

ISOHAIR Jr.

Manual

Ver. 2.0

NIPPON GENE CO., LTD.

I DNAの抽出	5
1. DNA抽出の概要	
2. 爪または毛髪を使ったDNA抽出	
2-1 爪, 毛髪について	
2-2 ISOHAIRを用いたDNA抽出	
II PCR	11
1. PCRの原理	
2. ISOHAIRで抽出したDNAを用いたPCR	
2-1 準備するもの	
III アガロースゲル電気泳動	15
1. アガロースゲル電気泳動の原理	
2. 電気泳動	
2-1 準備するもの	
2-2 アガロースゲル(3%ゲル, 100 ml)の作製	
2-3 泳動サンプルの準備	
2-4 電気泳動	
2-5 電気泳動例	
Appendix	
[ISOHAIRを用いたデータ集]	19
1. ヒトの毛髪を用いた実験例	19
1) ミトコンドリアDNAの検出	
2) p53遺伝子の検出	
3) MCT118型検査	
4) T4 gene 32 proteinを用いたPCR阻害の緩和	
5) 毛髪から得られるDNA量	
6) 毛髪の部位とDNA量	
7) 脱毛後の時間経過とDNA量	
8) PCR条件	
2. ヒトの爪を用いた実験例	23
1) ミトコンドリアDNAの検出	
2) p53遺伝子の検出	
3. マウスの体毛を用いた実験例	25
1) ミトコンドリアDNAの検出	
2) p53遺伝子の検出	
4. マウスの爪を用いた実験例	26
1) ミトコンドリアDNA及びp53遺伝子の検出	
5. データ集で用いられたプライマーの塩基配列	27
6. 検出遺伝子について	28
[関連製品]	30

<本製品について>

ISOHAIR Jr.(アイソヘアー ジュニア)は、毛髪や爪からのDNA抽出用試薬「ISOHAIR」、PCR用試薬、アガロースゲル電気泳動用試薬のセットです。

毛髪や爪といった身近で入手が容易な試料を用いて、DNA抽出、PCR、アガロースゲル電気泳動といった遺伝子工学実験の基礎的手法の一連の作業を簡便な操作で短時間に行うことができます。

また、試料の提供者が下戸であるか否かを調べられるアルデヒドデヒドロゲナーゼ2遺伝子の増幅等、豊富な実験例もご紹介しており、学生実習などに最適です。

<本品の内容>

本製品は ISOHAIR、PCR 用試薬、アガロースゲル電気泳動用試薬のセットです。

ISOHAIR 及び、PCR 用試薬は、お客様のご希望に応じて小分けして納品されます。試薬の内容及び納品形態(分注量及び本数)については、製品添付の送付案内でご確認ください。

1) ISOHAIR [保存:-20°C]

Extraction Buffer

Enzyme Solution

Lysis Solution

Ethachinmate

3M Sodium Acetate

TE (pH 8.0)

2) PCR 用試薬 [保存:-20°C]

Gene *Taq* NT (5 units/ μ l)

10×Gene *Taq* Universal Buffer

dNTP Mixture (2.5 mM each)

ddWater (マニュアルでは以降、ddH₂O と記載)

*プライマーは含まれておりません。

3) 電気泳動用試薬

[A] [保存:室温]

Agarose 21 (低分子量核酸分子用アガロース)

50×TAE

EtBr Solution

Loading Buffer

[B] [保存:-20°C]

Marker 4

TE (pH 8.0)

本製品に以外に必要な試薬

PCR 用プライマー、エタノール、フェノール/クロホルム/イソアミルアルコール、d.d.H₂O

*Appendix (p. 27～) 実験例で使用した PCR 用プライマーの塩基配列をご紹介します。

本品は、グループごとに DNA 抽出、PCR、アガロースゲル電気泳動を行うよう構成されています。

アガロースゲル電気泳動は、市販のミュージック電気泳動槽を用いることを想定していますが、泳動槽の種類等によっては、試薬が不足するおそれがございます。不足が生じた場合には、別途ご購入ください。(試薬リストは p.30 参照)

<使用上の注意>

本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いわないで下さい。

本品のお取扱いは、マニュアル記載内容どおりに行ってください。マニュアル記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。

本品の仕様は、予告なく変更されることがありますので、ご了承ください。

I DNA の抽出

1. DNA 抽出の概要

細胞の核の中に存在する DNA を抽出するためには、細胞膜を破壊し、細胞を溶解して核内の DNA を溶出させ(ステップ 1)、溶解しているタンパク質を除去し(ステップ 2)、精製する(ステップ 3)という主に 3 つの操作が必要となる。操作方法は、それぞれの段階において、様々な方法がある。

