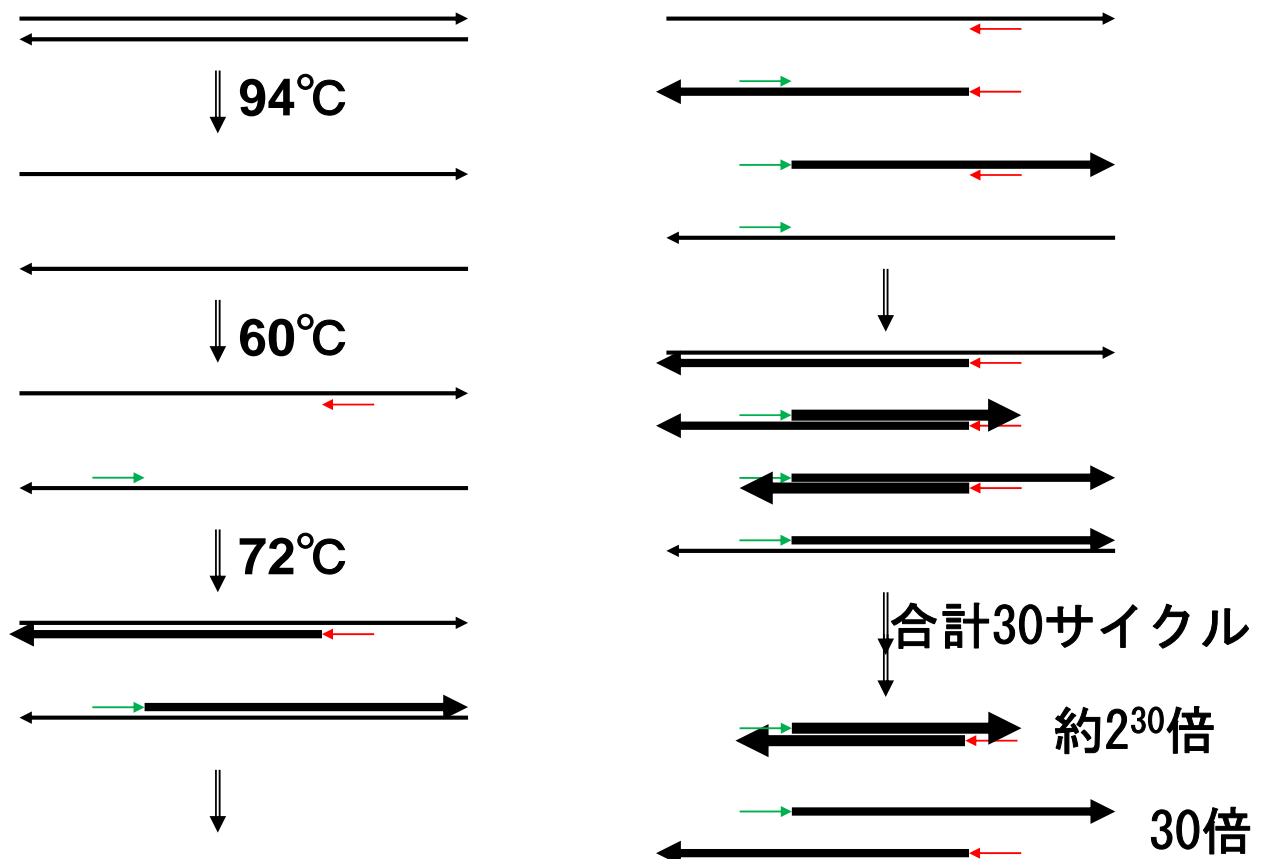


図2-1 PCR反応により増幅されるDNA断片



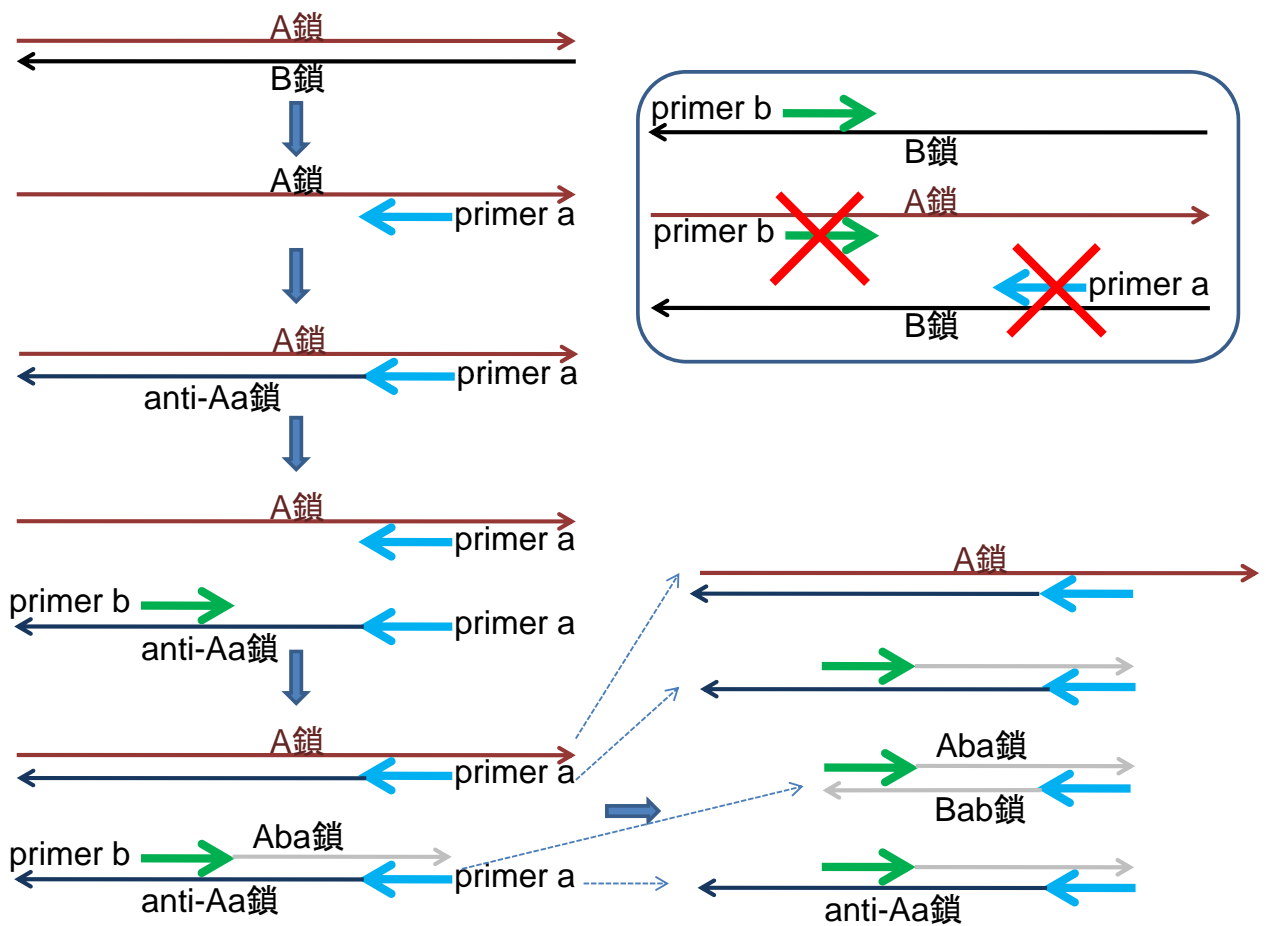


図2-2 PCR反応におけるPrimerのアニーリング その1

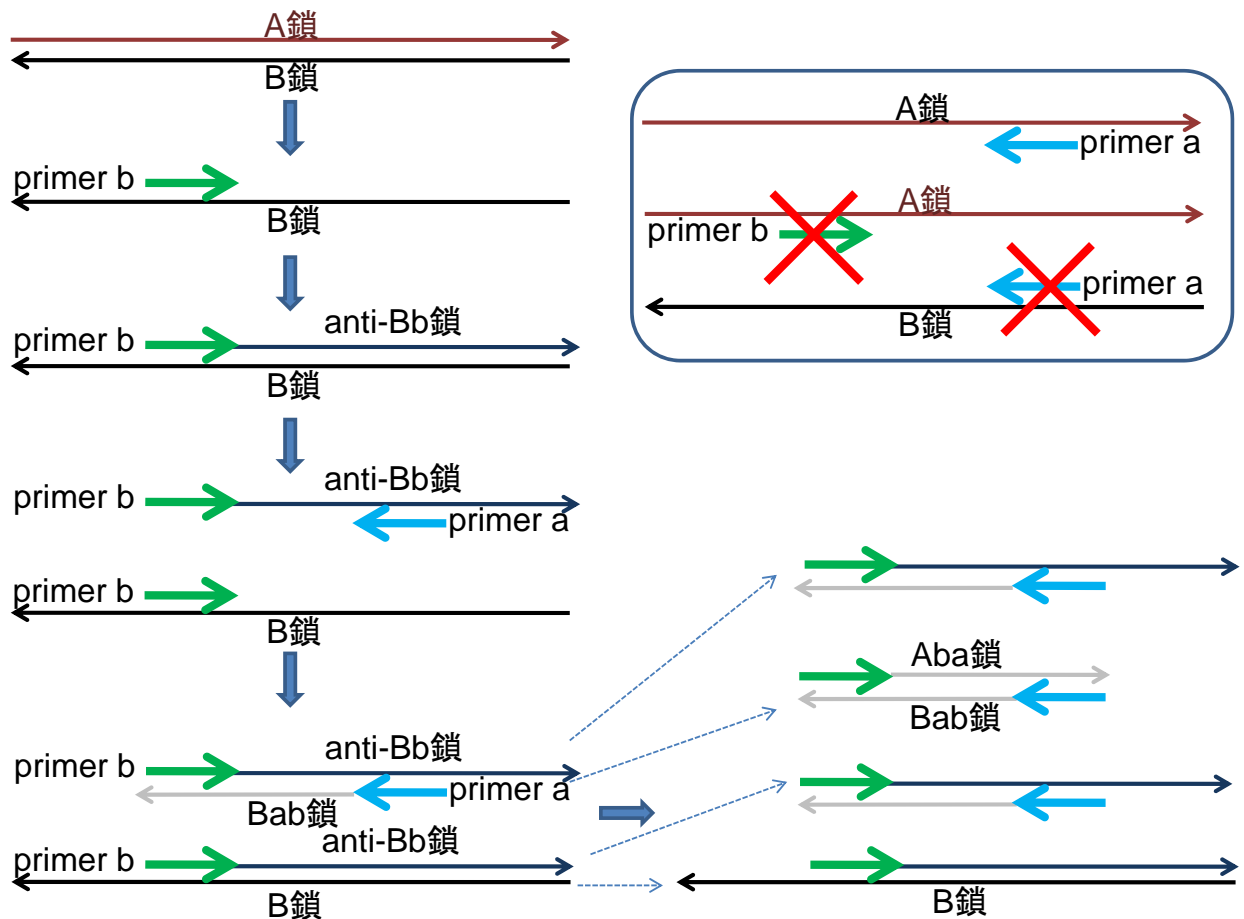
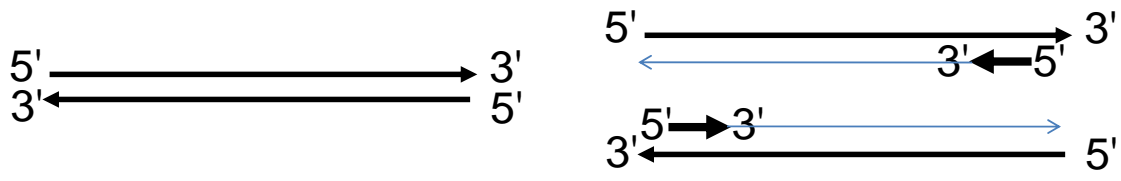


図2-3 PCR反応におけるPrimerのアニーリング その2



【ALDH2 gene, exon 12 付近の **正常型** の塩基配列】

1 caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg
 71 gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtggcc

↑
 a : **変異型**

【Primerの塩基配列】

- : 正常型に相補的なprimer; 5' - CCACACTCACAGTTTTCACTT**C**-3'
 - : 変異型に相補的なprimer; 5' - CCACACTCACAGTTTTCACTT**T**-3'
 - : Mismatch primer; 5' - GGCCACACTCACAGTTTT**ICTT**-3'
- 正常型、変異型両方にアニーリング
 制限酵素 *Mbo*I で切れるように変異
- : Forward primer; 5' - CAAATTACAGGGTCAACTGCT -3'

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
 5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'

↓ 熱変性 94°C、30秒

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
 5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'

↓ アニーリング 60°C、30秒

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
 5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'

