

# 化学実験 有機・生化系実験 4-2

## PCR (Polymerase Chain Reaction)法による遺伝子型の解析

配布した冊子体テキストより詳しく記述してあります。

予習、レポートを書くときなどの参考に。

### ● 参考文献 ●

1. 芦田嘉之著「やさしいバイオテクノロジー」(サイエンスアイ新書) 2007年、2010年、2011年、2015年
2. 芦田嘉之著「カラー図解でわかる高校生物超入門」(サイエンスアイ新書) 2015年
3. Nakamura, K. *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 31, 439-445 (1993)

PCR primer の設計や制限酵素実験などは、この文献3を参考にした。

### ● 日程 ● 2023年度(火、水、木の5~10時限、12:50-17:50) 10~12人ずつ、年6回

予定: 気象等で変更の場合あり(詳しくは「もみじ」などで確認)

07月18日、19日                      07月25日、26日、27日

11月14日、15日、16日              11月21日、22日

01月23日、24日、25日              01月30日、31日、02月01日

### ● 実験の流れ ● 項目の数字は第3章、第4章参照

実験日が週3日の場合

1日目

3-2-1 毛髪の準備とDNAの抽出

3-2-2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応 【参考: 4-1. ピペットマンの使い方】

2日目

3-2-3 PCR 反応産物の検出 【参考: 4-2. アガロースゲル電気泳動法】

3-2-4 DNA断片(PCR反応産物[Mismatch])の精製 【参考: 4-3. PCR増幅断片の精製】

3日目

3-2-5 制限酵素によるDNA断片(PCR反応産物)の切断(反応中にアガロースゲル作成)

3-2-6 制限酵素反応によるDNA切断有無の検出 【参考: 4-2. アガロースゲル電気泳動法】

3-2-7 エタノールパッチテスト

3-2-8 遺伝子型の推定

実験日が週2日の場合(3-2-3を省略)

1日目

3-2-1 毛髪の準備とDNAの抽出

3-2-2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応 【参考: 4-1. ピペットマンの使い方】

3-2-7 エタノールパッチテスト

2日目

3-2-4 DNA断片(PCR反応産物)の精製 【参考: 4-3. PCR増幅断片の精製】

3-2-5 制限酵素によるDNA断片(PCR反応産物)の切断(反応中にアガロースゲル作成)

3-2-6 制限酵素反応によるDNA切断有無の検出 【参考: 4-2. アガロースゲル電気泳動法】

3-2-8 遺伝子型の推定

◆ 第1章 注意事項 ◆ (1-1. は冊子体テキストより詳しい、1-2. 1-3. はほぼ同じ)

- 1-1. 全般的な注意事項
- 1-2. レポートの書き方
- 1-3. 遺伝子実験における個人情報の取り扱いについて

◆ 第2章 目的・解説 ◆ ([解説] は冊子体テキストより詳しい)

- 2-1. 目的
- 2-2. 解説
  - 2-2-1 遺伝子と遺伝情報、遺伝子診断
  - 2-2-2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 法
  - 2-2-3 ヒトにおけるアルコール代謝
  - 2-2-4 本実験の戦略

◆ 第3章 実験方法 ◆ (冊子体テキストよりかなり詳しい。テキストと番号が異なる)

- 3-1. 準備・試薬
  - 3-1-1 試薬類
  - 3-1-2 器具類
- 3-2. 方法
  - 3-2-1 毛髪の準備と DNA の抽出
  - 3-2-2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応
  - 3-2-3 PCR 反応産物の検出
  - 3-2-4 DNA 断片 (PCR 反応産物[Mismatch]) の精製
  - 3-2-5 制限酵素による DNA 断片 (PCR 反応産物) の切断
  - 3-2-6 制限酵素反応による DNA 切断有無の検出
  - 3-2-7 エタノールパッチテスト
  - 3-2-8 遺伝子型の推定

◆ 第4章 機器類の使い方 ◆ (冊子体テキストより詳しい)

- 4-1. ピペットマンの使い方
- 4-2. アガロースゲル電気泳動法
- 4-3. PCR 増幅断片の精製

◆ 第5章 参考・課題 ◆ (冊子体テキストにない解説がかなりある)

- 5-1. 参考
- 5-2. 課題

## 第1章 注意事項 (冊子体テキストから抜粋および追加)

### 1-1. 全体的な注意事項 (冊子体テキストから抜粋および追加)

- 1-1.1 3人または2人1組の4班で行う。班分けは器具類の利用の都合で、実験は各自で行う。
- 1-1.2 班別の器具類はチェック表を使って初日の途中と最終日の終わりにチェックする。滅菌済みと非滅菌の器具が別々のカゴに入っている。共通器具や試薬類は中央の実験台にまとめて置いてある。
- 1-1.3 皮膚、フケ、唾液、衣類、空気、非滅菌の器具類などから DNA、核酸分解酵素、タンパク質分解酵素などの汚染を最小限にとどめる。
- 1-1.4 実験中は実験台を整理整頓し、余分なものを置かない。収納カゴなどは移動させない。
- 1-1.5 毎回、実験台を 75%エタノールと備え付けのキムタオルできれいに拭く。器具類をノートや実験台の上に無造作に置いたりして試料や器具類を汚染しないように注意する。
- 1-1.6 常に手を清潔に保つため、手を石鹸などでよく洗い、消毒用アルコールで拭く。特に手袋を着用する必要はないが、常に手を清潔に保つため、頻繁に手洗いする。実験中は沈黙を保つ。
- 1-1.7 ほとんどの試薬は氷（クーラーボックス）の中に保管し、ほとんどの操作も氷の中で行う。
- 1-1.8 共通試薬は中央の実験台に置いてある。使用直前に受け取り、使用后、すみやかに元の場所に返却する。
- 1-1.9 実験に有機溶媒を使わないので、ラベルシールは使わず油性マジックでチューブやガラス器具に直接ラベルを書く。ガラス器具の洗浄時にはエタノールなどでマジックを落とす。
- 1-1.10 マイクロチューブ、チップなどの消耗品、試薬は全て滅菌してある。唾液、フケ、空気中のホコリなどで汚染させないように。
- 1-1.11 特に試薬に触れる側の取り扱いに注意すること。試薬の計量中、試薬瓶ふたの内側に触れないように持ち、実験台等に置かない。マイクロチューブのふたの内側にも注意を向け、汚染を最小限にとどめる。
- 1-1.12 試薬の入ったチューブを持つときはチューブのキャップ付近を持ち、チューブに入っている試薬を指の体温で温めないように注意する。
- 1-1.13 すべてのマイクロチューブの保存試薬や反応試薬類は指ではじいて軽く攪拌し、小型遠心機でスピンドウンしてから使用する。共通試薬は、使用后、必ずスピンドウンしてから返却する。
- 1-1.14 有機実験で使用する洗浄ビン、ガラス器具等は一切使ってはならない（汚染防止）。
- 1-1.15 実験には所定の滅菌水、Nuclease-Free 滅菌水などを使用する。実験でイオン交換水を使うのは、電気泳動後のアガロースゲルのリンス時のみ。
- 1-1.16 器具類の洗浄はイオン交換水を使用。週番は適宜イオン交換水を無機・分析実験室へ取りに行く。
- 1-1.17 使用済みの三角フラスコ、メスシリンダは、すみやかにイオン交換水を少なくとも 5 回通して洗浄し、75%エタノールを 1 回通して風乾させる。ゲルメーカー、ゲルトレイ、コーム、タッパーなどは使用后すみやかにイオン交換水で洗い、キムワイブで拭き取り、所定の袋に入れて保管する。洗浄に洗剤は使わなくよい（かえって汚れる）。
- 1-1.18 マイクロチューブやチップ類は使い捨てとし、使用済みの消耗品はポリビーカーに一時保管し、使用済みのチップなどを実験台などに放置しない。  
使用済みの消耗品は滅菌してから廃棄するため、一般の実験ゴミとは区別して所定のバイオハザード用ゴミ袋（中央の実験台）に捨てる。
- 1-1.19 ピペットマンは「4-1. ピペットマンの使い方」を熟読してから使用する。  
すべてのピペットマン操作で、新しい滅菌チップに交換する（保存試料の汚染防止のため）。

## 1-2. レポートの書き方 (冊子体テキストとほぼ同じ。若干追加)

- 1-2-1 ここに示してあるのはあくまで生化学実験のレポートの書き方なので、他の実験ではそれぞれの実験の指示にしたがってレポートを作成すること。
- 1-2-2 レポートは「酵素の精製と酵素反応速度」と「PCR 法による遺伝子型の解析」の 2 部に分けて作成し、それぞれ図表も含めて A4 レポート用紙 5 枚程度にまとめる。
- 1-2-3 レポート (2 部) は第 8 週の実験終了後にまとめて提出する。
- 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。原理は実験前に各自でよく勉強しておかねばならないが、レポートには不要である。
- 1-2-5 レポートでは**結果と考察**が最も重要な部分なので、この部分にウェイトを置いてレポートを作成すること。アガロースゲル電気泳動像から遺伝子型を推定した過程を根拠を示しながら論理的に書くこと。
- 1-2-6 実験方法は、基本的には「実験書 p000~p000 に記載の方法に従って行った。」でよいが、記載内容と異なる方法で行った事柄に関しては、そのことをもれなく明記すること。
- 1-2-7 測定結果はデータを羅列するのではなく、わかりやすい図や表などを効果的に使って実験項目ごとにまとめること。
- 1-2-8 実験に失敗したと思われる場合も実験結果と考察 (失敗の原因と対策、自分の実験結果から考察可能なこと、正しいデータが出た場合に考察できることなど) をきちんと書くこと。
- 1-2-9 レポートはワープロで書いてよいが、他人のファイルや文章をそのままコピーせず、必ず自分の言葉で書くこと。
- 1-2-10 考察や課題を解くのに **Wikipedia** や **質問サイト** の記述をコピーするケースが目立つ。コピーは論外だが、これらの記述は必ずしも正しいとは限らないので (間違いが多い)、きちんと吟味すること。

## 1-3. 遺伝子実験における個人情報の取り扱い (冊子体テキストとほぼ同じ)

- 1-3-1 実験に使った各自のゲノム DNA、PCR 増幅断片等の試料は、実験終了後すべて回収し、分解処理をした後廃棄します。また、実験に使ったマイクロチューブ、チップ、アガロースゲルもすべて回収し、滅菌して廃棄します。
- 1-3-2 アガロースゲル電気泳動の泳動像は各自が管理することとし、泳動像を大学が収集・保管することはありません。
- 1-3-3 レポートに記載された内容は評価に使うだけで、評価後、レポートは実験者各自に返却します。大学がレポートに記載された結果を収集・保管することはありません。

## 第2章 目的・解説 ([解説] は冊子体テキストより詳しい)

### 2-1. 目的 (冊子体テキストとほぼ同じ)

身近な代謝過程の1つであるアルコールの代謝に関与する、アルデヒド脱水素酵素 2 (Aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2, EC 1.2.1.10) の**遺伝子型**を、毛髪から DNA を抽出し、PCR 法を用いて推定する。

また、これを通して、DNA や制限酵素の取り扱い、PCR 法、DNA の電気泳動法などについて学ぶ。

なお、今回の方法での推定結果は確定的な診断ではなく、あくまでおおよその判定であることに注意し、さらに、判定が正常型ホモ接合体と予想されても、大量飲酒が可能であるなどの誤解をしないよう留意すること。

### 2-2. 解説 (冊子体テキストより詳しい)

#### 2-2-1 遺伝子と遺伝情報、遺伝子診断

**遺伝子** (Gene) の本体が DNA であることや、DNA が**二重らせん構造**をとっていることは今さら言うまでもないことであろう。DNA 中の連続した 3 塩基の配列 (コドン) が 1 つのアミノ酸をコードすることによって**タンパク質**のアミノ酸配列が指定されており、これに基づいて合成されたタンパク質が機能することによって生物個体に種々の性質が表れる。また、個体中のどこで、いつ、どのタンパク質を合成するか (あるいは合成しないか) も DNA の塩基配列により決定されている。すなわち、DNA の塩基配列こそが**遺伝情報**である。

遺伝情報を担う DNA の塩基配列に**変異** (Mutation) が存在すると、時には正常な機能を持たないタンパク質が発現し、遺伝病を生じることがある。

近年、**ゲノム**解析の進展や細胞生物学的研究の進歩によって、遺伝子変異と疾患との関係の解明は、かなり進んできている。

しかしながら、**遺伝子診断**や、遺伝子治療は倫理的な面も含めて、多くの課題を残している。

#### [参考]

1. 遺伝子、DNA、ゲノム、遺伝情報などの基本用語は、芦田嘉之著「やさしいバイオテクノロジー カラー版」と「カラー図解でわかる高校生物超入門」にかなり詳しく解説してある。
2. このサイトの[5-1. 参考]にも解説があるので参考に。



## 2-2-2 PCR(Polymerase Chain Reaction)法

**PCR法**は、鋳型となる DNA、2種類の Primer、耐熱性 DNA polymerase、および DNA の monomer である 4 種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) などを混合し、温度の上げ下げを繰り返すことによって**特異的**な領域のみを試験管内で効率よく**増幅**する技術であり、熱変性、アニーリング、伸長反応の 3 ステップを 1 サイクルとして、通常 20~30 サイクル繰り返す。

PCR 反応は通常の DNA 複製過程を模しており、**向かい合った一組の Primer** を使うことで、**特異的領域のみ増幅**することを実現している。

DNA 複製に関与する DNA polymerase は単独で DNA を合成することはできず、鋳型鎖に相補的に結合した Primer を頭にして、鋳型鎖の塩基に相補的な塩基を結合させる形で伸長反応を触媒する。

PCR 反応の**第 1 段階**は 2 本鎖の DNA を 1 本鎖に分離する**熱変性**で、通常 94°C から 96°C の熱をかける。

**第 2 段階**では、2 種類の特異的 Primer と 1 本鎖になった鋳型 DNA を**アニーリング**させる。

仮に 16 塩基の Primer を用いるとすると、その塩基配列は 4 の 16 乗 (塩基は 4 種類ある) = 約 43 億通りある。Human Genome の場合、30 億塩基対の遺伝情報があることから、既知の配列情報に基づいて 16 塩基長の Primer を作ると、その Primer は計算上 Human Genome の特定の 1ヶ所とのみアニーリングすることになる。

実際には Primer と鋳型 DNA とのアニーリングは溶液の温度や塩濃度などに依存することから、もう少し長い Primer を設計するが (本実験では 22 塩基長)、理論上、適切な Primer を設計するだけで特定の領域のみを増幅できることになる。