ステップ1 細胞膜の破壊

細胞膜を破壊し、細胞を溶解して細胞内の DNA をバッファー中に溶出させる。

〈酵素による破壊〉

プロテナーゼ K

〈浸透圧破壊〉

高塩濃度

〈有機溶媒によるタンパク質の変性〉

フェノール/クロロホルム

ベンジルクロライド

〈界面活性剤によるタンパク質の変性〉

トリトン X-100

SDS

陽イオン界面活性剤

〈その他の試薬によるタンパク質の変性〉

尿素

ステップ2 DNA の分離

細胞溶解後、DNA 以外の物質(タンパク質や糖等)を除去する。

〈DNA を取り出す〉

エタノール沈殿

フェノール/クロロホルム

カラム法

〈DNA 以外のものを取り除く〉

除タンパク(プロテナーゼ K)等

エタノール沈殿

フェノール/クロロホルム

カラム法

ステップ3 DNA の精製

エタノール沈殿

バクテリア等の細胞には細胞膜の他、細胞壁も存在するため、さらに処理が必要である。細胞壁には多糖類が多く含まれており、DNA 抽出の障害となる。

細胞壁を破壊する方法としては、下記の方法がある。

酵素による破壊： セルラーゼ(植物組織)， ザイモリエース(酵母)

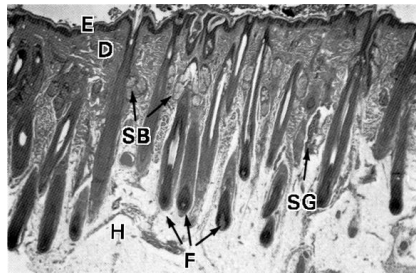
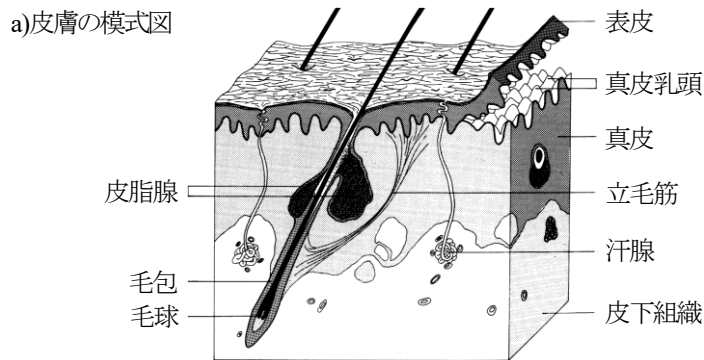
有機溶媒によるタンパク質の変性： フェノール/クロロホルム(全血、培養細胞)， ベンジルクロライド(植物組織、カビ)

2. 爪または毛髪を使った DNA 抽出

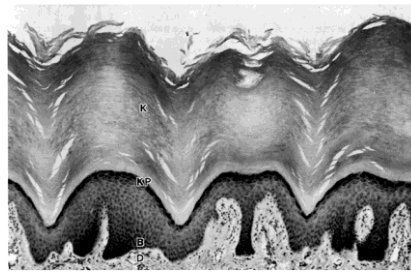
2-1 爪、毛髪について

爪や毛髪は、皮膚の一種で、角質化上皮が特異な形態をとったものである。角質化上皮とは、上皮細胞(いろいろな種類があるが、例えば皮膚の表面を覆っている細胞等)が表層に近づくにつれケラチンという繊維状硬タンパク質を生じ、細胞がケラチンにより完全に満たされ、核をはじめ全ての細胞小器官を失って乾燥、死滅し、角質片(鱗屑)になったものである。角質化上皮は強固な皮膜となって体液の漏出を防止したり、外界からの機械的刺激から体(内部)を守る役割を果たしている。毛は体温保持にも役立っている。

角質化により細胞は生命現象を営まないタンパク性物質(ケラチン)に変性してしまうが、DNA は非常に安定で、細胞が死滅してもかなり正常な状態で長期間残存している。法医学等の分野では、DNA が死滅した細胞内でも長期間非常に安定に保存されるという性質を利用して、白骨化したサンプルから DNA を抽出し、検査が行われている。



b)毛を有する皮膚(HE 染色×104)
E - 表皮 H - 皮下組織
D - 真皮 F - 毛包
SB - 皮脂腺 SG - 汗腺



c)指の先端の表皮(HE 染色×104)
K - 角質層(ケラチン) B - 基底層
KP - 顆粒層 D - 真皮

ケラチンが層になっている
角質化した皮膚では
核が消失している

核は黒っぽい点
となって見える

カラーアトラス組織学 P.R. Weaster 著 西村書店(198) p.120-123

2-2 ISOHAIR を用いた DNA 抽出

[1] 準備するもの

● 試料 (ヒト爪または毛髪)