Forward primer
 5' caaattacag ggtcaactgc 3' →
 Normal primer
 (Mutant primerは結合しても鎖延長しない)

↓ 鎖延長 72°C、20秒

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
 5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
 5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'

図5-1 ALDH2-1 と Normal primer
 ALDH2 gene, exon 12 の **正常型** の塩基配列 二本鎖構造における
Normal primerによる鎖延長

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actaaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACGTGAG TGTGG 5'

↓ 熱変性 94°C、30秒

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actaaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACGTGAG TGTGG 5'

↓ アニール 60°C、30秒

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actaaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACGTGAG TGTGG 5'

Forward primer → Mutant primer ← (Normal primerは結合しても鎖延長しない)

↓ 鎖延長 72°C、20秒

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actaaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACGTGAG TGTGG 5'

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actaaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AAACGTGAG TGTGG 5'

図5-2 ALDH2-1 と Mutant primer
ALDH2 gene, exon 12 の 正常型 の塩基配列 二本鎖構造における
Mutnat primerによる鎖延長

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtggcc 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACGTGAG TGTGGCC 5'

↓ 熱変性 94°C、30秒

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtggcc 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACGTGAG TGTGGCC 5'

↓ アニール 60°C、30秒

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtggcc 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACGTGAG TGTGGCC 5'

Forward primer → Mismatch primer ← (1塩基だけ異なるが鎖延長する)

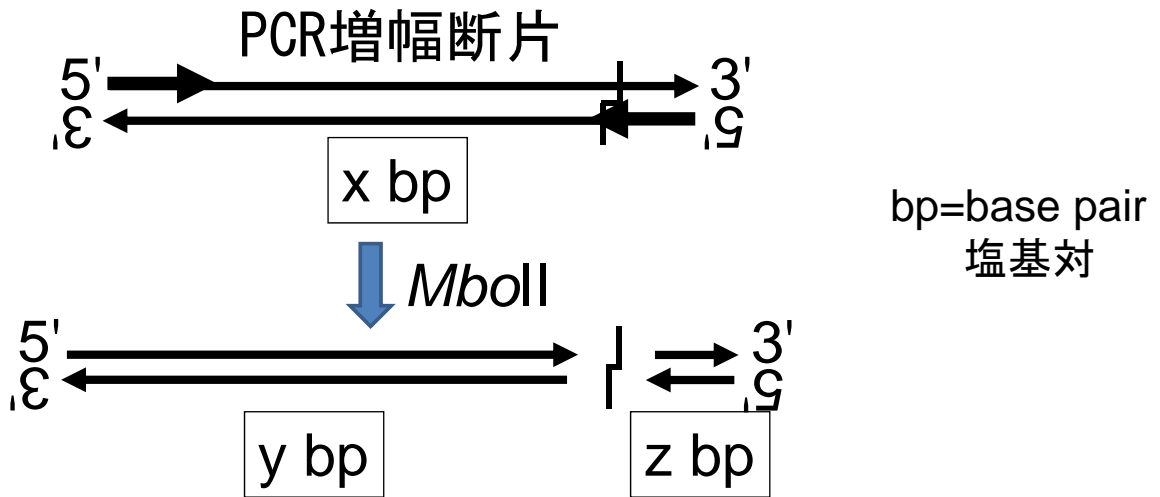
↓ 鎖延長 72°C、20秒

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACGTGAG TGTGG 5'

5' caaattacag ggtcaactgc tatgatgtgt ttggagccca gtcacccttt ggtggctaca agatgtcggg gagtggccgg gagttgggcg agtacgggct gcaggcatac actgaagtga aaactgtgag tgtgg 3'
3' TTTTAAATG CCGACGTC ATATCATACA ACCCGGGG CACGCGTGT CAGTGGCCG CAGTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AAACGTGAG TGTGG 5'

図5-3 ALDH2-1 と Mismatch primer
ALDH2 gene, exon 12 の 正常型 の塩基配列 二本鎖構造における
Mismatch primerによる鎖延長

制限酵素 *Mbol*I の認識部位と切断部位



対立遺伝子 : Normal (ALDH2-1; N), Mutant (ALDH2-2; M)
 プライマー : Normal (n), Mutant (m), Mismatch
 遺伝子型 : NN NM MM
 表現型 : 強い 弱い 飲めない (お酒が)