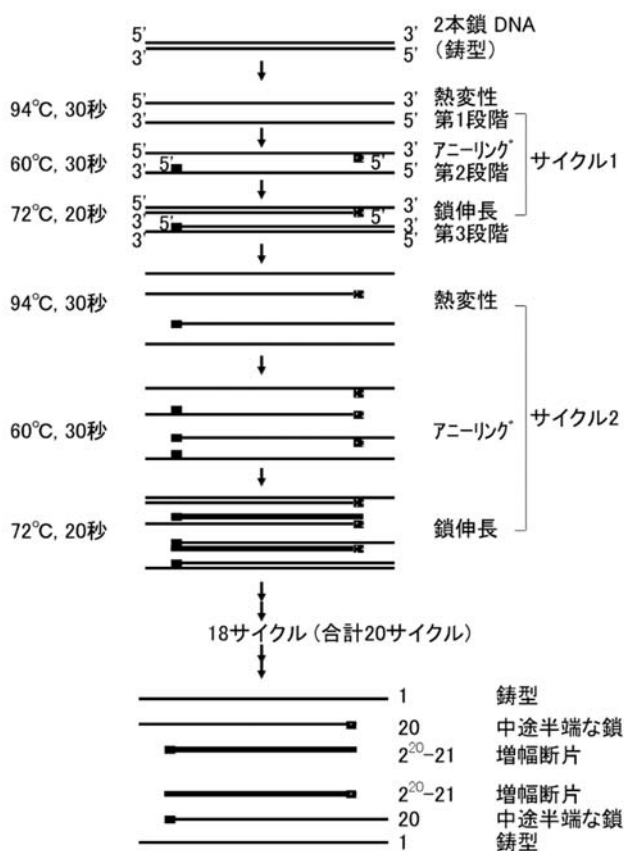


図2-1 PCR反応により増幅されるDNA断片

通常、鋳型 DNA、ふぞろいな DNA、Primer DNA は量が少ないため見えず、増幅された DNA 断片のみが可視化される。

生きた細胞内の DNA 合成過程では生合成された RNA primer が使われ、複製後、RNA の部分は分解・修復され DNA に置き換えられる。PCR 反応では、より安定な DNA primer を用いる。

**第 3 段階**では DNA polymerase を用いて鋳型 DNA と相補的な DNA 鎖を合成する。

DNA polymerase による**伸長反応**を 1 種類の Primer で 20 回繰り返しても、DNA は 20 倍にしかならない。実際に PCR 反応でも、最初に反応のために加えた DNA が鋳型に使われたときは、いろいろな長さの断片がサイクル数倍合成される (図 2-1 の「中途半端な鎖」)。

しかし、向かい合った 2 種類の Primer を使うと、前の反応で合成された DNA 断片も鋳型になるため、20 回反応すると Primer で挟まれた領域は計算上およそ 2 の 20 乗倍 (約 10<sup>6</sup> 倍) に増幅されることになる。

増幅された DNA 断片はアガロースゲル電気泳動法により分子量の違いで分離し、DNA を染色して可視化することができる。

このような PCR 法の原理は 1983 年に発見されていたが、当初は体温付近で働き、熱で失活する普通の DNA polymerase (Klenow fragment) を使っていたため、第 2 段階のアニーリングの後に新しい DNA polymerase (高価) を追加する必要があり、自動化が困難であった。

しかし幸いにも、米国イエローストーン国立公園の自噴泉に生息し、80℃の高温でも生育できる高度好熱菌 (*Thermus aquaticus*) から熱に強い DNA polymerase (この細菌の学名から **Taq DNA polymerase** と呼ばれている) が発見されており、1988 年にこの **Taq DNA polymerase** を用いて自動化された機器が紹介されると、PCR 法はその迅速さと簡便さによって爆発的に普及した。

この PCR 法の原理を最初に思いついた Kary Banks Mullis は 1993 年にこの「発見」でノーベル「化学賞」を受賞しているが、実際に高度好熱菌の酵素を利用して PCR 法の自動化を成し遂げたのはアメリカのベンチャー企業シータス社の面々である (Mullis もシータス社の研究員だが 1986 年に退社していた)。

## [参考]

1. PCR 法とアガロースゲル電気泳動法は、「やさしいバイオテクノロジー カラー版」 pp124-133 に詳しく解説してある。
2. PCR 法についてより詳しく理解するためには、次の書籍がためになる。  
ラビノウ著、渡辺政隆訳「PCRの誕生」(みすず書房) 1998年10月刊

## PCR 反応における Primer のアニーリングに関する補足説明

DNA 鎖には方向があり、2本の DNA 鎖は逆向きであり、DNA polymerase が触媒する伸長反応には方向がある。2本鎖 DNA を A 鎖、B 鎖とし、PCR primer を a、b とする。A 鎖に Primer a、B 鎖に Primer b がアニーリングするとする。

Primer b は A 鎖と同じ方向で、Primer a は B 鎖と同じ方向である。

したがって、A 鎖にアニーリングする Primer は Primer a だけで、A 鎖と同じ方向の Primer b はアニーリングしない。

同様に、B 鎖には Primer b だけがアニーリングし、Primer a はアニーリングしない (図 2-2)。

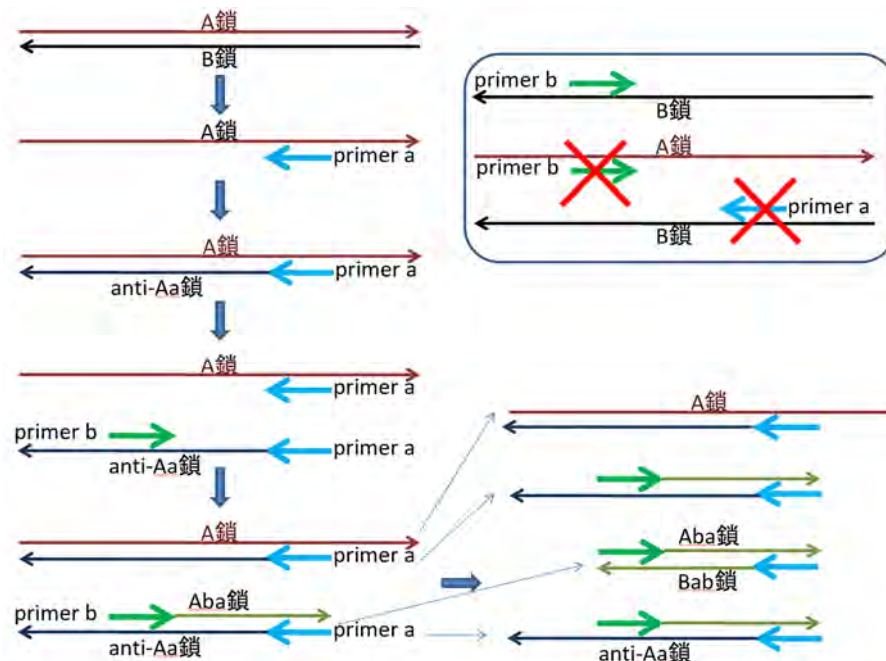


図2-2 PCR反応におけるPrimerのアニーリング その1

PCR の第 1 サイクルの時、A 鎖に Primer a がアニーリングして伸長する。新たに合成された鎖を anti-Aa 鎖とする。PCR 過程全体でこの anti-Aa 鎖ができるのは鋳型の A 鎖に Primer a がアニーリングしたときだけのため、anti-Aa 鎖は PCR のサイクル数分だけ合成される。

この anti-Aa 鎖は A 鎖の相補鎖で B 鎖と同じ方向のため、この鎖が鋳型となったとき、Primer b だけがアニーリングする。

新たに合成された鎖を **Aba 鎖** とする。この **Aba 鎖** は鋳型 DNA の **A 鎖** と同じ方向であり、**Primer b** から **Primer a** までの領域の断片である。

すなわち **Aba 鎖** は **Primer b** の塩基配列から始まり、**Primer a** の相補鎖の逆配列で終わる。

**Aba 鎖** は **A 鎖** と同じ方向のため、**Primer a** だけがアニーリングする。

新たに合成された鎖を **Bab 鎖** とする。

この **Bab 鎖** は鋳型 DNA の **B 鎖** と同じ方向であり、**Primer a** から **Primer b** までの領域の断片である。

すなわち、**Bab 鎖** は **Primer a** の塩基配列から始まり、**Primer b** の相補鎖の逆配列で終わる。

**Aba 鎖** と **Bab 鎖** はお互いに相補的で同じ長さである。

次に、**B 鎖** をみてみよう (図 2-3)。

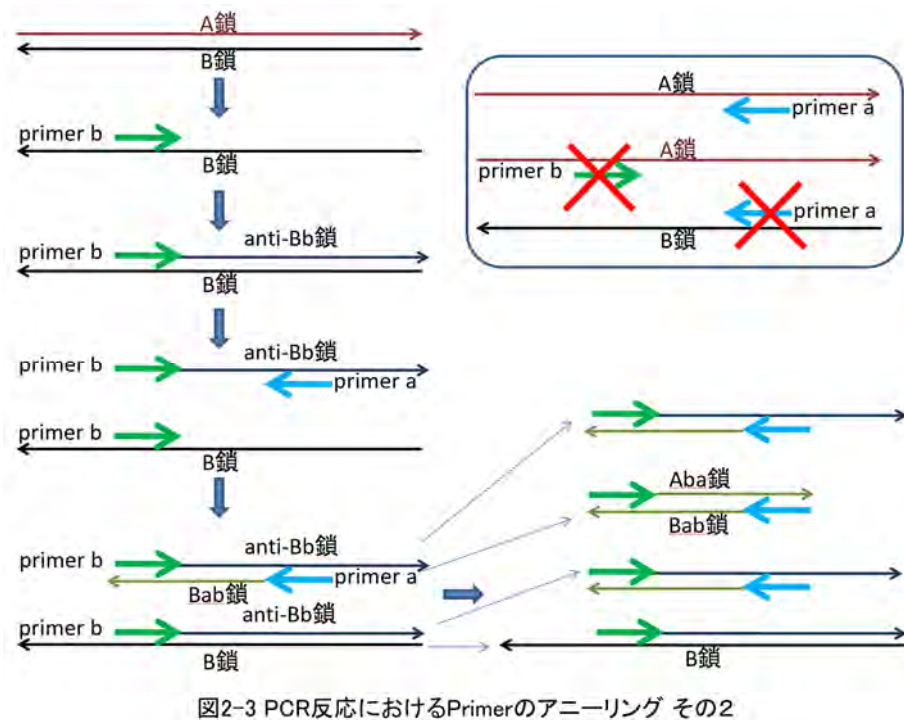


図2-3 PCR反応におけるPrimerのアニーリング その2

PCR の第 1 サイクルの時、**B 鎖** に **Primer b** がアニーリングして伸長する。新たに合成された鎖を **anti-Bb 鎖** とする。

この **anti-Bb 鎖** も上記 **anti-Aa 鎖** の時と同じような過程で PCR 反応が起こり、結果的に上記と同じ **Aba 鎖**、**Bab 鎖** が合成される。

PCR 反応を  $n$  回繰り返すと、結果的に理想的には **anti-Aa 鎖** や **anti-Bb 鎖** は  $n$  個合成され、2 種の **Primer** で挟まれた領域である **Aba 鎖** や **Bab 鎖** は約  $2$  の  $n$  乗個合成されることになる。

**anti-Aa 鎖** や **anti-Bb 鎖** は不揃いであるが、**Aba 鎖** や **Bab 鎖** はすべて同じ長さである。

PCR 反応の前後で鋳型の **A 鎖** や **B 鎖** は変化しない。

### 2-2-3 ヒトにおけるアルコール代謝

ヒトにおけるアルコール代謝は以下の経路によっており、毒性のあるアセトアルデヒドの代謝能力が飲酒許容量に影響している。ヒトの**アルデヒド脱水素酵素** (Aldehyde dehydrogenase) **ALDH** は少なくとも **ALDH1** ~ **ALDH6** の 6 種類あり、**ALDH1** (高  $K_m$ ) および **ALDH2** (低  $K_m$ ) の 2 種がアルコール代謝に関与している。

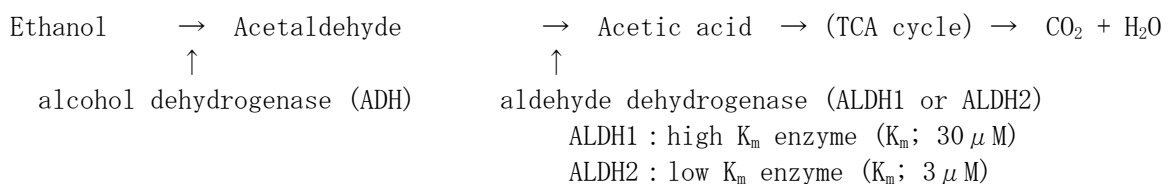


図 2-4 肝臓におけるアルコール代謝



ALDH2 欠損症では、*ALDH2* 遺伝子のエキソン 12 上にある 1 つのコドン(遺伝子全体では 487 番目のコドン)が正常型 (*ALDH2-1*) の GAA に対し、変異型 (*ALDH2-2*) では AAA になっているため、対応するアミノ酸がグルタミン酸から、リジンに変わっている。この 1 塩基置換による 1 アミノ酸置換の結果、アルデヒド脱水素酵素活性は劇的に消失する。そのため、**正常型と変異型のヘテロ接合体(*ALDH2-1/ALDH2-2*)**では、ALDH2 の弱い活性が存在する**部分欠損**となり、**変異型ホモ接合体(*ALDH2-2/ALDH2-2*)**では ALDH2 活性が**完全に欠損**する。

*ALDH2-1* 由来の酵素にアセトアルデヒド分解活性があり、*ALDH2-2* 由来の酵素にその活性がないこと、および *ALDH2-1* を持つヒトの方が多いため、一般的に上記のように *ALDH2-1* を正常型 (野生型)、*ALDH2-2* を変異型と呼んでいるが、この呼称は 2 種類の遺伝子の優劣を決めるものではない。

アルデヒド脱水素酵素は 4 量体として働く。ヘテロ接合体の場合、*ALDH2-1* タンパク質と *ALDH2-2* タンパク質が混在しているが、*ALDH2-1* の 4 量体のみ酵素活性がある。

4 量体のうち、1 分子でも *ALDH2-2* が含まれる場合、酵素活性はなくなる。

*ALDH2* の変異型(*ALDH2-2*)は**常染色体不完全優性遺伝**を示し、東洋人に多く見られる。日本人では、完全欠損型(*ALDH2-2/ALDH2-2*)が約 7%、部分欠損型(*ALDH2-1/ALDH2-2*)が約 40%と *ALDH2-2* 遺伝子の頻度が高い。欧米やアフリカの人々の 100%近くは *ALDH2-1* のホモ接合体である。

*ALDH2-1* のホモ接合体の人は飲酒許容量が高いことからアルコール依存症や、アルコールが原因の多くの病気になりやすい。アルコール過飲による発病を予防できるという点では、半数近くの東洋人が持つ *ALDH2-2* 遺伝子のメリットは大きい。

*ALDH2-2* を持つヒトに一気飲みなどを強要すると、急性の中毒などにより命を落とすこともある。このように、飲酒許容量は遺伝子によって決定されており、*ALDH2-2* が *ALDH2-1* に突然変異する可能性もほとんどないことなどから、完全欠損型(*ALDH2-2/ALDH2-2*)のヒトの飲酒許容量が訓練などにより増すことはない。

実は、ヒトのお酒に対する許容量と ALDH2 タンパク質の機能との関係は、これまでに解説したほど単純ではなく、*ALDH2* 遺伝子以外にも飲酒許容量に関与する遺伝子があるため (たとえば Alcohol dehydrogenase 1B)、*ALDH2* 遺伝子のみで単純に飲酒許容量を説明できるわけではない。遺伝子型と表現型は、単純に対応しているように見えるが、ある遺伝子が特定の表現型を説明できる例は意外と少なく、多くの遺伝子は単純に表現型と対応しているわけではない。

## [参考]

1. アルデヒド脱水素酵素遺伝子については、「やさしいバイオテクノロジー カラー版」 pp106-109 に解説してある。
2. 対立遺伝子、遺伝子型、表現型などは同著「1-2 分子生物学の基礎と細胞生物学」、「1-3 ミクロな生物学」、pp102-103 などに解説してある。
3. アルデヒド脱水素酵素 2 ALDH2 について
  - ・対立遺伝子=>*ALDH2-1*、*ALDH2-2* の 2 種類
    - 対立遺伝子 *ALDH2-1* と *ALDH2-2* の具体的な違いは「5-1. 参考」に示してある。
  - ・遺伝子型=>*ALDH2-1/ALDH2-1*、*ALDH2-1/ALDH2-2*、*ALDH2-2/ALDH2-2* の 3 種類
  - ・表現型=>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 の 3 種類