できるだけ新鮮なもの (できれば実習直前に採取) を用意して下さい。

爪 : 先端を爪切りで切り取り、それをカッターで約 1 mm 角位に切ったものを 2 個(0.5 mg)程度用意して下さい。爪を切る前には、爪と指の隙間を良く洗い、垢やごみをできるだけ取り除いて下さい。

注意! マニキュアは予めリムーバーで除去して下さい。



爪切りで切った爪をカッターで 1 mm 角に切っているところ

毛髪 : 毛根部試料は抜去した毛髪の毛根から約 1 cm、毛幹部試料は毛根部試料の先 2~6 cm 用意して下さい。(上記は ISOHAIR を用いる際の最少量です。学生実習には毛根部を 3 つ使用して下さい。)

毛根がしっかりついている方が、DNA 抽出効率が良いため、毛根部をお勧めします。

注意! カラーリングやヘアマニキュアなどの処理を施してある毛髪は試料として適していません。

毛髪を試料とできない場合、毛根がしっかりしていれば、まゆ毛(数本)等を利用できます。

毛髪中の色素であるメラニン PCR 阻害物質であるため、髪質によって PCR の結果に差が生じやすい傾向があります。

毛髪の部位の名称
及び必要な長さ

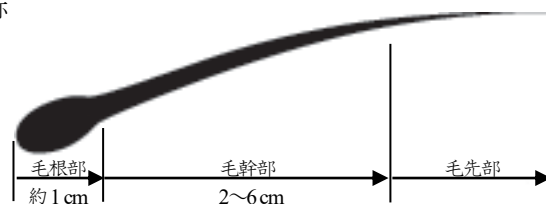


図 1 毛髪の部位の名称及び長さ

爪、毛髪の毛根部、毛髪の毛幹部を試料として、それぞれ[3]プロトコールに準じて DNA 抽出を行った場合、DNA の収量は毛髪の毛根部が最も多く、アガロースゲル電気泳動によりバンドが確認できる(Appendix I 1. 毛髪から得られるDNA量参照)。毛幹部や爪の場合、収量が少なく、バンドはほとんど目で確認できない。毛髪を用いる場合、カラーリングなどの影響やメラニンによる PCR の阻害を避けるため、できるだけ毛根の部分だけを使用するとよい。

● 試薬

ISOHAIR

Extraction Buffer

成分 Urea … タンパク質を分解する
Tris-HCl (pH 7.5)
SDS … タンパク質変性剤(DNA を可溶化する)
その他(塩など)

注意！ Extraction Buffer 中に白い結晶が生じることがありますが、品質には問題ありません。50℃程度の湯浴中で結晶を完全に溶解させ、濃度が均一になるよう攪拌してから使用してください

Lysis Solution

成分 DTT … 還元剤
その他

Enzyme Solution

成分 Proteinase K … タンパク質分解酵素
その他

3 M Sodium Acetate (pH 5.2)

Ethachinmate … エタノール沈殿(DNA 精製)の際に使用する共沈剤
TE (pH 8.0)

組成 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA

フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1 v/v) *
エタノール*

* は、ISOHAIR Jr.に含まれておりません。

● 器具

マイクロチューブ:1.5 ml 用
マイクロピペット及び滅菌済みチップ:~200 μ l 用、~20 μ l 用
インキュベーターまたはヒートブロック
卓上遠心機
真空乾燥器

[2] ISOHAIR を用いた DNA 抽出の原理

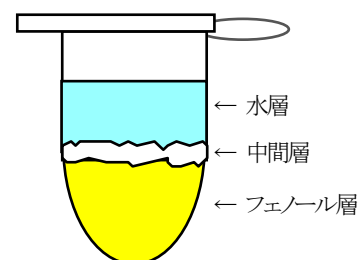
ステップ1 : タンパク質の分解

爪や毛髪等の主成分であるタンパク質”ケラチン”を Urea、SDS、Proteinase K 等により分解する。ケラチンは非常に溶けにくい物質であるが、ISOHAIR を使用することにより短時間で処理することができる。

最初に使用する Extraction Buffer 中の Urea、SDS により、サンプル中に含まれる DNase 等の夾雑タンパク質は変性、不活性化される。さらにこの Urea、SDS は Proteinase K の活性を上昇させる効果があるので、これによってケラチンの分解が促進される。このときの DNA は Urea の影響で水素結合がはずれ、一本鎖の状態になっていると思われる。

