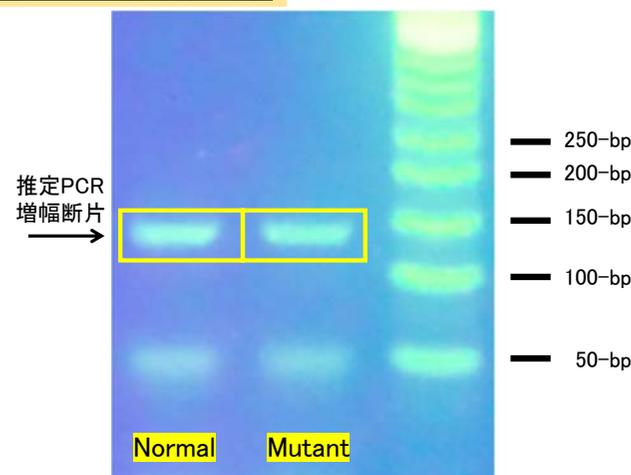


図1 PCR反応産物のアガロース電気泳動像

髪の毛のDNAを鋳型にし、ALDH2に特異的なプライマーを使ってPCRを行った。プライマーはForward primerの他に左からそれぞれ Normal primer (Normal)、Mutant primer (Mutant)を用いた。DNA分子量マーカーは50-bpラダーマーカー (Marker)を用いた。

対立遺伝子(2種) : Normal (ALDH2-1; N), Mutant (ALDH2-2; M)
 プライマー(3種) : Normal (n), Mutant (m), Mismatch
 遺伝子型(3種) : ALDH2-1/ALDH2-1 (NN), ALDH2-1/ALDH2-2 (NM), ALDH2-2/ALDH2-2 (MM)
 表現型(3種) : お酒が飲める, お酒がたしなみ程度に飲める, お酒が飲めない

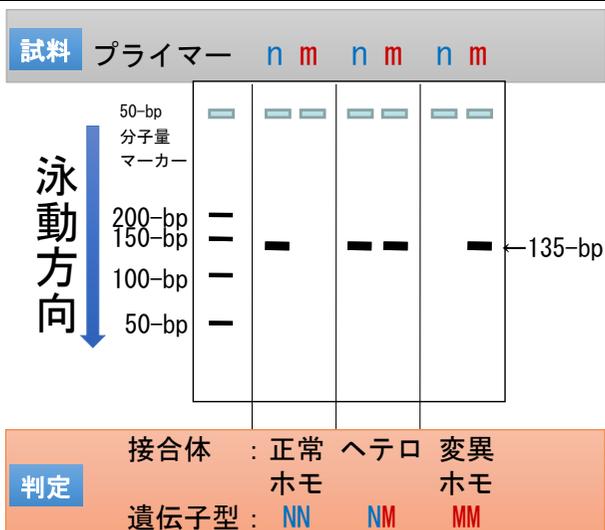


図2-4 本実験における理想的なアガロースゲル電気泳動像

レポートについて

1-2-4 レポートには目的、実験方法、結果、考察、課題の解答、の各項目を設ける。

結果について

- NormalとMutantプライマーを利用した結果
2日目と3日目の合計4セット(2人組)または2セット(3人組)の結果。
- Mismatchプライマーと制限酵素を利用した結果
2日目のMismatchプライマーの結果と制限酵素実験の合計3レーンの結果。
遺伝子型の推定以外にPCR断片精製の収率などもわかる。
- アルコールパッチテストの結果
実験の意義を吟味すること。3枚の時系列写真をまとめる。
- 遺伝子型推定の一覧表

電気泳動像の図について

電気泳動像の写真を張り付けただけでなく、写真の中に必要事項を書き込むなど、図としての体裁を整えるように

- 泳動方向は上から下へ
自分の試料と分子量マーカーのみトリミング
他人のデータを貼り付けない。
- 図のタイトル
- 図のレジェンド
- レーンの種類や説明
- 分子量マーカーのバンドの推定
- 目的の増幅断片の推定(その根拠の論理的な解説)

課題について

- 「DNA」は単なる名称。何が「同じ」なのか考える？
- ヒトゲノムやALDH2遺伝子の構造の中で、プライマーはどんな場所にアニーリング？
mRNAやタンパク質の構造は問うていない。
- PCR法との関連で解答。
今回の実験方法との関連も。