## 2-2-4 本実験の戦略

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まっていることから、前ページの「参考」のように 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. 置換部位を含まない Primer で増幅した *ALDH2* 遺伝子の断片を、置換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遺伝子型を推定する。

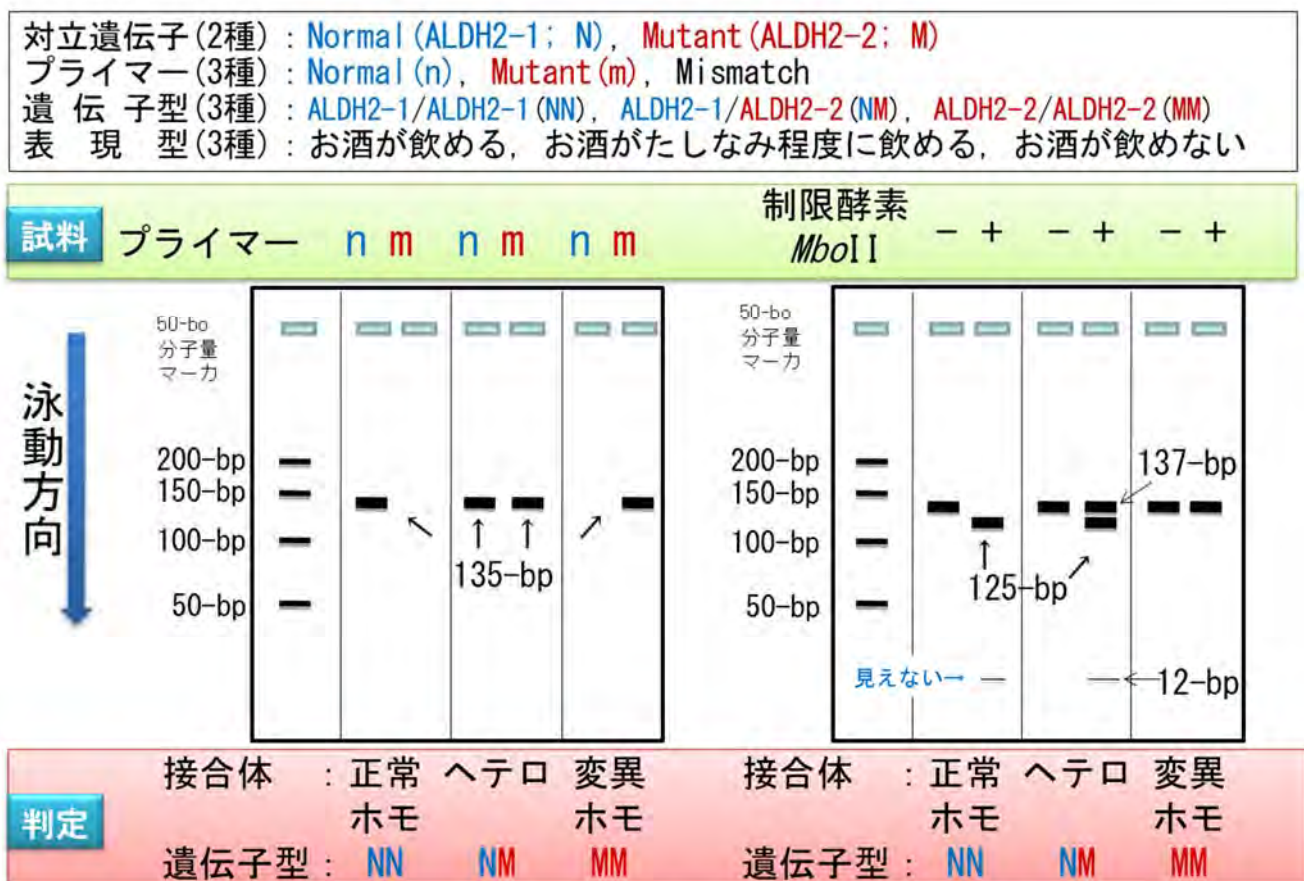


図2-5 本実験における理想的なアガロースゲル電気泳動像

## [参考]

Nakamura, K. *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, **31**, 439-445 (1993)  
PCR プライマーの設計や制限酵素実験などはこの文献を参考にした。

## 第3章 実験方法 (冊子体テキストよりかなり詳しい)

### 3-1. 準備・試薬 (冊子体テキストよりかなり詳しい)

#### 3-1-1 試薬類

滅菌水、1000 ml、1本

蒸留水をオートクレーブ滅菌済、室温保存

1X TE、50 ml、研究室、滅菌済

Proteinase K 溶液および Primer 溶液の希釈に使用、室温保存

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0)

エタノール、99.5% 特級、500 ml、1本、室温保存

タンパク質分解酵素、Proteinase K solution、和光純薬・分子生物学用、162-22751、5 ml

20 mg/ml, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20% (v/v) Glycerol 溶液

*Tritirachium album* 由来

使用前に 1X TE で 50 倍希釈して分注、4°C 保存、冷凍不可

PCR 試薬、2X GoTaq Green Master Mix、プロメガ、M7122、100 回分×2本

Buffer, 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, *Taq* DNA polymerase, blue dye, yellow dye, and sufficient density for direct loading onto agarose gel.

300 μl、4 本分注、冷凍保存

Primer 溶液

4 種、SIGMA GENOSYS、各 50 μM, 10 mM Tris-HCl 0.1 mM EDTA (pH 8.0) 溶液

Forward primer; 5' - CAAATTACAGGGTCAACTGCT -3' T<sub>m</sub>=60.6°C ○

Normal primer; 5' - CCACACTCACAGTTTTCACTTC -3' T<sub>m</sub>=61.2°C ●

Mutant primer; 5' - CCACACTCACAGTTTTCACTTT -3' T<sub>m</sub>=60.6°C ●

Mismatch primer; 5' - GGCCACACTCACAGTTTTCTCTT -3' T<sub>m</sub>=65.5°C ●

各 Primer を 4 μM になるように 1X TE で希釈、各 4 本、冷凍保存

泳動用緩衝液、10X TAE Buffer (pH 8.3)、ナカライテスク、35430-61、1 L

400 mM Tris-acetate, 10 mM EDTA (pH 8.3)

1 本分注、室温保存

Agarose LE (低電気浸透) 電気泳動用 SP、ナカライテスク、01157-66、100 g

2 本分注、室温保存

DNA 染色試薬、GelStar Nucleic Acid Stain、タカラバイオ、F0535、250 μl×2in DMSO

2 本分注、遮光、冷凍保存

DNA 分子量マーカー、Loading Quick 50-bp DNA Ladder、東洋紡、DNA-133、100 μg

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM NaCl, 5% Glycerol, 10 mM EDTA, 0.05% Bromophenol Blue 溶液、0.1 μg/μl  
50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800-bp DNA

1 本分注、冷凍保存

DNA 精製用キット、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System、Promega、A9282、250 Preps

Membrane Binding Solution ●

4.5 M Guanidine isothiocyanate, 0.5 M Potassium acetate (pH 5.0)

5 本分注、室温保存

Membrane Wash Solution

10 mM Potassium acetate (pH 5.0), 80% Ethanol, 16.7 μM EDTA (pH 8.0)

5 本分注、室温保存

Nuclease-Free 滅菌水 ●、5 本分注、室温保存

SV Minicolumn、人数分 分注

Collection Tube、人数分 分注

制限酵素 *Mbo*II ●、タカラバイオ、1145A、400 units 40 μl

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 0.02% Bovine serum albumin, 50% Glycerol 溶液 10 units/μl

*Moraxella bovis* 由来

2 本分注、冷凍保存

制限酵素用緩衝液、10X Buffer ●、制限酵素に添付、1 ml

100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol 溶液

4 本分注、冷凍保存

10X Gel-loading Buffer ●、制限酵素に添付、1 ml

1% SDS, 50% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue 溶液

4 本分注、室温保存

### 3-1-2 器具類

#### 1) グループ配布用器具 (2 または 3 人用) 4 セット)

カゴ大、1 個

三角フラスコ、300 ml、1 個

メスシリンダ、50 ml、1 個

タッパー (ふた付き)、ゲル洗浄用、1 個

紙製チューブボックス、冷凍保存用、紙製、1 個

紙製チューブ立て、1.5 ml チューブ用・室温用、紙製、人数分

極細マジック、1 個

ガーゼ付き絆創膏、人数分

つま楊枝、1 箱

滅菌カゴ、1 個

マイクロチューブ 1.5 ml (ラック入り)、滅菌済、1 箱

イエローチップ (ラック入り)、滅菌済、2 箱

ブルーチップ (ラック入り)、滅菌済、1 箱

ピペットマン、Nichiryo 00-NLE-20、2-20 μl 用、1 本

ピペットマン、Nichiryo 00-NLE-200、20-200 μl 用、1 本

ピペットマン、Nichiryo 00-NLE-1000、100-1000 μl 用、1 本

はさみ、美容用、人数分

クーラーボックス、ふた付き、1 個

マイクロチューブポート浮つき一、1.5 ml チューブ用・氷冷用、スポンジ製、1 個  
96 穴チューブラック、0.2 ml チューブ用・氷冷用、1 個

電気泳動用カゴまたは箱、1 個

Mupid-2 plus 電気泳動槽、カバー付き、ADVANCE、1 台

Mupid-2 plus パワーサプライ、1 個

(Mupid-2 電気泳動槽、カバー付き、ADVANCE、1 台)

(Mupid-2 パワーサプライ、1 個)

ゲルメーカースタンド、1 個

ゲルメーカー用ゲルトレイ、1 枚

ゲルメーカー用コーム、1 本

洗浄瓶、イオン交換水用、500 ml、1 個

洗浄瓶、75%エタノール用（イオン交換水で希釈）、500 ml、1 個

消毒用エタノール、健栄製薬、500 ml、1 個

ポリビーカー、廃棄物用、1000 ml、1 個

キムワイプ、1 個

ペーパータオル、1 巻

## 2) 共通の機器

PCR 装置、プログラムテンプコントロールシステム、アステック、PC-708-02、1 台

トランスイルミネータ、UVP、White/UV Transilluminator, TMW-20, 302nm/White, 100V, 8W, 1 台

ヒートブロック中温用、TAITEC、HTB、1 台

ヒートブロック高温用、YAMATO、HF-21、1 台

マイクロチューブ用高速遠心機、エッペンドルフ、ミニスピンドル、2 台

8 連式 PCR チューブ用ミニ遠心機、LMS、GMG-060、1 台

ミニ遠心機、LMS、MCF-2360、1 台

ボルテックスミキサー、VORTEX-GENIE 2 Mixer、1 台

電子レンジ、MAX8402A6、1 台

電子レンジ用タッパー、1 個

イオン交換水用タンク、10 L、1 個

冷凍冷蔵庫（化学実験準備室）、東芝、GR-22T、1 台

### 3) 共通の器具・消耗品

1X TAE Buffer 用保存ビン、500 ml、1000 ml、各 1 本

1X TAE Buffer 用メスシリンダ、500 ml、1 個

エッペンドルフチューブ キャップロック、20 個

サランラップ、1 個

アルミホイル、1 個

ラテックス手袋、Diamond Grip Plus S サイズ、100 枚、1 箱

ラテックス手袋、Diamond Grip Plus M サイズ、100 枚、1 箱

ラテックス手袋、Diamond Grip Plus L サイズ、100 枚、1 箱

バイオハザード用ゴミ袋、オートクレーブ袋、1 個

三角コーナーゴミ箱、1 個

三角コーナーゴミ箱用水切り袋、1 個

大学指定難燃用廃液タンク、1 個

可燃ゴミ箱（市指定赤ゴミ袋）、1 個

### 共通試薬用ラック

PCR 試料用 96 穴チューブラック（ふた付き）、0.2 ml 96 穴、2 個

マイクロチューブ立て、1.5 ml チューブ用・室温用、紙製、2 個

マイクロチューブポート浮っきー、1.5 ml チューブ用・氷冷用、スポンジ製、1 個

コロコロラック、15 ml と 50 ml チューブ用・室温用、紙製、4 個

### 4) ストック、予備

マイクロチューブ 0.2 ml、1,000 本、1 袋

マイクロチューブ 1.5 ml、500 本、1 袋

イエローチップ、1000 本、2 袋

ブルーチップ、250 本、2 袋

イエローチップ用ラック、2 個（予備）

ブルーチップ用ラック、2 個（予備）

クラッシュアイス用クーラーボックス、ふた付き、2 個（予備）

## 3-2. 方法 (冊子体テキストよりかなり詳しい)

[参考] Nakamura, K. *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, **31**, 439-445 (1993)  
PCR primer の設計や制限酵素実験などはこの文献を参考にした。

### 3-2-1 毛髪の準備と DNA の抽出

1. 紙製チューブ立てに立ててある Proteinase K (0.4 mg/ml、タンパク質分解酵素) 溶液入りの 1.5 ml マイクロチューブに油性マジックでマーキングする。
2. 各自の側頭部より **毛根を含む頭髪** を 3~5 本採取する。  
他人の試料 (細胞、DNA など) が混入しないよう細心の注意を払う。沈黙。  
毛髪は 75%エタノールで拭いたはさみを使ってキムワイプの上で調達する。  
使用する毛髪をキムワイプに染み込ました 75%エタノールで洗浄する。  
なるべく整髪剤や染料を使用していない毛根部がある清潔な毛髪を使う。  
毛根部がしっかりと確認できるなら、眉毛などの頭髪以外の毛を使ってもよい。
3. 毛根側の毛髪を毛根部から約 5 mm の部分で切断しながら、Proteinase K 溶液入りのマイクロチューブに入れる。  
毛髪を滅菌済つま楊枝で反応溶液中に沈める。毛根部分が溶液に浸っていることを視認する。

4. マイクロチューブをスピンドウンし、黄色のチューブキャップでチューブのふたをロックしてから、55°Cのヒートブロック (図 3-1 左) で 1 時間インキュベートする。スピンドウンは図 3-2 の説明参照。

<<反応中に本実験の解説とピペットマン練習>>

5. マイクロチューブを 100°Cのヒートブロック (図 3-1 右) に移し、10 分間熱処理して、タンパク質分解酵素を失活させる。毛髪は完全溶解せずに残っているが、DNA は溶出している。
6. マイクロチューブをクラッシュアイスにさして冷却し、**DNA 溶液**として保存する。黄色のチューブキャップは元の場所に返却する。



図3-1 2種類のヒートブロック

チューブのふちやふたなどについている溶液を遠心機 (図 3-2) で 3 秒間遠心分離することでチューブの底に沈める (スピンドウン)。  
黄色のチューブキャップは外しておくこと。

#### ○ 1.5 ml チューブのスピンドウン (図 3-2)

1. 対角線上に同じ重量の同型チューブをセットし、ふたを閉める。
2. 少し強めにふたを閉めると回転が始まる。
3. 3 秒ほど遠心させ、ふたを持つ手をゆるめる。
4. **回転が完全に止まってから**ふたを開け、静かにチューブを取り出す。