ステップ2 : 除タンパク

ステップ1で、爪や毛髪等の主成分であるタンパク質”ケラチン”が分解され、DNA がバッファー中に溶出された。次に強力なタンパク質変性剤であるフェノールと混和させることにより、除タンパクする。変性したタンパク質は遠心分離後、水層とフェノール層の間の中間層(白いもやもやした物質)として現れる。DNA は親水性物質として水層に溶けている。フェノール処理を行った後、しっかり遠心分離を行い、中間層を取り込まないように注意深く水層を取り出すことにより、DNA が含まれ、タンパク質が除去された溶液が得られる。なお、フェノールの pH が 7.8~8.0 になっていないと、DNA はフェノール層に溶け込んでしまい、回収できなくなるため、必ず平衡化したフェノール(TE 飽和フェノール等)を使用する。



ステップ3 : エタノール沈殿

エタノール沈殿により DNA を精製する。DNA 溶液に塩(3 M Sodium Acetate)の存在下でエタノールを加えると、DNA が凝集し、その後遠心分離することにより、沈殿として DNA が得られる。

エタノール沈殿の際、本マニュアルでは Ethachinmate(エタ沈メイト)を使用しているが、これは DNA のキャリアーとして働く。DNA と共沈するため、エタノール沈殿の際、DNA 回収のロスが少なくなる。Ethachinmate を使用すると、微量の DNA でも白い沈殿を目で確認できるため、エタノールを除去する際に誤って DNA を失うおそれは少ない。また、エタノール沈殿を行う際、通常は冷却(-20°C、1 時間)を行うが、Ethachinmate を加えると冷却操作を省けるため時間短縮できる。

[3]プロトコール

1. 試料(爪または毛根部)をエタノールで洗浄する。^{*1)}
↓
2. 試料をハサミ等で刻む(毛根部:3個程度、爪:1mm角)
↓
3. Extraction Buffer^{*2)} 200 μ lを加える
↓
4. Enzyme Solution 5 μ lを加える
↓
5. Lysis Solution 8 μ lを加える
↓
6. チューブを指でほじいて混合する(tapping)^{*3)}
↓
7. 55°C, 20分インキュベートする^{*4)}
反応時間中2~3分毎にtappingを行う
↓
8. Enzyme Solution 5 μ lを加える
↓
9. チューブをtappingして混合する
↓
10. 55°C, 5~10分インキュベートする^{*5)}
反応時間中2~3分毎にtappingを行う
↓
11. フェノール/クロロホルム/イソamilアルコール
(25:24:1) 200 μ lを加える
↓
12. 5分、穏やかに転倒混和する^{*3)}
↓
13. 11,000×g, 5分、室温で遠心する
↓
14. 水相を別のチューブに移す
↓
15. 3 M Sodium Acetate (pH 5.2) 20 μ lを加える
↓
16. Ethachinmate^{*6)} 2 μ lを加える
↓
17. チューブを指でほじいて混合する(tapping)
↓
18. エタノール 400 μ lを加える^{*7)}
↓
19. 11,000×g, 15分、室温で遠心する
↓
20. エタノールをマイクロピペットで除去する(沈殿)
↓
21. 70%エタノール 1 mlを加える
↓
22. 数回穏やかに転倒混和する
↓
23. 70%エタノールをマイクロピペットで除去する^{*8)}
↓
24. 5~10分真空乾燥する^{*9)}
↓
25. TE (pH 8.0) 20 μ lを加え、沈殿を溶解する(DNA溶液)^{*10)}

*1) 試料の量：毛髪の場合、毛根1cm または毛髪2~6cm
爪の場合、1mm角×2個(0.5mg)
ホリヤや整髪剤等がPCR反応を阻害することがあるため、エタノールを用いて以下の通り洗浄を行う。
① 1.5mlプラスチックチューブにエタノールを約1ml注ぐ。
② ①の中ピンセットを用いて細く切る前の爪または毛髪を入れる。
③ ②を数回転倒させる。
④ ピンセットで爪または毛髪を取り出し、ろ紙等の上に置き、エタノールをできるだけ除去する。