図3-2 小型遠心機  
1.5 mlチューブ用

### 3-2-2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応

- ▶ ピペットマンは正しく使用する (<4-1. ピペットマンの使い方>参照)。
- ▶ ピペットマン操作中は**沈黙**を保つ。すべてのピペット操作で、新しいチップに交換する。
- ▶ 試薬の入ったチューブを持つときはチューブのキャップ付近を持ち、チューブに入っている溶液を指で温めないように注意する。
- ▶ すべてのチューブは、反応をはじめるまで氷 (クーラーボックス) の中で保存 (図 3-3)。
- ▶ マイクロチューブやチップ類は使い捨てとし、使用済みの消耗品はポリビーカーに一時保管。使用済みの消耗品を実験台などに放置しない。

#### 配布試薬 (クーラーボックス内)

- ✚ Primer 反应用チューブ (0.2 ml)、3 種、人数分  
Forward○に加えて、Normal●、Mutant●、Mismatch●の各 Primer が入っている
- ✚ PCR 試薬 (2X GoTaq Green Master Mix・専用チューブ) 1 本



図3-3 クラッシュアイス

1. クーラーボックス内にある 3 種類の PCR 用 0.2 ml マイクロチューブ各 1 本に油性マジックで自分の 3 種が識別できる印を付け、クーラーボックスに戻す。

マーキングにはマジックを使い、ラベルを使用しないこと。チューブは常に氷冷状態に保つ。  
以下の 2 と 3 の操作で、試薬を加える順番を変えない。氷中で操作。

2. ピペットマン (P-20) を使用して、氷冷した 15  $\mu$ l の DNA 溶液を 3 本の PCR 用チューブにそれぞれ加え (表 3-1)、スピンドウンする。

表 3-1 PCR 実験に使う試薬

説明	試薬	終濃度	Normal	Mutant	Mismatch
	Forward primer 4 $\mu$ M○	0.4 $\mu$ M	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
	Reverse primer 4 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	Normal 5 $\mu$ l●	Mutant 5 $\mu$ l●	Mismatch 5 $\mu$ l●
2.	DNA solution		15 $\mu$ l	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l
3.	2X GoTaq PCR 試薬	1X	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
	Total		50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

Forward primer○; Reverse primer と組み合わせて使う

Reverse primer (3 種)

Normal primer●; *ALDH2-1* (正常型) に相補的な Primer

Mutant primer●; *ALDH2-2* (変異型) に相補的な Primer

Mismatch primer●; 制限酵素 *MboII* の切断部位をデザインした Primer

3. ピペットマン (P-200) を使用して、PCR 試薬 (GoTaq Green Master Mix) を 25  $\mu$ l を 3 本の PCR 用チューブにそれぞれ加え、指ではじいて軽く攪拌し、スピンドウンする。

GoTaq 溶液は粘性が高いので注意深くはかる。

チューブのキャップがしっかり閉まっているか視認する。

#### ○ 0.2 ml チューブ (PCR チューブ) のスピンドウン (図 3-4)

1. 対角線上に同じ重量の同型チューブをセットし、ふたを閉める。
2. 少し強めにふたを閉めると回転が始まる。
3. 3 秒ほど遠心させ、ふたを持つ手をゆるめる。
4. 回転が完全に止まってからふたを開け、静かにチューブを取り出す。



図3-4 8連式 PCR チューブ用遠心機



4. PCR 用チューブを PCR 装置 (Thermal Cycler; 図 3-5) にセットし、PCR 反応を行う。

PCR 反応は 94°C、2 分間の後に、次の 3 段階を 30 サイクル行う。

- 94°C、30 sec (熱変性)
- 60°C、30 sec (アニーリング)
- 72°C、20 sec (伸長反応)

PCR 用チューブをキムワイプでぬぐい、キャップが完全に閉まっていることを再度確認してから PCR 装置 (4°C に設定) にセットする。セットした場所を控えておくこと(図 3-5 右)。



図3-5 PCR装置とそのヒートブロック部分

PCR 反応は全員の試料がそろってから開始する。

残った DNA 溶液 (髪の毛の入り溶液) のチューブはフタを開けてバイオハザードゴミ袋に廃棄。

(約 90 分の PCR 反応終了後、チューブは 96 穴チューブラックに移し、冷凍庫保管 : 教官)

(「第 1 日」 終わり)

3 種類の PCR 反応産物は 4°C に設定した PCR 装置に置いてある。各自のサンプルをクラッシュアイスに入れた 96 穴チューブラックに移し、実験開始まで冷却保管しておく。

### 3-2-3 PCR 反応産物の検出 (実験日が週 2 日の場合は省略)

配布試薬 (教官使用のクーラーボックス内)

- ✚ DNA 染色試薬 GelStar (遮光・専用チューブ) 1 本 白い円柱ボックス内
- ✚ DNA 分子量マーカー 50-bp ladder (専用チューブ) 1 本

1. 3 種類の PCR 反応産物各 10  $\mu$ l と DNA 分子量マーカー 10  $\mu$ l をピペットマン (P-20) でアガロースゲルのウェルに注入する。

注入する前に、必ず指ではじいて転倒攪拌し、スピンドウンする。

アガロースゲル電気泳動法の詳細は <4-2. アガロースゲル電気泳動> 参照。

GelStar 染色試薬 (2  $\mu$ l) を含む 28 ml の 1.5% (w/v) アガロースゲルをグループごとに作成。

DNA 分子量マーカーの 50-bp ladder は 50, 100, 150, 200, 250-bp 等の DNA 断片を含む。

bp = base pair

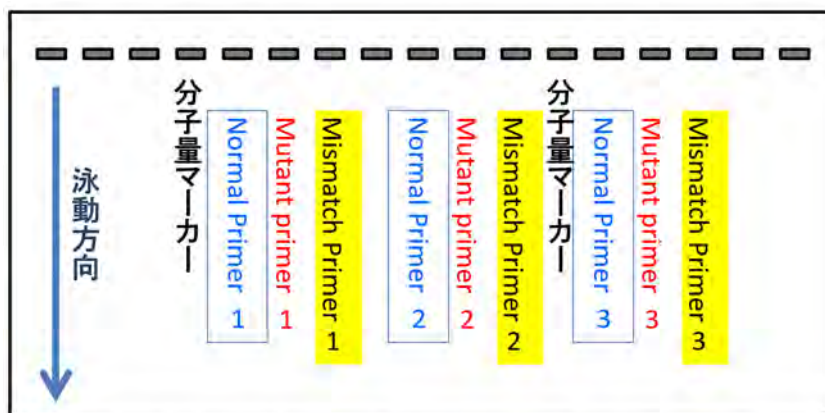


図3-6 アガロースゲル電気泳動 サンプルアプライの例

DNA 分子量マーカーは、2 人グループの場合は中央に 1 レーン、3 人グループの場合は 2 レーンに 10  $\mu$ l 注入する (図 3-6 参照)。トラブル防止のため、左右非対称が望ましい。

アガロースゲル電気泳動装置の電源周辺を濡らさないように。

2. 100V でアガロースゲル電気泳動を行い、紫外線を照射してアガロースゲルを撮影する。

GoTaqに含まれる黄色い色素がゲルトレイ先頭の泳動指標線（茶色線）に達するまで泳動（図 3-7）。

撮影済のアガロースゲルは、流しの三角コーナーにあるゴミ箱に捨てる。

泳動用緩衝液 (1X TAE Buffer) は再利用できるので、使用後は泳動装置を洗浄しなくてよい。

残った PCR 反応産物 (Normal) と PCR 反応産物 (Mutant) は翌日も使用するため、グループごとに紙製チューブボックス (丸いシールで色分け) で冷凍庫保管する。



図3-7 アガロース源電気泳動 泳動終点近く

DNA 分子量マーカーのレーンと PCR 反応産物 (Normal)、PCR 反応産物 (Mutant) のレーンから目的の増幅断片を推定し、両者のバンドの濃淡から遺伝子型を推定する (2-2-4、3-2-8、5-1-9 参照)。PCR 反応産物 (Mismatch) の推定増幅断片はどの遺伝子型の人でも現れる。

### 3-2-4 DNA 断片 (PCR 反応産物 [Mismatch]) の精製

#### 配布試薬

- ✦ Membrane Binding Solution (● 1.5 ml チューブ) 1本 紙製チューブ立て
- ✦ Nuclease-Free 滅菌水 (● 1.5 ml チューブ) 1本 紙製チューブ立て
- ✦ Membrane Wash Solution (50 ml チューブ) 1本 紙製のコロコロラック

1. Mismatch primer を使って増幅した PCR 反応産物 (Mismatch) を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製し (室温で操作)、冷凍庫で保管する (3-2-3 の残り試料と一緒に)。

<実験日が週 2 日の場合は、すぐに制限酵素反応に使うため、氷冷しておく。>

PCR 反応産物の精製方法は <4-3. PCR 増幅断片の精製> 参照。

(実験日が週 3 日の場合の「第 2 日」終わり)

### 3-2-5 制限酵素による DNA 断片 (PCR 反応産物) の切断

#### 配布試薬 (各グループのクーラーボックス内)

- ✦ 制限酵素用 10X Buffer (● 1.5 ml チューブ) 1本
- ✦ 制限酵素 *Mbo*II (● 1.5 ml チューブ) 1本
- ✦ 10X Gel-loading Buffer (● 1.5 ml チューブ) 1本
- ✦ Nuclease-Free 滅菌水 (● 1.5 ml チューブ) 3-2-4 を使用

1. ピペットマン (P-20) を使用して、2 本の 1.5 ml のマイクロチューブに、精製した PCR 反応産物 (Mismatch) 16  $\mu$ l と制限酵素用 10X Buffer ● 2  $\mu$ l をそれぞれ加える。最後に Nuclease-Free 滅菌水 ● または制限酵素 *Mbo*II ● をそれぞれ 2  $\mu$ l 加えて、指ではじいて軽く混ぜスピンドアウンする。試薬を加える順番を変えない。

制限酵素は不安定な酵素のため、常に氷の中に入れておく。試薬を体温で暖めない。

2. 2 本マイクロチューブを 37°C のヒートブロックに移し、30 分間インキュベートする。

<<この間にアガロースゲルを作成する>>

3. 酵素反応の終わった 2 本のマイクロチューブに 1/9 量以上の 10X Gel-loading Buffer ● を加え、ボルテックスミキサー (図 3-8) でよく攪拌し、スピンドアウンする。攪拌 - スピンドアウンは 2 回くり返す。この操作で制限酵素反応が止まる。



図3-8 ボルテックスミキサー

### 3-2-6 制限酵素反応による DNA 切断有無の検出

配布試薬 (教官使用のクーラーボックス内)

- ✚ DNA 染色試薬 GelStar (遮光・専用チューブ) 1本 白い円柱ボックス内
- ✚ DNA 分子量マーカー 50-bp ladder (専用チューブ) 1本

1. 前項の 3-2-5 で制限酵素反応した 2 本の PCR 反応産物(Mismatch)、3-2-2 の PCR 反応産物(Normal)と PCR 反応産物(Mutant)、および DNA 分子量マーカーをアガロースゲルのウェルに注入する (実験日が週 2 日の場合は精製する前の PCR 反応産物(Mismatch)も注入する)。注入する体積は以下に説明。

アガロースゲル電気泳動法の詳細は<4-2. アガロースゲル電気泳動>参照。

GelStar 染色試薬(2  $\mu$ l)を含む 28 ml の 2.0% (w/v)アガロースゲルを作成。

#### ○注入するレーンについて

アガロースゲルのウェルは 17 個ある。ほぼすべて使い切るように。ウェルに 1~17 の番号を振り、どのウェルに何を何  $\mu$ l 注入するかノートに書き、ノートを確認しながら注入すること。

#### ○注入する体積について

##### a: PCR 反応産物(Mismatch)の制限酵素反応産物

3-2-5 で調製した 2 本の試料はそれぞれ 20  $\mu$ l 超注入する (増幅断片の分子量の大小を確認するため、ウェルからあふれない程度に、できるだけ多く[濃くなる]注入する)。微小な泳動距離で遺伝子型を判定するため、ゲルの中央付近に注入する。

<実験日が週 2 日の場合>上記に加えて、3-2-4 で精製する前に小分けした PCR 反応産物(Mismatch)を 10  $\mu$ l 注入する。

##### b: PCR 反応産物(Normal)と PCR 反応産物(Mutant)

<実験日が週 3 日の場合>PCR 反応産物(Normal)と PCR 反応産物(Mutant)も同時に泳動する。前日の泳動像を参考にして注入する量を判断する。遺伝子型をバンドの濃淡で判定するため、2 種で等量になるように注入。40  $\mu$ l 残っているはず。ゲルの厚みによるがウェルには 25  $\mu$ l まで入る。最少量は 5  $\mu$ l。ピペットマンで測れる最小量は 2  $\mu$ l。3 倍希釈以上する場合は、Nuclease-Free 滅菌水と 10X Gel-loading Buffer で 1X Gel-loading Buffer を作り、1X Gel-loading Buffer で希釈する。前日と異なる濃度の試料を注入するように(原液 10  $\mu$ l 以外)。2 人グループの場合、1 人あたり 6 ウェル残っているため、3 セットの濃度のサンプルを注入する。3 人グループの場合、1 人だけ 2 セット、残り 2 人は 1 セット。

<実験日が週 2 日の場合>3 人グループの場合、PCR 反応産物(Normal)と PCR 反応産物(Mutant)をそれぞれ 10  $\mu$ l 注入する。2 人グループの場合、10  $\mu$ l の他に 5  $\mu$ l ずつの 2 セット注入する。

##### c: DNA 分子量マーカー

DNA 分子量マーカーは、2 人グループの場合は中央に 1 レーン、3 人グループの場合は 2 レーンに 10  $\mu$ l 注入する。

2. 100 V でアガロースゲル電気泳動を行い、紫外線を照射してアガロースゲルを撮影する。

(実験日が週 2 日の場合は、「3-2-3 PCR 反応産物の検出」の項も参考に)

- 撮影済のアガロースゲルは、メイン流しの三角コーナーゴミ箱に捨てる (有害固形扱い)。
- 使用後の泳動装置は洗浄しなくてよい(故障の原因になる。防塵して窓側に)。
- 保存溶液以外の使用済みチューブなどは、バイオハザード用ゴミ袋に捨てる。

### 3-2-7 エタノールパッチテスト

用意された資材を使って、各自工夫して実験する。対照実験（イオン交換水を使用）を必ず含める。

ガーゼ付き絆創膏を使う場合、エタノールが絆創膏の隙間から蒸発しやすいため、エタノール保持に工夫を要する（試験している腕を屈伸させないなど）。撮影するとき、時間（0、5、12分）、対照実験とエタノール実験の区別がわかるように工夫すること。

1. 2枚のガーゼ付き絆創膏を上腕内側（なるべく白いところ）に貼り、ガーゼが皮膚に触れる部分がわかるように写真撮影（片側のみ貼り付け、めくった状態で撮影するとガーゼ部分が触れる予定の場所が撮影できる）。
2. 2枚のガーゼ部分にイオン交換水と75%エタノールをそれぞれ染み込ませ、皮膚に貼り付ける。
3. 5分後に絆創膏を半分はがし（片側は貼り付けたまま）、はがした直後の皮膚の色を観察し、絆創膏を半分剥がした状態で写真撮影。
4. 3.の状態ですらに7分間、ガーゼをはがした部分の皮膚の色を観察し、ガーゼが皮膚に触れた部分がわかるように（片側は貼り付けたまま）写真撮影。

推定の目安（必ず対照実験と比較。この試験だけで正確な判定ができるわけではないことに注意）

- |                    |   |                   |   |                |
|--------------------|---|-------------------|---|----------------|
| 3. の5分後に皮膚が赤くなっている | → | $ALDH2-2/ALDH2-2$ | = | 変異型ホモ接合体       |
| 4. のさらに7分後に皮膚が赤くなる | → | $ALDH2-1/ALDH2-2$ | = | 正常型と変異型のヘテロ接合体 |
| 最後まで皮膚の色に変化がない     | → | $ALDH2-1/ALDH2-1$ | = | 正常型ホモ接合体       |

自分の表現型、PCR法による遺伝子型の推定結果と異なるときは、**繰り返し試験**すること。

### 3-2-8 遺伝子型の推定

「2-2-4 本実験の戦略」を十分理解した上で、次のように  $ALDH2$  遺伝子の**遺伝子型**を推定する。

1. アガロースゲル電気泳動で得られたバンドのサイズをDNA分子量マーカーから推定し、自分の  $ALDH2$  遺伝子の**遺伝子型**を推定する。  
本来ならPCR増幅断片は1種類（1バンド）のはずだが、目的の断片以外に増幅される場合がある。  
DNA分子量マーカーから目的の増幅断片を推定し、そのバンドの濃淡などから  $ALDH2$  遺伝子の**遺伝子型**を推定する。

「**遺伝子型**」を推定するのであって、 $ALDH2$  遺伝子が正常型か変異型かだけを推定するのではない。表現型を判定するのでもない。

2. エタノールパッチテストの結果および自分の表現型と合わせて遺伝子型を総合的に推定する。  
**遺伝子型**や**表現型**については「2-5. 遺伝子の基礎知識」や「やさしいバイオテクノロジー カラー版」の「1-4 具体的な遺伝子の構造」に詳しく解説してある。

アガロースゲル電気泳動によるバンドの見え方と遺伝子型・表現型の対応がわからないなら、「2-2-4 【本実験の戦略】」の図2-4を参照。

レポートには「3-2-8 遺伝子型の推定」までを**結果**に書くこと。

**結果は実験を行った順に書くのではなく、意味のある項目毎に整理して書く。**

考察は結果とは別の項に改め、実験操作や実験結果などについて項目毎にまとめる。

## 第4章 機器類の使い方 (冊子体テキストより詳しい)

### 4-1. ピペットマンの使い方 (冊子体テキストより詳しい)

#### 4-1-1 解説

生化学実験では微量 ( $\mu\text{l}$  オーダー) の溶液を扱うため、デジタル式の容量可変型分注器を用いることが多い。この手の分注器は各社から市販されているが、広範に使われているギルソン社製の分注器の商標をとってピペットマンと呼称されることが多い (以下、ピペットマンと記載)。

ピペットマンは内部ピストンのサイズに応じて扱える容量が決まっており、目盛調節ネジを回すことで許容範囲内の液を正確に測り取ることができる。

目盛と実際に測り取られる液量がずれると使い物にならなくなるため、絶対にプッシュボタンや目盛調節ネジを許容範囲以上に回してはならない。



図 4-1 ピペットマンの目盛りと使用するチップ、ピペットマンの各部名称

ピペットマンには2タイプある。

左のタイプはプッシュボタンを直接回転させて希望の容量にあわせる。

右のタイプは本体上部の黒いダイヤル (目盛り調節ネジ) を回転させて希望の容量にあわせる。



図 4-2 2種類のピペットマン 目盛りの見方は同じ。



図 4-3 ピペッティングは親指で操作する

## 4-1-2 手順

利き手にピペットマンを持ち、もう一方の手にチューブを持って目の高さで操作する。  
実験台においたチューブでピペットマン操作しない。吸い上げた液や吐き出した液を必ず視認する。  
プッシュボタンを戻す操作を特に丁寧に。**プッシュボタンから親指を離さない。**

1. プッシュボタンまたは目盛調節ネジを左右に回して目盛を目的の容量に合わせる。  
指定範囲以上にプッシュボタンや目盛調節ネジを回さないこと。
2. ノズル先端にチップを付ける。  
隙間ができないようにチップラックのチップにしっかり付ける。チップを素手でさわらない。  
チップラックのふたは、すみやかに閉める。
3. 空気中でプッシュボタンを第1ストップの位置まで押し下げる。  
溶液中で押し下げるとチップの先に気泡ができてしまい、液を正確に吸い上げられない。
4. 3.の状態のまま、チップの先を吸引する溶液に浸す。  
深く差し込まない。特に粘性の強い溶液。チップの先端 3 mm ぐらいを**垂直**に。目の高さで。
5. **ゆっくりと**プッシュボタンを元の位置までスムーズに戻す。**親指を離さない！** 垂直、視認。  
完全に吸引し終わるのを待たため、プッシュボタンを戻し終えてからチップの先端を溶液につけたまま**数秒静止**する。  
勢いよく戻すと液をピペットマン本体に吸い込んでしまい正確に測れないだけでなく故障の原因になる。  
万一ピペットマン本体に溶液を吸い込んでしまった場合、分解・洗浄が必要なので、教官または TA に申し出る。そのまま使い続けられない。
6. チップの外側に付いた液を容器の縁でしごき落とすようにしてチップを液から出す。視認。  
微量の液を測り取るので、チップの外側に付いた液は大きな誤差要因になる。
7. 溶液を入れたいチューブの内壁にチップの先を付け、**ゆっくりと**プッシュボタンを第1ストップまで押し下げる。垂直、視認。  
PCR 実験では、同じ溶液を測り取る時も、保存溶液の汚染防止と経験を積むため、すべてのピペット操作でチップを交換する。PCR 実験では溶液をはき出すとき、チップの先端をチューブの内側壁面や溶液の界面につけてもかまわない。
8. 第1ストップの状態で押したまま**一呼吸おいて**液が流れ落ちなくなったら、プッシュボタンを第2ストップまで押し下げチップの先に残った液を押し出す。垂直、視認。  
GoTaq や Gel-loading Buffer など、粘性の強い溶液は特に念入りに。
9. **ゆっくりと**プッシュボタンを元の位置まで戻す。**親指を離さない！** 垂直、視認。  
1回の吐き出し操作で定量できるようになっている。プッシュボタンを何度も上下させない。  
チップを溶液につけていなくても、一度溶液を吐き出した後にピペット操作を繰り返すと、チップに残った微量の溶液がピペットマン本体（白いホルダー部分）に入ってしまう、故障と汚染の原因になる。
10. エジェクターボタンを押して使用済みチップをはずす。  
使用済みのチップやチューブは専用のポリビーカーに一時保管し、1日の実験の終わりにバイオハザード用ゴミ袋に捨てる。使用済みチップから汚染させないように！

[参考] 付属の取扱説明書

## 4-2. アガロースゲル電気泳動法 (冊子体テキストよりかなり詳しい)

### 4-2-1 解説

電気泳動の原理は SDS-PAGE の項に詳しく述べているので参照していただきたい。

核酸 (DNA および RNA) はタンパク質と比較すると分子量が大きいため、通常はアクリルアミドゲルよりも網目の粗いアガロースゲルが電気泳動に用いられる。アガロースの濃度は分離する核酸のサイズに応じて調整する必要がある。また、核酸はリン酸と糖が交互につながった主鎖を持っているため、中性緩衝液中では 1 塩基につき 1 個の割合で負電荷を持っている。

このため、SDS などに加えなくても核酸はゲル中を陽極に向かって移動し、概ね分子量に依存した移動距離を示す。しかしスーパーコイルなどの高次構造がある場合には移動距離が変化するので注意が必要である。

塩基数と濃度のわかっている DNA 断片 (DNA 分子量マーカー) と一緒に泳動することにより、試料 DNA の泳動距離と濃さから分子量 (塩基数) と濃度を見積もることができ、さらに、おおよその純度を見積もることができる。

泳動後、目的のバンドをアガロースゲルごと切り出すことで DNA を回収し、精製することもできる。

### 4-2-2 手順

#### 1) 試薬類 [解説]

##### 1. アガロース

アガロースは寒天中の一成分 (主成分) で寒天から分離精製して得られる。熱水で溶解し、温度を下げるとゲル化する。多糖鎖間で水素結合の網目状構造をとることから核酸などの高分子物質を分離するのによく使われる。精製度やゲル化したときの強度の違い、ゲル化温度の違いなどにより、さまざまなグレードのアガロースが市販されている。本実験では、分離する DNA 断片の分子量が最大で 137-bp と小さいことから、低電気浸透で低分子量の分離に適したアガロースを用いる。

表 4-1 アガロースの濃度と DNA 分離サイズ

アガロース濃度 (% [w/v])	分離できる直鎖 DNA のサイズ (kbp)
0.8	0.5-15
1.0	0.25-12
1.2	0.15-6
1.5	0.08-4

分離したい DNA のサイズと適切なアガロースの濃度は表 4-1 の通りである。

本実験ではアガロースゲル電気泳動を 2 度行う (実験日が週 3 日の場合)。

1 度目の PCR 産物の確認では、PCR 反応の有無を調べるため、1.5% (w/v) のアガロースゲルを作成する (実験日が週 2 日の場合は行わない)。

2 度目の制限酵素切断の有無を調べる実験では、137-bp と 125-bp のバンドの分離が必要なため、2% (w/v) のアガロースゲルを用いる。

室温保存。

## 2. 泳動用緩衝液

本実験では市販の 10X TAE buffer を 10 倍希釈した 10X TAE buffer を用いる。

「10X TAE Buffer (pH 8.3)、ナカライテスク、35430-61

400 mM Tris-acetate, 10 mM EDTA (pH 8.3)」

滅菌、室温保存。

他にも表 4-2 のような緩衝液がよく用いられる。

表 4-2 アガロースゲル電気泳動に使われる緩衝液

Buffer	Working solution	Stock solution / Liter
Tris-acetate (TAE)	1× : 40mM Tris-acetate 1mM EDTA	50× : 242g of Tris base 57.1ml of glacial acetic acid 100ml of 0.5M EDTA (pH 8.0)
Tris-borate (TBE)	0.5× : 45mM Tris-borate 1mM EDTA	5× : 54g of Tris base 27.5g of boric acid 20ml of 0.5M EDTA (pH 8.0)
Tris-phosphate (TPE)	1× : 90mM Tris-phosphate 2mM EDTA	10× : 108g of Tris base 15.5ml of 85% phosphoric acid (1.679g/ml) 40ml of 0.5M EDTA (pH 8.0)

## 3. Gel-loading Buffer

通常用いられる Gel-loading Buffer には表 4-3 のようなものがある。

表 4-3 アガロースゲル電気泳動に使われるローディング緩衝液

Buffer type	6×Buffer	Storage temperature
I	0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol FF 40% (w/v) sucrose in H <sub>2</sub> O	4°C
II	0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol FF 15% Ficoll (Type 400) in H <sub>2</sub> O	room temperature
III	0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol FF 30% glycerol in H <sub>2</sub> O	4°C
IV	0.25% bromophenol blue 40% (w/v) sucrose in H <sub>2</sub> O	4°C

PCR 反応で用いる GoTaq Green Master Mix には Gel-loading Buffer に相当する試薬が含まれているため、PCR 反応産物のアガロースゲル電気泳動では Gel-loading Buffer を添加する必要がある。

制限酵素反応用のサンプルは、DNA の水溶液となるように精製しているため、Gel-loading Buffer を加えなければならない。

本実験では、市販の 10X Gel-loading Buffer (1% SDS, 50% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue) を 10 倍希釈となるように添加し、十分に混和する。

室温保存。



#### 4. DNA 分子量マーカー

SDS-PAGE の場合と同様、アガロースゲル電気泳動でも試料の泳動距離と分子量の対数は部分的にはほぼ直線関係になる。電気泳動により分離された DNA 断片の分子量を推定するために、分子量既知の DNA 断片混合物を同時に泳動する。

さまざまな DNA 分子量マーカーが市販されている。

本実験では、130-bp 前後の DNA 断片を分離するため、50-bp ladder Marker を用いる。この分子量マーカー溶液には、50, 100, 150-bp など 50-bp 間隔の DNA 断片（最長断片は 800-bp）が含まれている。

Gel-loading Buffer を含むため、そのままアガロースゲルのウェルに注入できる。

冷凍保存。

#### 5. DNA 染色試薬

水溶液中の DNA は目に見えないため、染色する必要がある。

一般には DNA 染色液としてエチジウムブロマイドがよく用いられる。

エチジウムブロマイドは二本鎖 DNA の内側の塩基対を形成している水素結合を切り、挿入される。これをインターカレーションという。この状態で紫外線を当てると 590 nm の蛍光を発するので目に見えるようになる。

細胞内でエチジウムブロマイドが二本鎖 DNA にインターカレートすると、正常な DNA 複製や転写がうまくいかず、細胞機能を損ねる。そのことからエチジウムブロマイドには変異原性があると考えられており、取り扱いには十分に注意する必要がある。また廃液も適切に処理する必要がある。

本実験では、エチジウムブロマイドより発色感度の高い市販の GelStar Nucleic Acid Gel Stain（タカラバイオ、F0535；以下、GelStar）を用いる。

GelStar の最大励起波長は 492 nm で、蛍光波長は 527 nm である。

GelStar もエチジウムブロマイドと同様インターカレーターであるため、変異原性を持つ可能性があり、また、溶媒に DMSO が用いられていることから取り扱いには十分に気をつける必要がある。

GelStar は高感度に発色するため、アガロースゲルを作成するゲルトレイや TAE Buffer に含まれるゴミとも結合し、敏感に発色する。

冷凍・遮光保存（GelStar は FMC 社の登録商標です）。

本実験では、染色試薬を含むアガロースゲルで泳動しているが、染色試薬を含まないアガロースゲルで泳動し、泳動後、DNA を染色することもできる（先染めと後染め）。

GelStar やエチジウムブロマイドは紫外線照射下で DNA を確認するため、アガロースゲルから DNA 断片を回収するとき、DNA がダメージを受けることがある。

感度が悪いが、可視光下で DNA を確認できる青色色素も市販されている。

## 2) アガロースゲルの作製

使用済みの三角フラスコ、メスシリンダは、すみやかにイオン交換水を少なくとも5回通して洗浄し、75%エタノールを1回通して風乾させる。

ゲルメーカー、ゲルトレイ、コーム、タッパーなどは、使用后すみやかにイオン交換水で洗い、キムワイブで拭き取り所定の袋に入れて保管する。洗浄に洗剤、水道水は使わない。

1. ゲルメーカースタンドにゲルトレイとコームをセットする  
(図4-4)。後に遮光する必要があるため、アルミホイルで覆っておく。

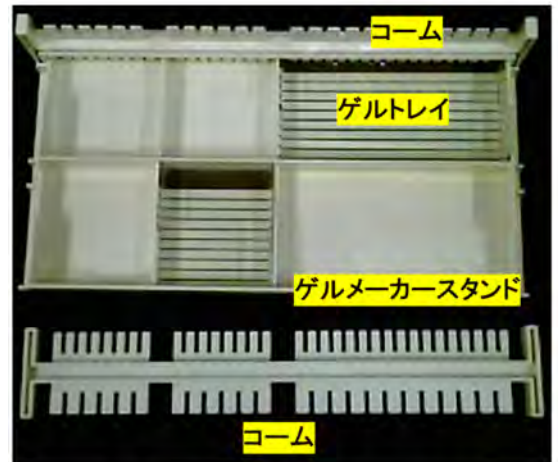


図4-4 アガロースゲル作製器具

コームはゲルトレイの茶色の太いラインの上にセットする。

コームのクシの数が多くの方(小歯側)を使う。

小歯=8と17ウェル

大歯=6と12ウェル

2. 三角フラスコに必要量のアガロースを直接測り取り (1.5%または2% w/v)、28 ml の 1X TAE Buffer を加える (メスシリンダ使用)。
3. サランラップで軽くふたをし、ラップをつま楊枝で数カ所穴を開けておく。電子レンジでアガロースを溶かす。