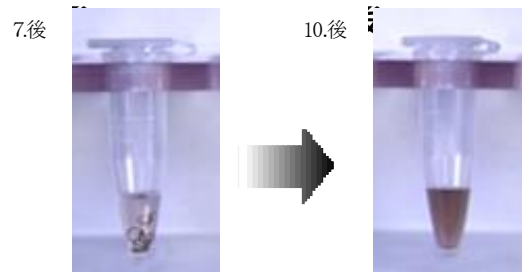
*2) Extraction Buffer中に白い結晶(SDS)が現れることがあるが、品質には問題ない。このような場合には、50°C程度の湯浴中で結晶を完全に溶解した後、内容物が均一になるよう攪拌してから使用してください。

*3) 哺乳動物細胞のDNAは分子量が非常に大きく、切断されやすいため、ボルテックス等の激しい操作を避ける。

*4) この操作より試料が溶解する。反応温度は37°Cあるいは室温でもよい。37°Cの場合、反応時間は55°Cの時の2~3倍、室温では3~5倍必要である。

*5) 爪は、見た目上ほとんど変化はみこられない(溶解していないように見える)が、DNAが溶出しているので、そのまま以後の操作を行う。

毛髪は、細く切断された状態で沈殿する。髪の質や量によって溶解時間が異なる。毛髪が完全に溶解されない場合には、10.の後さらにEnzyme Solution 5 μ lを加え、55°Cで5~10分インキュベートする(8.~10.を行う)ことにより、溶解が促進される。毛髪がどうしても溶け残ってしまう場合、完全溶解しなくてもDNAは溶出しているので、そのまま以後の操作を行う。



*6) エタノール沈殿の際、Ethachinmateを加えることにより、微量なDNAを効率よく回収することができ、-20°Cでの低温保存を省くことができる。

*7) 収量が少ない場合、ここで-20°C、30分の低温保存を行うことにより、収量があがることもある。

*8) DNA沈殿が浮き上がった場合は、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集めて、ゆっくりと70%エタノールを除去して沈殿を残す。

*9) 5~10分間の真空乾燥または風乾を行う。乾燥しすぎるとDNAが溶けなくなることもある。

*10) 毛根からDNAを抽出した場合、RNAが混入してくることがある。必要であれば、RNase処理を行い、RNAを除去する。

トラブルシューティング

ト ラ ブ ル

- 爪が溶けない。
 - ・爪は完全に溶けない。完全溶解しなくてもDNAが溶出しているため、そのまま以後の操作を行う。

 - 毛髪が溶けない。
 - ・プロトコール 10.の後、さらに Enzyme Solution を 5 μ l 加え、55°Cでインキュベートする。
 - ・毛髪が溶け残ってしまう場合、完全溶解しなくてもDNAが溶出しているため、そのまま以後の操作を行う。

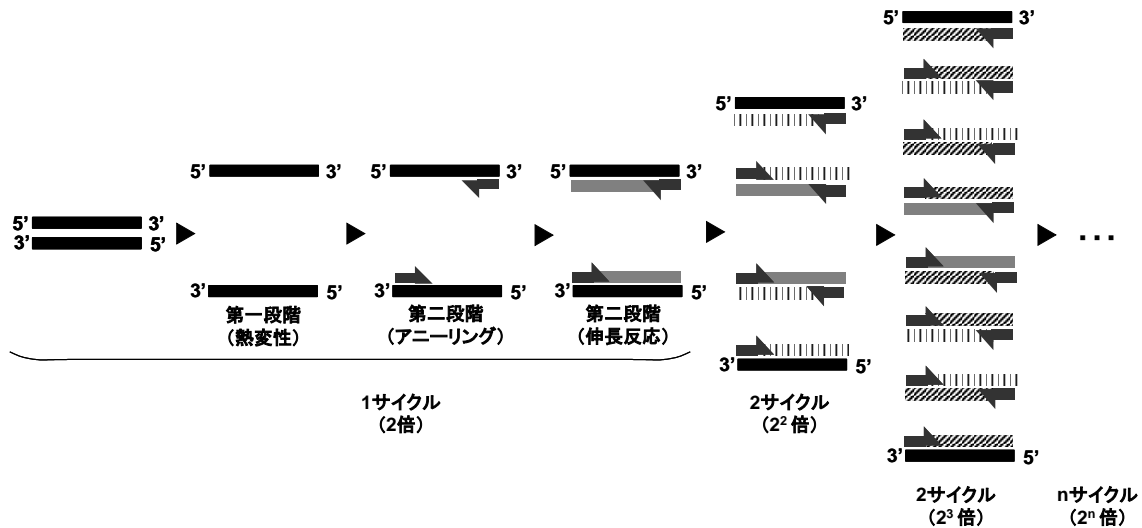
 - 得られたDNAを電気泳動したが、バンドが確認できない。
 - ・爪または毛髪から得られるDNA量は、個人の爪や髪の質によって差がある。また、同一人物でも例えば毛髪一本一本によって、あるいは1本の毛髪でも毛根部と毛幹部では差がある。
 - 毛髪、特に毛幹部からDNAを抽出する場合、得られたDNAが微量であるために、電気泳動を行ってもゲル上でバンドを確認できない場合があるので、そのままPCRのステップへ進めてください。