約 15 秒程度加熱してから取りだし、フラスコを注意深く振り混ぜ(アガロースの粒がフラスコの壁に付かないように)、約 5 秒間の加熱・軽い攪拌操作を繰り返し、アガロースを完全に溶かす (透明な粒が 1 粒も見えなくなるまで。突沸しかけたら加熱をすぐに止める)。やけどに注意。

4. 放冷 (70-60°C程度にまで) した後、DNA 染色試薬 GelStar Nucleic Acid Stein を 2  $\mu$ l 加え、泡立でないよう軽く均一に攪拌する。

素手の手のひらに三角フラスコの底をのせて、熱に耐えられる程度まで放冷 (やけどに注意! )。

温度が高すぎると (80°C以上)、ゲルメーカースタンドやゲルトレイが割れたり変形したりするので、温度が高すぎないように注意。また、GelStar も分解する。

GelStar 試薬はほぼ 100%の Dimethyl Sulfoxide 溶液のため、氷冷でも凝固している。溶かしてから使用する。

5. すみやかに、溶かしたアガロース溶液をゲルトレイ中に一気に流し入れる。

アガロース溶液を流し入れた後、コームを一度持ち上げ、溶液が均質に満たされているのを確認してから、静かにコームを差し込む。コームの周辺に気泡が生じることがある。

温度が低すぎると、ゲルトレイに注ぐ途中でゲルが固まってしまう、均質なゲルができない。

万一、均質なゲルができなかった場合は、固めたゲルを三角フラスコに回収し、再び電子レンジで融解 (短時間で溶ける) して、適温にまで放冷してから流し込む (GelStar を追加する必要はない)。

ゲルを流し終えた三角フラスコは、すみやかに洗浄する。100 ml 程度のイオン交換水を加え、電子レンジで沸騰させることで残ったアガロースを溶かしながら洗浄する。2回。その後、75%エタノールを1回通して風乾させる。

6. **水平な場所**で放冷してアガロースゲルを固まらせる。

GelStar 保護のためアルミホイルで遮光。季節やアガロース濃度によるが、15~20分で固まる。

### 3) アガロースゲル電気泳動

1. コームを注意深くはずし、使用するゲルをゲルトレイごとゲルメーカースタンドから取り出す。  
 コームは両手を使って真上に静かに引き抜く。ウェル（穴）を傷つけると泳動像が乱れる。  
 ゲルトレイも両サイドの突起部分を両手で持って静かに取り出す。  
 ゲルトレイの下に固まっているゲルをキムワイプで拭き取り、新しいキムワイプの上に置く。  
 コームとゲルメーカースタンドをすみやかに洗って保管する（注意事項参照）。
2. ウェルに試料および DNA 分子量マーカーをピペットマンで注入する（注入体積は「3-2. 方法」）。  
 ピペットマンチップでゲルをキズつけないよう慎重に。DNA 分子量マーカーは最後に注入。
3. ゲルトレイごと泳動槽にセットし、1X TAE Buffer をゲル全体が浸るまで**注意深く**泳動槽に注ぐ。

（研究室の実験ではアガロースゲルを泳動槽にセットし、泳動用緩衝液を満たしてから試料を注入する。本実習では失敗を最小限にするため、先に試料を注入している）

パワーサプライは、まだセットしない。必ず外しておく。

サンプルウェルが陰極側になるようにセットする。DNA は陽極側へ泳動する。

ウェルに注入した試料が舞い上がらないよう、ゲルの縁も完全に浸るまで注意深く 1X TAE Buffer を加える。ただし、泳動槽の指標線（泳動槽本体の内側にあるライン）を越えないように！

すでに泳動槽に 1X TAE Buffer が入っている場合は、試料を注入したゲル（ゲルトレイごと）を注意深く沈め、ゲルが 1X TAE Buffer に**完全に**浸っているか確認する（浸っていなければ 1X TAE Buffer を注意深く追加する）。

ゲルトレイの底と泳動槽との間に気泡が入ることがある（多くの場合）。気泡が生じた場合、ゲルトレイを 1X TAE Buffer 中で少し持ち上げ、気泡をスライドさせながら取り除く。その後ゲルトレイを押し込み、泳動槽と密着させる。



図4-5 アガロースゲル装置と名称

4. パワーサプライをセットし、100 V で泳動する。

パワーサプライをスライドさせてセットしてからカバーを閉じる。

Mupid-2 plus のカバーは、2 つの突起を泳動槽側の穴に差し込み、回転させるように閉じる。

Mupid-2 のカバーはスライドさせて閉じる。カバーを閉じると電源が入る仕組みになっている。

電極の設定を確認してから泳動を開始し、数分後、色素が正常に泳動されていることを確認。

泳動中、アルミホイルで遮光・防塵する。感電に注意。

5. 泳動が終わったら、ゲルをゲルトレイごと取り出し、イオン交換水を入れたタッパーに移し、軽くリンスする。
- 泳動の終わる目安は、GoTaq の黄色い色素が一番先端の茶色のラインにまで泳動されたときか、Gel-loading Buffer に含まれる青色色素 Bromophenol Blue が泳動範囲の中央（ゲルトレイ中央の指標線）を超えるまで泳動されたとき。早く止めすぎると、分離が悪くなる。
- 泳動槽のカバーを開けると電源が切れる仕組みになっている。Mupid-2 plus のカバーは、手前を持って回転させるように開く。無理にあけると緩衝液（1X TAE Buffer）がパワーサプライにかかり故障の原因となる。
- パワーサプライの電源を Off にし、パワーサプライのコンセントを抜き、パワーサプライを泳動槽本体からはずしておく。
6. トランスイルミネータ上で泳動像を確認し、デジカメやスマホのカメラなどで写真を撮る。
- i. ゲルのみ（ゲルメーカーは UV を遮断する）をトランスイルミネータにのせる。ゲルの下に気泡が入らないように（気泡が写真に写る）。泳動像は試料の注入口を上にし、下方向に泳動した形で置く（TLC とは上下が逆）。
  - ii. トランスイルミネータの UV 遮断カバーをかぶせた状態で White/302 nm スイッチを 302 nm に合わせ、Power スイッチを ON にして紫外線を照射する。
  - iii. 室内を暗くして泳動象をよく観察し、ii. の状態で写真撮影する。
- GelStar は UV 照射により退色するため、手際よく撮影！
- UV を裸眼で見ないように！ 失明する。

### <<画像データについて>>

1 枚のアガロースゲルに 2~3 名分のサンプルを泳動するので、自分のサンプルのみ撮影するか、画像データをトリミングすること（個人情報保護のため。他人のデータをレポートに入れない）。

制限酵素切断実験では、肉眼で切断の有無が確認しづらいので、かならず何らかの手段で画像データの目的部分を拡大し、**その場で遺伝子型の推定を行うこと！**

撮影済のアガロースゲルは、実験室メイン流しの三角ゴミ箱に捨てる（有害固形扱い）。

**泳動用緩衝液(1X TAE Buffer)は再利用できるので、泳動装置は洗浄しなくてよい。**

泳動層は防塵して邪魔にならないところに置いておく（窓側がよい）。

### [参考]

1. Sambrook, J. and Russell, D. W. : Molecular Cloning 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)
2. Mupid 取扱説明書
3. GelStar 取扱説明書

## 4-3. PCR 増幅断片の精製 (冊子体テキストより詳しい)

### 4-3-1 解説

制限酵素反応は反応溶液中の塩の種類や濃度に強く影響を受ける。GoTaq 試薬を用いて増幅した DNA 断片溶液はそのままでは制限酵素反応に用いることができないため、精製する必要がある。

本実験では、市販のキット (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System、Promega) を用いて PCR 増幅断片を精製する。精製することで、PCR 反応溶液に含まれている dNTP、Primer、Primer dimer、タンパク質、Mg イオン、色素、Buffer などが除かれ、DNA (概ね 100-bp 以上) の水溶液となる。

### 4-3-2 方法

基本的には、Promega 社のマニュアルにしたがって操作する。

Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System のマニュアル派のメーカーのサイトから入手できる。

Quick PROTOCOL (日本語版) (PDF ファイル)

高速遠心分離機は 1 度に 12 サンプル遠心できるので、効率よく使用する。

全体の人数が奇数の場合は、バランス用の器具を配布する (使用後返却)。

保存試薬の汚染防止のため、1 回のピペットマン操作ごとにチップを交換する。

**遠心分離器は高速で回転するため、試料を正確に測り取り、厳密にバランスをとる。室温で操作する。**

#### 配布試薬

- ✚ Membrane Binding Solution (● 1.5 ml チューブ) 1 本 紙製チューブ立て
- ✚ Nuclease-Free 滅菌水 (● 1.5 ml チューブ) 1 本 紙製チューブ立て
- ✚ Membrane Wash Solution (50 ml チューブ) 1 本 紙製のコロコロラック

1. SV Minicolumn と Collection Tube を各 1 本用意し、Collection Tube の中に SV Minicolumn をセットし、紙製チューブ立てにたてる (この状態で配布、図 4-6)。

SV Minicolumn にはふたがないため、実験中、キムワイプなどで防塵する。

2. ピペットマン (P-200) を使って、滅菌した 1.5 ml チューブに Mismatch primer で増幅した PCR 反応溶液を慎重に 40  $\mu$ l とり、Membrane Binding Solution ● を 40  $\mu$ l 加え、十分に攪拌しスピンドウンする。



図4-6 SV Minicolumn とCollection Tube

遠心分離器のバランスを合わせるため、2 人一組で同じ操作をすること。

PCR 反応溶液は 50  $\mu$ l で、アガロースゲル電気泳動に 10  $\mu$ l 使用しているため、40  $\mu$ l 残っているはず。もし 40  $\mu$ l より少ないのなら、Nuclease-Free 滅菌水 ● でトータル 40  $\mu$ l となるように調整し、Membrane Binding Solution を 40  $\mu$ l 加える。遠心分離器のバランスを合わせるため、厳密に測り取る。

<実験日が週 2 日の場合> 精製操作の後にアガロースゲル電気泳動を行うため、アガロースゲル電気泳動用 (精製前の試料) として 10  $\mu$ l の PCR 反応溶液 (Mismatch) を残しておくこと。

3. Membrane Binding Solution を加えた PCR 反応溶液を SV Minicolumn の中にピペットマン (P-200) で移し、1 分間放置する (DNA を膜に吸着させる操作)。

SV Minicolumn の白い膜を傷つけないように。

4. エッペンドルフ社製の高速遠心機（写真）を使って、8,000 rpm で60秒間遠心分離する。

対角線上に同重量のチューブをセットし、**内蓋を確実に閉め**、高速遠心機本体のふたを静かに閉める。

**ふたの開閉は丁寧に。**



▼▲ボタンで回転数と時間をセットし、START/STOP ボタンを押すと遠心が始まる。

遠心が終わると自動的に本体のふたが開く。

内蓋をとり、試料を静かに取り出す。



5. Collection Tube に溶出した液を丁寧に捨て（2人で同じ操作をすること）、SV Minicolumn と Collection Tube を再びセットする。
6. SV Minicolumn の中に 700  $\mu$ l の Membrane Wash Solution をピペットマン（P-1000）で加え、8,000 rpm で60秒間遠心分離する。  
Membrane Wash Solution にはエタノールが約80%含まれている。ピペットマン操作は慎重に！  
溶液を吸引した後のピペットマンは垂直に保ち、寝かせない！  
計量ミスは高速遠心機の故障につながる。正確に測り取ること！
7. Collection Tube に溶出した液を捨て（確実に！不十分だと遠心分離のバランスが狂う）、SV Minicolumn と Collection Tube を再びセットする。
8. SV Minicolumn の中に 500  $\mu$ l の Membrane Wash Solution をピペットマン（P-1000）で加え、8,000 rpm で60秒間遠心分離する。
9. Collection Tube を捨て、SV Minicolumn を滅菌した新しい 1.5 ml のマイクロチューブにセットし、8,000 rpm で60秒間遠心分離する。  
チューブのふたは閉めなくてよいが、ふたが絡まないよう注意して、ふたを回転方向（左回り）に揃えてセットする。1回に2本か4本。高速遠心機の内蓋は確実に閉めること。  
白い膜に残った Membrane Wash Solution を除く操作。
10. SV Minicolumn を取り出し、キムワイプで覆って、しばらく（高速遠心機が空くまで数分間）風乾し、エタノールをとばす。  
Membrane Wash Solution にはエタノールが約80%含まれている。DNA はエタノールに不溶。
11. SV Minicolumn を滅菌した新しい 1.5 ml のマイクロチューブにセットする。
12. SV Minicolumn に Nuclease-Free 滅菌水●50  $\mu$ l を注意深く加え、1分間放置後、8,000 rpm で60秒間遠心分離する（膜に付着した DNA の溶出操作）。  
ピペットチップがカラムの膜に触れないように Nuclease-Free 滅菌水をカラムの中心部に直接加える。  
イオン交換水やアガロースゲル電気泳動用の滅菌水を使ってはならない。
13. 溶出した DNA 溶液（40  $\mu$ l 強）を冷凍庫（-20℃）で保管する（グループごとの紙製チューブボックス使用。丸いシールで色分けしてある。3-2-3 の残り試料と一緒に）。SV Minicolumn は捨てる。

＜実験日が週2日の場合＞すぐに制限酵素反応に使うため、氷冷しておく。

## 第5章 参考・課題 (冊子体テキストにない解説がかなりある)

### 5-1. 参考 (冊子体テキストにない解説がかなりある)

#### 5-1-1 【遺伝子と遺伝のしくみ】 (冊子体テキストにはない)

ヒトを含め、すべての生物の体は細胞からできている。生物は細胞核を持つ真核生物と細胞核を持たない原核生物に大別できる。ヒトの細胞は核を持つため、ヒトは真核生物の一種である。

ヒトの体細胞の細胞核には 23 対 46 本の染色体がある (第 1~第 22 染色体までの常染色体と 1 組の性染色体。2n)。1 本の染色体には 1 分子の DNA と多種・多数のヒストンタンパク質が含まれている。DNA は 4 種のヌクレオチド (アデニン、グアニン、シトシン、チミン) の重合体である。第 1~第 22 染色体と X および Y 染色体の遺伝情報 (塩基配列) 全体がヒトゲノムであり、約 30 億塩基対の遺伝情報を含む。

対になっている染色体の 1 本は母親から 1 本は父親から受け継いでいる。ヒトゲノムには 2 万数千の遺伝子があり、いずれの遺伝子も (男の性染色体を除く) 対になって細胞核に存在する (遺伝子のコピー数多型の場合を除く)。遺伝子は、大ざっぱに言って、DNA 中の転写される領域のこと (いろいろな定義がある)。

2n の生殖細胞の前駆体から減数分裂によって n の配偶子が生じる。減数分裂により、対になっている染色体のうちいずれかが受け継がれる (相同染色体間で交叉しながら)。したがって、対になっていた遺伝子は配偶子ではそのうちいずれか 1 つの遺伝子になる (遺伝子のコピー数多型を除く)。