 - DNA溶液が着色している。
 - ・毛髪に含まれている色素メラニンが溶出していると思われる。メラニンはPCRを阻害しますが、この場合には、PCRを行う際に T4 gene 32 protein を添加すると、阻害が緩和されることがある。
 - (Appendix I 1.ヒトの毛髪を用いた実験例 T4 gene 32 protein を用いたPCR阻害の緩和 参照)
-

II PCR

1. PCRの原理

PCRとは、Polymerase Chain Reactionの略である。文字通りDNAポリメラーゼを用いて連鎖反応的にDNAを増幅する方法である。PCRの原理は、増幅しようとするDNAとその両端の配列に相補的な一対のDNAプライマー及び耐熱性DNAポリメラーゼを用いて、3段階の温度変化をnサイクル繰り返すことによって標的DNAを 2^n 倍に増幅するというものである。温度変化の第1段階(94~96°C)で標的二本鎖DNAを熱変性して一本鎖DNAにアニーリングさせ、第3段階(72~74°C)で伸長反応を進める。1サイクルで標的DNAは2倍になる。従って、理論的にはnサイクルの反応で標的DNAは 2^n 倍に増幅されるので、20サイクルでは約100万倍に増幅されることになる。実際には数百万倍まで増幅することができる。



[1] PCRに影響を与える因子

このようにPCRは非常に簡単にDNAを増幅できるが、さまざまな反応条件によって影響を受けるので、実験によっては反応条件の最適化を行った方がよい。Taq DNAポリメラーゼを用いたPCRに影響を与える因子について、以下に簡単に解説する。

[2] 酵素濃度

Taq DNAポリメラーゼは、通常1~2.5 units/100 μ l反応液で使用される。一般的に濃度が高すぎると非特異的産物が出現することがあり、逆に濃度が低すぎると増幅が不十分になる。

[3] dNTP濃度

dNTP濃度は、通常それぞれ20~200 μ Mである。各dNTPの濃度は同一でないと、過った取込みによるエラーが生じる原因になる。特異性と忠実度は、dNTP濃度が低い程高くなる。理論的には、100 μ l反応液で20 μ Mの各dNTPが存在すれば、2.6 μ gのDNAが合成できる。

[4] Mg²⁺濃度

通常総dNTP濃度より0.5~2.5 mM高い濃度が採用される。鋳型DNAやプライマーから持ち込まれるEDTAなどのキレート剤の濃度に注意する必要がある。

[5] プライマー

プライマーは、通常18~28ヌクレオチド長で、G+C含量が50~60%で、T_m値が55~80°Cとなるように設計する。プライマーの設計上のポイントは以下の通りである。

- ①両プライマーのT_m値が同程度であること。
- ②プライマーの3'末端側の塩基配列が正確であること。
- ③プライマーの3'末端どうしが相補的でないこと。

- ④G+C 含量があまり高くないこと(50~60%がよい)。特にプライマーの3'末端側にG+C リッチな領域がこないようにする。
 - ⑤プライマー自身がヘアピンのような高次構造をとらないこと。
- 2つのプライマーはそれぞれ0.1~0.5 μ M で使用する。

[6] 温度

変性温度は高い程特異性や増幅度が高くなるが、逆に *Taq* DNA ポリメラーゼの活性低下を早めるので、普通は94~96°Cで15~30秒間である。

プライマーのアニーリング温度は、 T_m 値より5°C程低い温度がよく、通常55~60°Cに設定する。アニーリング温度が高い程特異性は高くなる。0.2 μ M のプライマーは数秒間でアニーリングする。

伸長反応の温度は、72°Cが多く用いられる。合成速度は、他の反応条件にもよるが1秒間で35~100ヌクレオチドである。

[7] サイクル数

サイクル数は多い程増幅度は高くなるが、同時に非特異的産物が増加する。40サイクルをこえないように設定する。理論的には指数関数的に増幅するが、実際にはプラトーになる。プラトーになる条件は、反応条件により異なる。

[8] その他

pHもPCRに影響を及ぼす。通常10~50 mmol/Tris-HCl (pH 8.3~8.8 at 20°C)が用いられる。また、塩濃度、ゼラチンや非イオン性界面活性剤の存在によっても影響を受ける。

2. ISOHAIR で抽出した DNA を用いた PCR

2-1 準備するもの

● 試薬

- Gene *Taq* NT
- 10×Gene *Taq* Universal Buffer (15 mM Mg^{2+} , Tris 系)
- dNTP Mixture (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各 2.5 mM)
- ddWater (以降、ddH₂O)
- *プライマーは含まれていませんので、別途ご用意下さい。

● 器具

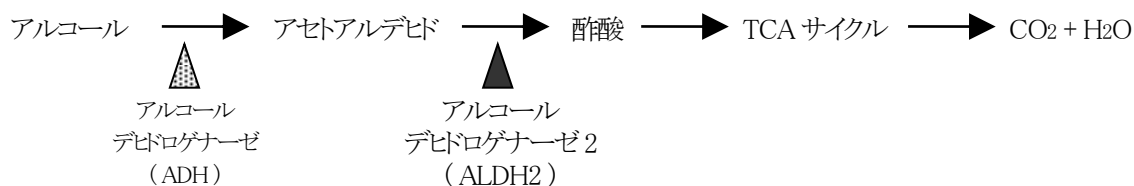
- マイクロピペット
- マイクロチューブ
- サーマルサイクラー

2-2 PCR 例

アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2(ALDH2)遺伝子型の検出

アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2(ALDH2)は、飲酒後エタノールが代謝されてできるアルデヒドを酸化し代謝する酵素である。ALDH2 遺伝子は第12染色体長腕(12q24.2)に位置し、44kbの塩基配列中に少なくとも13個のエクソンを有し、517個のアミノ酸よりなるALDH2のサブユニットをコードしている。ALDH2活性の欠損はALDH2遺伝子の点突然変異によるもので、ALDH2遺伝子の第12エクソンの114番目の塩基がG(グアニン)からA(アデニン)へ変異をおこしており、その結果第487番目のアミノ酸がグルタミン酸(GAA)からリジン(AAA)に置換している。対立遺伝子の組み合わせから、正常型ホモ接合体(NN型)、ヘテロ接合体(MN型)、変異型ホモ接合体(MM型)の3種類の遺伝子型が知られている。3種類のうちのどの遺伝子型を持っているかを調べることで、酒に強い/弱いかを判断することができる。正常型ホモ接合体(NN型)はいわゆるお酒が飲めるタイプ、ヘテロ接合体(MN型)はすぐに

顔に出るが比較的飲めるタイプ、変異型ホモ接合体(MM型)はすぐに顔に出て飲めないタイプといえます。ALDH2欠損者(MM型)においては、飲酒后、血中アセトアルデヒド濃度の上昇により、フラッシング反応(顔面紅潮、動悸、悪心、低血圧等)が見られる。



PCR 反応液(1 サンプル分)

鋳型 DNA(毛髪 [※] の毛根部から抽出した DNA)	1 μ l
10 \times Gene Taq Universal Buffer	5 μ l
dNTP Mixture(各 2.5 mM)	4 μ l
プライマー(Forward, 20 pmol/ μ l)	1 μ l
プライマー(ReverseN または M, 20 pmol/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	37.75 μ l
Gene Taq NT	0.25 μ l
total	50 μl

PCR 条件

98°C 1分	} 35 サイクル
↓	
98°C 20秒	
60°C 20秒	
72°C 45秒	}
↓	
72°C 5分	

Gene Taq NT (Taq DNA polymerase) 以外の PCR 反応液の試薬をピペットマンでマイクロチューブに入れ、ピペットマンの吸出しにより軽く攪拌する。

Gene Taq NT (Taq DNA polymerase) を加える。Gene Taq NT (Taq DNA polymerase) 添加後は、酵素の失活を避けるため、過度の攪拌はしないようにする。

(複数サンプル分の反応液をまとめて調製する場合は、49 μ l ずつ分注してから最後に鋳型 DNA を入れる。)

PCR 条件を設定したサーマルサイクラーにセットし、PCR を行う。

アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 (ALDH2) プライマーの配列

Forward	:	5'-CAA ATT ACA GGG TCA ACT GCT-3'
Reverse/正常型(N)	:	5'-CCA CAC TCA CAG TTT TCT CTT C-3'
Reverse/変異型(M)	:	5'-CCA CAC TCA CAG TTT TCT CTT <u>I</u> -3'

*アンダーラインの塩基は点突然変異がおこっている部位

その他、MCT118 型検査、p53 遺伝子の検出、ヒトミトコンドリア DNA 等の検出については、Appendix 参照。

トラブルシューティング

トラブルの内容

- 増幅産物がスミアリングする。
 - ・*Taq* DNA Polymerase の量を減らす。
 - ・テンプレートの量を増やす。
 - ・変性温度を高くする。
 - ・プライマーを長くする。