配偶子同士の受精により、すべての遺伝子は再び対になり (ゲノムも 2 セットになる)、新しい個体が誕生する。

DNA、遺伝子、ゲノム、染色体、減数分裂、交叉、遺伝子型、表現型などの基本用語は

「やさしいバイオテクノロジー カラー版」と「カラー図解でわかる高校生物超入門」に詳しく解説してある。

*ALDH2* 遺伝子には 2 種類の対立遺伝子がある (*ALDH2-1* [正常型] と *ALDH2-2* [変異型])。実際にはもっと多数あるが)。この 2 種類の対立遺伝子の組み合わせは 3 通りある。すなわち、遺伝子型が 3 通りある。それぞれの遺伝子型に対して、「お酒が飲める」、「お酒がたしなみ程度に飲める」、「お酒が全く飲めない」の 3 通りの表現型と対応している。

表 5-1 *ALDH2* の遺伝子型と諸性質

遺伝子型	表現型	日本人の分布	PCR 反応の鎖延長		<i>Mbo</i> I 切断	アルコールパッチテスト
			Normal	Mutant		
<i>ALDH2-1/ALDH2-1</i>	お酒が飲める	54%	○	×	○	変化なし
<i>ALDH2-1/ALDH2-2</i>	お酒がたしなみ程度に飲める	40%	○	○	○×	時間がたてば赤くなる
<i>ALDH2-2/ALDH2-2</i>	お酒が飲めない	6%	×	○	×	赤くなる

実は、ヒトのお酒に対する許容量と *ALDH2* タンパク質の機能との関係は、これまでに解説したほど単純ではなく、*ALDH2* 遺伝子以外にも飲酒許容量に関与する遺伝子があるため (たとえば Alcohol dehydrogenase 1B)、*ALDH2* 遺伝子のみで単純に飲酒許容量を説明できるわけではない。遺伝子型と表現型は、単純に対応しているように見えるが、ある遺伝子が特定の表現型を説明できる例は意外と少なく、多くの遺伝子は単純に表現型と対応しているわけではない。

### 5-1-2 【Human aldehyde dehydrogenase 2 mRNA の塩基配列と予想されるアミノ酸配列】

「やさしいバイオテクノロジー カラー版」p107 より。

3 大データベースに Accession No. = K03001 で登録されている（冊子体テキストにはない）。

mRNA の塩基配列の一部。intron 部分は含まれていない。

塩基配列（上段）は見やすいように 10 塩基毎にスペース挿入。実際には連続している（以下同様）。

下段はアミノ酸配列。1 文字表記。

**実際に働くタンパク質の翻訳領域付近のみの分解型遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列が示してある**

1	ctgccgagct	tggagaccot	ggacaatgac	aagccctatg	tcactctccta	cctggtggat	ttggacatgg	tootcaaatg	tctccggtat																					
1L	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	tatgcogcgt	gggctgataa	gtacacaggg	aaaacatcac	ccattgacgg	agaottotto	agctacaacac	gcoatgaacc	tgtggggctg																					
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	tgcggagcaga	tcattccotg	gaatttccog	ctcoctgctg	aagcatggaa	gotgggocca	goccttggcaa	ctggaaacgt	ggttggatg																					
61	C	G	Q	I	I	P	W	N	F	L	M	Q	A	W	K	L	G	P	A	L	A	T	G	N	V	V	V	M		
271	aagtagctgt	agcagacaco	cctcaaccog	ctctatgtgg	ccaacotgat	caaggagot	ggctttccoc	ctggtgtgt	caacattgt																					
91	K	V	A	E	O	T	P	L	T	A	L	Y	V	A	N	L	I	K	E	A	G	F	P	P	G	V	N	I	V	
361	cotggattg	ggcccagcgc	tggggccogc	atggctccoc	atggagatg	ggacaagtg	gocctcaogc	gctccactga	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	gtaatocagg	tgtctgtgag	gagcagcaac	ctcaagaaag	tgacctgga	gctggggc	cca	acatcatac	gtccagatg																					
151	V	I	Q	V	A	A	G	S	S	N	L	K	R	V	T	L	E	L	G	N	I	I	M	S	D	A				
541	gatattgatt	gggcccagga	acagggccac	ttgccctgtg	tcttcaacca	gggcagc	ccg	gctcccggac	cttctgcaag																					
181	D	M	D	W	A	V	E	Q	A	H	F	A	L	F	F	N	Q	G	G	S	R	T	F	V	Q					
631	gaggacatct	atgatgatt	tgtgtcgagg	agcgttccoc	ggcccaagtc	tgggtg	cct	ttgatgcaa	gaccagcag																					
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	ggccgcagag	tegatgaac	tcagttaag	aagatcctg	gotacatcaa	caggggg	ggg	cgagctgct	gttggctgg																					
241	G	P	Q	V	D	E	T	O	F	K	I	L	G	Y	I	N	T	G	A	K	L	L	C	G	G					
811	ggcattgctg	ctgaocgtg	ttaactcato	cagcccaactg	tatttgagaa	tgtcag	cca	tcgccaagga	ggagatotto																					
271	G	J	A	A	D	R	G	Y	F	I	Q	P	T	V	F	G	D	V	Q	I	A	K	E	E	I	F				
901	ggcccaagtc	gcagatoc	gaagtcaag	accatagagg	aggttattg	gagagoc	ogt	acgggtggc	gacagctgc																					
301	G	P	V	M	Q	I	L	K	F	K	T	I	E	E	V	V	G	R	A	Y	G	L	A	A	V					
991	ttcaaaaagg	atttggacaa	ggccaattac	ctgtcccaagc	oocctccagcc	ggccact	gct	atgatgct	gtttggagoc																					
331	F	T	K	D	L	D	K	A	N	Y	L	S	O	A	L	O	A	G	T	C	V	D	V	F	G	A				
1081	cagtcaccct	ttgctgcta	caagatgctg	ggagtgccgc	gggagttggg	cgagtac	cat	acactgaat	gaaaactgtc																					
361	Q	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	acagtcagag	tgctocagaa	gaactatcaa	gaatcatgca	agcttccctc	ctcagccatt	gatgaaaagt	toarcagat	cagcaacaaa																					
391	T	V	K	V	P	Q	K	N	S	*																				
1261	accagaaaaa	atgatccttg	cgtctgtaat	atctgaaaag	agaaattttt	octacaaaa	ctcttggttc	agaagaagtc	tagaatttga																					
1351	attgataaac	atggtgggtt	ggctgaggtg	aagagtatat	gaggaaacct	ttaaagcaca	acaatactgc	tagcttccag	gatgattttt																					
1441	aaaaaataga	ttcaaatgtg	ttatcctctc	ctgaaacgc	ttcctataac	tcagtttat	aggggaagaa	aaagctattg	tttacaatta																					
1531	tataccatt	aaggcaactg	ctaacacctg	ctttgtatc	tggcctaaga	ttcattaaaa	actgctgct	ctt																						

●の部分が分解型と不分解型の間で異なる部分

**正常型（分解型）遺伝子**

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

お酒が飲めるか飲めないかは、ここの塩基が1個違うだけである。これも「**1塩基多型**」の例である。この場合、たった1個のアミノ酸が変化するだけで、このタンパク質の機能が劇的に消失する

**変異型（不分解型）遺伝子**

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

### 5-1-3 【ALDH2の遺伝情報】（冊子体テキストとほぼ同じ）

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 AGATGTCCGG GAGTGGCCGG GAGTTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTGAAGTGA  
 121 AAAGTgtgag tgtggccc

ALDH-2-1 の exon12 付近を二本鎖で表すと、

```

5' caaattacag GGTCAACTGC TATGATGTGT TTGGAGCCCA GTCACCCTTT GGTGGCTACA AGATGTCCGG GAGTGGCCGG GAGTTGGGCG AGTACGGGCT GCAGGCATAC ACTGAAGTGA
3' gtctggtgag acactgaagt gaaaactgtc tttacattgg ctttggatgg tggcctaaga ttacataaaa actgctgct ctt
  
```

2) 変異型 ALDH2-2 遺伝子； ALDH2-1 の 114 塩基目の G が A に置換。他の塩基配列は ALDH2-1 と同じ。



5-1-4 【Primer の塩基配列とアニーリング】（冊子体テキストより詳しい）

Forward primer; 5' - CAAATTACAGGGTCAACTGCT -3' Tm=60.6°C  
 Reverse primer; 5' - CCAACTCACAGTTTCACTT -3' Tm=61.2°C  
 Normal primer; 5' - CCACACTCACAGTTTCACTT -3' Tm=60.6°C  
 Mutant primer; 5' - CCACACTCACAGTTTCACTT -3' Tm=60.6°C  
 Mismatch primer; 5' - GGCCACACTCACAGTTTCTT -3' Tm=65.5°C

Primer は1本鎖の合成DNAで相補鎖はない。

Mismatchすることを考慮してMismatch primer だけTm値が高めのPrimerを設計した。

4種のPCR primerが鋳型DNAに対してどのようにアニーリングするかを次の図で解説してある。

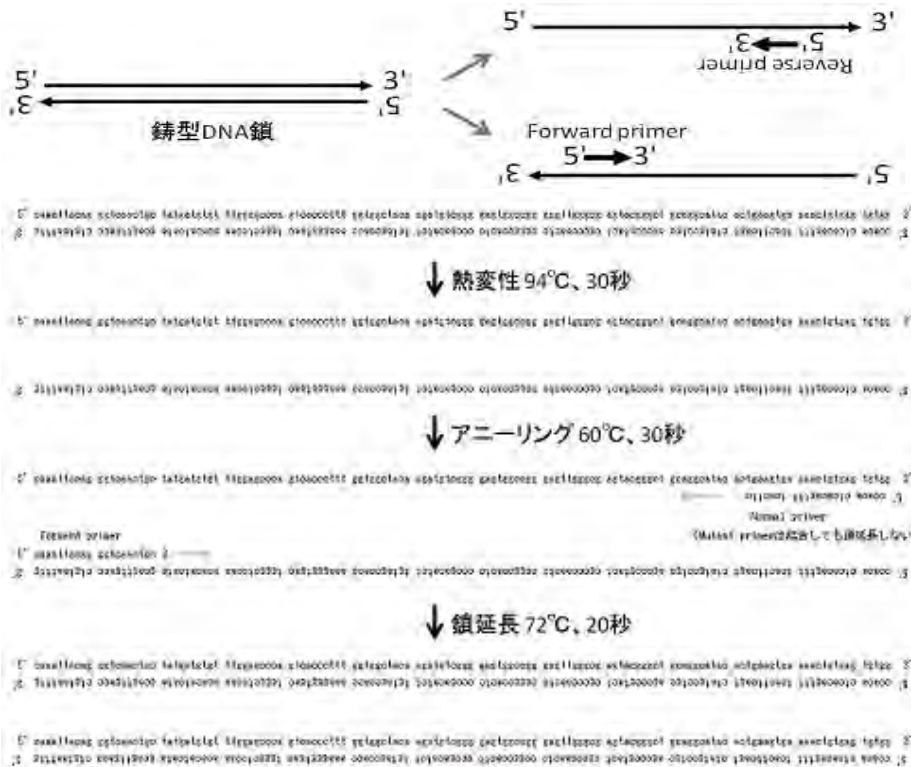


図5-1 ALDH2-1とNormal primer  
 ALDH2 gene, exon 12の正常型の塩基配列二本鎖構造における  
 Normal primerによる鎖延長

図 5-1 ALDH2-1とNormal primer



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  
 Mutant primerによる鎖延長

図 5-2 ALDH2-2とMutant primer



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

図 5-3 ALDH2-1とMismatch primer

## 5-1-5 【鋳型 DNA にアニーリングする各種下流側 Reverse primer のまとめ】

*ALDH2-1* 101 5' - GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'  
Normal primer 3' - cttcact tttgacactc acacc -5'

*ALDH2-2* 101 5' - GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'  
Mutant primer 3' - tttcact tttgacactc acacc -5'

*ALDH2-1* 101 5' - GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'  
*ALDH2-2* 101 5' - GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'  
Mismatch primer 3' - ttctct tttgacactc acaccg -5'

## 1) センス鎖とアンチセンス鎖

DNA は二重らせん構造をしており、二本の鎖は逆向きである。mRNA (一本鎖) と同じ方向の配列をセンス鎖、その相補鎖 (転写の時の鋳型になる鎖) をアンチセンス鎖とする。

Forward primer はセンス鎖と同じ方向であり、アンチセンス鎖とのみアニーリングし、センス鎖とはアニーリングしない。Forward primer は *ALDH2-1* と *ALDH2-2* の両方の遺伝子と完全にアニーリングする。

Reverse primer である Normal, Mutant Mismatch の各 Primer はアンチセンス鎖と同じ方向であり、センス鎖とのみアニーリングし、アンチセンス鎖とはアニーリングしない。

## 2) 完全なアニーリング → 鎖延長

Normal primer は *ALDH2-1* と Mutant primer は *ALDH2-2* と完全にアニーリングし、その後、伸長反応が起こる。

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

*ALDH2-2* 101 5' - GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'  
Mutant primer 3' - ← tttcact tttgacactc acacc -5'

## 3) 不完全なアニーリング → 鎖延長なし

*ALDH2-1* 遺伝子が鋳型の場合、Mutant primer は 60°C のアニーリング温度において、おそらくアニーリングする。しかし伸長反応の先端の塩基対 1 対が相補的でないため、伸長反応は起こらないと思われる。

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

同様に *ALDH2-2* 遺伝子が鋳型の場合、Normal primer がアニーリングするが伸長反応が起こらないと思われる。

*ALDH2-2* 101 5' - GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'  
Normal primer 3' - × cttcact tttgacactc acacc -5'

## 4) Mismatch primer

Mismatch primer は *ALDH2-1* と *ALDH2-2* の両方の遺伝子とアニーリングする。この場合、ゲノム DNA の塩基配列と 1 塩基異なるが、本実験のアニーリング温度は 60°C のため、Mismatch primer は両方の遺伝子とアニーリングすると思われる (なぜ Mismatch にしているかは「5-1-6 【制限酵素 *Mbo*II の認識配列と切断部位】」参照)。

*ALDH2-1* 101 5' - GCAGGCATAC ACTGAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'  
*ALDH2-2* 101 5' - GCAGGCATAC ACTAAAGTGA AACTGTGAG TGTGGCC -3'  
Mismatch primer 3' - ← ttctct tttgacactc acaccg -5'

このような Mismatch primer による Mismatch アニーリング はゲノム DNA が鋳型になった場合だけで、PCR 反応により新たに合成された DNA 鎖が鋳型になった場合は Mismatch primer は完全にアニーリングする (Mismatch アニーリング部位の塩基配列は Mismatch primer 配列に置き換わっている)。

### 5-1-6 【制限酵素 *Mbo*II の認識配列と切断部位】 (冊子体テキストより詳しい)

制限酵素は二本鎖 DNA のある特定の塩基配列を認識し、ある特定の二本鎖 DNA の部位を 1 カ所切断する酵素 (例外もある)。制限酵素は二量体の場合が多く、回文構造の認識配列をそれぞれのサブユニット酵素が 1 本の DNA を切断するものが多い。すべての制限酵素は細菌由来で、制限酵素の名前には由来細菌の学名の一部がつけられている。(属名の頭文字を大文字で書き、種名の最初の 2 文字、合計 3 文字をイタリック体で示す。その後菌株名を記すこともある。最後のローマ数字は同じ菌株から見つかった制限酵素の順番を表している。本実験に使用する *Mbo*II は *Moraxella bovis* 由来で、この細菌は *Mbo*I と *Mbo*II の二種類の制限酵素をつくる)

制限酵素は細菌が外来 DNA から守るための防衛機構の一つとして存在している。自身の DNA は制限酵素と同じ認識配列をもつメチル化酵素 (DNA メチラーゼ) により保護しているため、制限酵素は外来 DNA のみ切断し、自身の DNA は切断しない。このように、細菌では、DNA のメチル化は自身の DNA と外来の DNA を区別に使われ、外来の DNA から自身の DNA を守ることに役立っている。

多数の制限酵素が、さまざまな試薬メーカーから市販されている。しかし、市販の制限酵素の中に *ALDH2-1* と *ALDH2-2* の相違部分を含む塩基配列を認識する制限酵素がないため、本実験では、Mismatch primer により制限酵素認識配列を導入する方法をとっている。

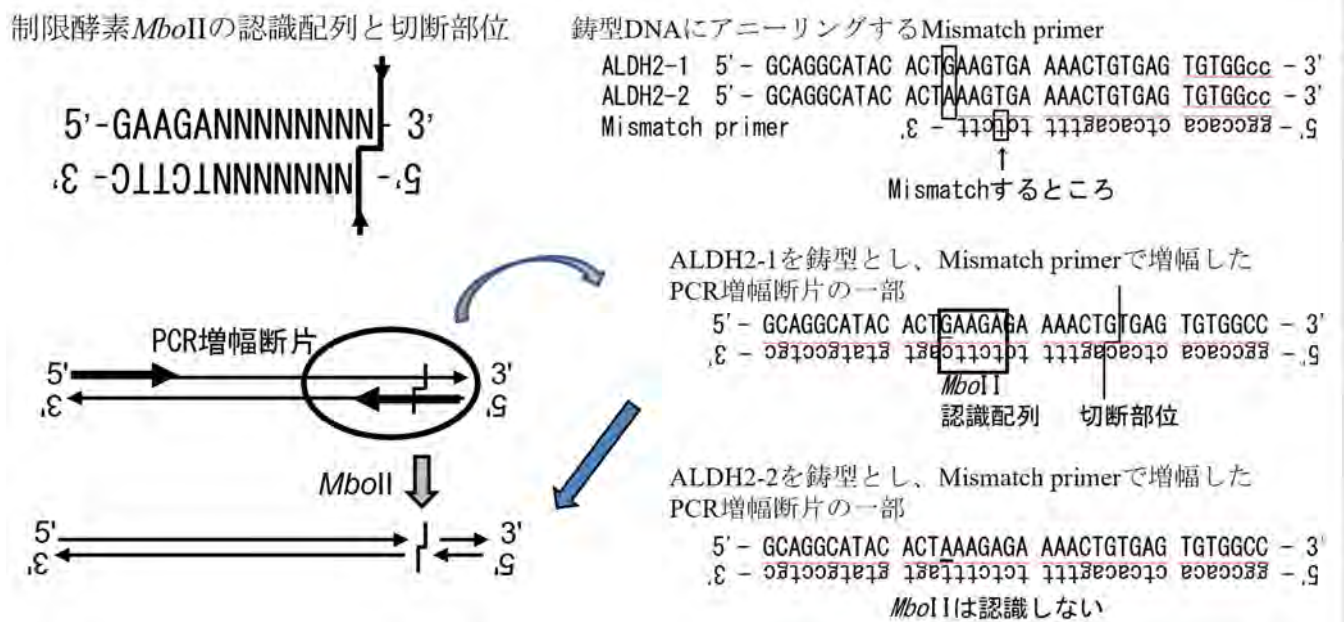


図 5-4 制限酵素 *Mbo*II の認識、切断サイトと制限酵素による PCR 増幅断片の切断様式

#### 【*Mbo*II メチラーゼについて】

本実験で使用する制限酵素 *Mbo*II は *Moraxella bovis* 由来で、二本鎖の 5' -GAAGA- 3' 配列を認識する。同じ *M. bovis* は Modification methylase *Mbo*II (Adenine-specific methyltransferase *Mbo*II、DNA メチラーゼ *Mbo*II) を合成している。この DNA メチラーゼ *Mbo*II は制限酵素 *Mbo*II と同じ二本鎖の 5' -GAAGA- 3' 配列を認識し、5 塩基目の A をメチル化する。

多くの制限酵素認識配列は回文構造になっているため、制限酵素の認識配列内に切断部位やメチル化部位があり、相補鎖も同じ位置にある。しかし、制限酵素 *Mbo*II の認識配列は回文構造ではないため、切断部位も認識配列にはなく、5' -GAAGA- 3' 配列からみて下流側にある。DNA メチラーゼ *Mbo*II のメチル化部位は 5' -GAAGA- 3' 配列の 5 塩基目の A だけが確認されており、相補鎖の C をメチル化するかどうかは確かめられていない。メチル化された配列 5' -GAAGmA- 3' を制限酵素 *Mbo*II は認識できないため、*M. bovis* のゲノムやプラスミドの DNA は DNA メチラーゼ *Mbo*II によるメチル化により保護されている。

#### 【参考】

1. <http://beta.uniprot.org/uniprot/P23192/>

### 5-1-7 【エタノールパッチテスト】（冊子体テキストと同等、置かれている場所が違う）

実際の飲酒の場合、摂取したエチルアルコールは主に肝臓において代謝され、最終的には二酸化炭素と水にまで分解されることから、肝臓で発現している関連酵素の有無が重要である。

エタノールパッチテストでは、皮膚の色の変化により、アセトアルデヒド分解の有無を判定している。皮膚の細胞においてアルコールの代謝に関連している遺伝子群の発現と肝臓のそれらとは異なるため、皮膚を使うエタノールパッチテストの結果が必ずしも肝臓におけるアルコール代謝の強弱を反映するとは限らない。したがって、エタノールパッチテストによりアルデヒド脱水素酵素 ALDH2 の遺伝子型が正確に判定できるとは限らない（参考にはなる）。遺伝子型が *ALDH2-1* と *ALDH2-2* のヘテロ接合体、あるいは *ALDH2-2* のホモ接合体が疑われる場合は、ドラッグストアなどで買える「アルコール体質試験パッチ」（ライフケア技研）などを併用してみるとよい（3枚入り）。「アルパッチ」、「ASK アルコール体質判定セット」などのキットも市販されている（高価；いずれもサンプルや資料が用意してある）。

ガーゼ付き絆創膏を使ってパッチテストを行う場合、エタノールが絆創膏の隙間から蒸発しやすいため、エタノール保持に工夫を要する。ガーゼ付き絆創膏のガーゼ部分に余計な薬剤が使われている場合はパッチテストに使えない。

### 5-1-8 【毛髪からの DNA 抽出について】（冊子体テキストとほぼ同じ）

毛髪や爪は皮膚の一種であって上皮細胞が角質化によって生じたものである。角質化にともない、正常な細胞形態は破壊され死滅しているが、核の中にあった DNA は比較的安定で、角質化組織の中の DNA は高分子状態のまま存在している。抜け落ちた頭髪や死体に付着した頭髪中の DNA は、他の組織の死滅した細胞内の DNA と比べて、比較的安定して存在している。

DNA は角質化した組織に残っているため、毛根部だけでなく、毛根より先端側数センチの毛幹部や爪にも DNA が含まれている（毛髪の先端部分は毛先部と呼ぶ）。角質化組織の主成分はケラチン等のタンパク質である。したがって、毛根部、毛幹部、爪などからタンパク質を分解することで DNA を抽出することができる。

本実験では Proteinase K によるタンパク質の部分分解のみで毛根部から DNA を抽出している。DNA 抽出効率を高めるためには、Proteinase K 溶液の中にタンパク質を変性させる尿素、SDS、DTT（ジチオスレイトール）などを加える。Proteinase K も酵素タンパク質であるため、タンパク質変性剤の存在下で機能しないように思えるが、Proteinase K は尿素、SDS、DTT などに対して耐性を示すため、組織のタンパク質分解酵素として Proteinase K がよく用いられる。

一般には、この DNA 抽出物に含まれるタンパク質等の不純物を除くため、**フェノール抽出法により除タンパク質**し、さらに、**エタノール沈殿法**により DNA は精製される。

フェノールは強力なタンパク質変性剤である。水溶液に弱アルカリ性の緩衝液（約 pH 8）で平衡化したフェノールを加えて攪拌した後遠心分離すると、水層（上層）とフェノール層（下層）に分かれる。中間層に見られる白い沈殿物が変性したタンパク質である。DNA はフェノールにより変性せず、水溶性のため、水層に溶けている。

この水層中 DNA 以外の成分を除き、DNA の水溶液として精製するために、あるいは濃縮するためにエタノール沈殿法が用いられる。DNA 溶液中に適切な塩の存在下で 2.5 倍量のエタノールを加えると DNA は凝集し、遠心分離によって沈殿として得ることができる。この沈殿物を 75%エタノールで洗って塩を除去し、エタノールをとばした後、Nuclease-Free 滅菌水などに溶かすことで精製 DNA を得ることができる。

#### [参考]

1. Sambrook, J. and Russell, D. W. : Molecular Cloning 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)

### 5-1-9 【アガロースゲル電気泳動像について】（冊子体テキストにはない）

PCR 反応により、理想的には 1 本のバンドが確認できるはずだが、実際には複数のバンドが確認できる。まず、DNA 分子量マーカーの位置を参考にして、目的の増幅断片を推定する。

この実験では Normal primer と Mutant primer を用いた増幅断片の有無と Mismatch primer を用いて増幅した PCR 断片の制限酵素による切断の有無の 2 種類の実験で ALDH2 の遺伝子型の推定を行っている。

ALDH2 は 2 種類あるため、遺伝子型は 3 種類ある。それぞれの遺伝子型と増幅断片や制限酵素切断には次のような関係がある。

図 2-4 も参考に。

#### 1) Normal primer または Mutant primer を用いた PCR 実験

PCR 反応により primer の 3' 末端がアニーリングした場合、135-bp の増幅断片が生じる。

ALDH2-1/ALDH2-1(NN) 遺伝子型：正常型ホモ接合体

Normal primer で増幅するが Mutant primer では増幅しない

ALDH2-1/ALDH2-2(NM) 遺伝子型：正常型と変異型のヘテロ接合体

Normal、Mutant 両方の Primer でそれぞれ増幅する

ALDH2-2/ALDH2-2(MM) 遺伝子型：変異型ホモ接合体

Normal primer では増幅しないが Mutant primer で増幅する

#### 2) Mismatch primer を用いて増幅した PCR 断片の制限酵素による切断実験

いずれの遺伝子型も PCR 反応により 137-bp の増幅断片が生じる。

ALDH2-1/ALDH2-1(NN) 遺伝子型：正常型ホモ接合体

両増幅断片に *Mbo*II 認識サイトがある。

*Mbo*II により 137-bp のバンドは消え、125-bp と 12-bp に切断される

実際には 12-bp バンドは薄いため確認できない。

ALDH2-1/ALDH2-2(NM) 遺伝子型：正常型と変異型のヘテロ接合体

増幅断片に *Mbo*II 認識サイトを含むものと含まないものが理想的には等量含まれる

*Mbo*II により 125-bp に切断される断片と切断されない断片が等量含まれる

ALDH2-2/ALDH2-2(MM) 遺伝子型：変異型ホモ接合体

両増幅断片に *Mbo*II 認識サイトがないため、*Mbo*II により切断されない

137-bp のまま変化なし

#### [参 考]

1. Nakamura, K. *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, **31**, 439-445 (1993)

## 5-2. 課題 (冊子体テキストより詳しい)

1. 肝臓で機能する酵素の遺伝子型が、なぜ、頭髮を用いて決定できるのか解説せよ。

ヒント：『カラー図解でわかる高校生物超入門』に同様の項目で詳しく解説してある

2. ヒトゲノムにおける *ALDH2* 遺伝子の位置を図解せよ。また、ヒト *ALDH2* の構造 (エキソンとイントロンの配置など) を調べ、遺伝子の全体像を図示し、実験に使用した Primer がアニーリングする位置を考察せよ。

ヒント：遺伝子の構造を問うている。タンパク質のアミノ酸配列、mRNA の塩基配列ではない。

「5-1-2」の塩基配列は翻訳領域の一部のみ。この塩基配列はエキソンの一部のみでイントロンは含まれていない。エキソン (exon) をエクソンともいう。

この PCR 実験では鋳型にゲノム DNA を使っているため、イントロンが含まれている。「5-1-3」に示した塩基配列は 12 番目のエキソンとその前後 10 塩基分のイントロンの配列である。これらの配列を考慮して、この遺伝子のどの部分に Primer がアニーリングするか、あるいは Primer がアニーリングする位置の意味を考察する。

塩基配列やアミノ酸配列等は日米欧の三大データベースで検索可能。

- 🚩 DDBJ: DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>)
- 🚩 NCBI: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- 🚩 EMBL: European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/>)

その他のデータベース

- *ALDH2-1* の全 mRNA 塩基配列は Accession No. **NM\_000690** に登録されており、すべての exon の配列が示される。intron を含む *ALDH2-1* 遺伝子の構造は「Entrez gene の GeneID:217」など。
- NCBI の Entrez Gene から「ALDH2」をキーワードに検索すると、最初にヒットする「ALDH2 aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)」に詳しい情報がリンクされている。また、Ensembl Human Gene View にも詳細な情報がリンクされている。
- H-InvDB の H-Invitational Database (<http://www.h-invitational.jp/>) も使いやすい。ヒトの遺伝子に膨大な注釈が加えてあり、他生物とのマルチプルアライメントなど使いやすいツール満載。「ALDH2」なら「H-Inv cluster ID: HIX0011002」。
- HUGO Gene Nomenclature Committee 「<http://www.genenames.org/>」も便利(「ALDH2」で検索)。

上記データベースなどから、ヒト以外の遺伝子構造の情報も簡単に得ることができる。

ヒトと他生物とのあいだで、総塩基数やエキソンの数を比べるとおもしろい。

3. PCR 法を応用した以下の実験技術について調べよ (PCR 法との関連部分を述べるように)。

- a. DNA シーケンス (サイクルシーケンス)

ヒント：『やさしいバイオテクノロジー カラー版』の「塩基配列を決定する方法 ジデオキシ法」参照。PCR 装置を塩基配列の決定にどのように利用しているかを考える。単なる塩基配列決定法を問うているわけではない。

さらに、今回の実験方法で増幅した PCR 断片の塩基配列が PCR 装置を使って決定できるかどうかも考える。できるのなら、どのような方法 (Primer など) があるか?

- b. 定量 PCR 法 (リアルタイム PCR 法など)

ヒント：「リアルタイム PCR 法」をキーワードに調べるとよい。リアルタイム PCR 法以外にもいくつか定量 PCR 法がある。リアルタイム PCR 法で用いられる蛍光試薬を調べ、なぜ定量できるのかを考える。また、何の定量に利用されているかを調べ、今回の実験方法で DNA の定量が可能かどうか、その意味があるかどうかも考える (新型コロナウイルスの PCR 検査でも採用されている)。



## EX4-2 「PCR 法による遺伝子型の解析」の実験ができない場合

実験方法をよく読み、実験をシミュレートする。

アルコールパッチテストは普通の消毒用アルコールで可能なため、  
(イオン交換水の代わりは水道水で良い)

自宅でくり返し実施し、3枚の写真をレポートに含める。

12月8日の前半にEX4-1の電気泳動像の写真撮影があります。

その時、同グループのすべての人の結果が見られますので、

自分の表現型やアルコールパッチテストの結果から、

どのタイプの結果になるか推定し、

ここまで(つまり推定した遺伝子型)を結果にまとめ、

別項で詳細な考察を書くように。

デスクワーク時の追加課題に変更はありません。

原理や目的等を理解し、良いレポートに仕上げてください。