 - 目的のバンドと異なるものが増幅される。
 - ・プライマーの設計を変える。
 - ・毛髪をよくエタノール洗浄してから抽出する。

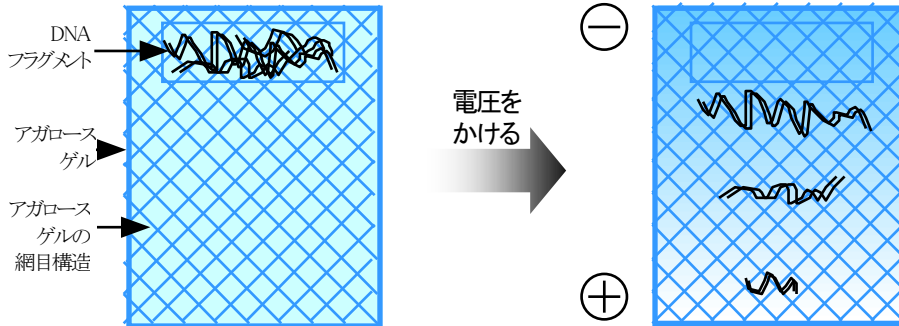
 - 増幅しない。
 - ・ISOHAIR での DNA 抽出に問題が考えられる場合には、DNA 抽出のトラブルシューティング(p.10)を参照する。
 - ・爪や毛髪の毛幹部から抽出した場合、DNA の収量が少ないため、反応液中の鋳型 DNA 量が少なすぎる可能性がある。毛髪の毛根部から抽出した DNA を使用してみる。
 - ・毛髪から抽出した DNA の場合、メラニンなどの阻害物質が含まれており、PCR が阻害されることがある。DNA 抽出のトラブルシューティング(p.10)を参照する。
 - ・テンプレートの量を増減させてみる。
 - ・*Taq* DNA Polymerase の量を増やす。
 - ・サイクル数を増やす。
-

Ⅲ アガロースゲル電気泳動

1. アガロースゲル電気泳動の原理

アガロースゲル電気泳動は、DNA や RNA の分離や解析に用いられる。

DNA はリン酸基を持つため、負の電荷をもっている。DNA 溶液をアガロースゲルのウェルに入れ、電圧をかけると、DNA 分子は、アガロースの網目構造をくぐり、マイナスからプラスの方向に移動する。DNA 分子の電荷は一定の割合でかかっているが、短い DNA 断片は網目をくぐりやすく(網目に引っ掛かりにくい)、長い断片は網目をくぐりにくい(網目に引っ掛かりやすい)ため、移動の度合いに差ができる。



[1] アガロース

アガロースは数百 bp から数 kbp 程度の DNA を電気泳動する際によく用いられる。

寒天の主成分をなす多糖で、熱水に溶かし室温に冷やすとゼリー状のゲルを作製する。このゲルは、多糖鎖間の水素結合が作る大きな網目構造を持っている。

ゲルの濃度により、DNA の分離能が異なるため、目的の DNA 断片のサイズに適した濃度にする必要がある。また、アガロースの性能によって多くの種類があるので、目的に応じたアガロースを選択した方がよい。ここでは、数百ベースの PCR 産物を電気泳動するため、低分子量核酸電気泳動用アガロース “Agarose 21” (3%ゲル)を使用する。

[2] 電気泳動バッファー(1×TAE)

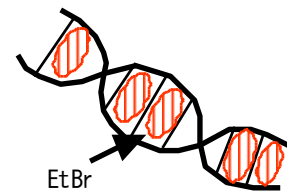
電気泳動の際、電圧をかけて DNA をマイナスからプラスに移動させるためには、適当な電導性を持たせるための電解質を含む水溶液が必要である。ここでは、電解質を含む水溶液として 1×TAE バッファーを使用する。1×TAE バッファーの組成は Tris-Acetate、EDTA である。通常 50×で調製・保存されることが多く、ddH₂O で 1×に希釈して使用する。TAE バッファーの他、よく使われる電気泳動用バッファーとして、ほう酸系の TBE バッファーがある。

[3] エチジウムブロマイド

核酸のゲル電気泳動時の染色に使用される。二本鎖 DNA の塩基対の間に挿入(インターカレーション)され、紫外線を当てると目に見える 590 nm の蛍光を発するので、核酸のバンド検出に有効である。

エチジウムブロマイドは DNA に挿入されることで DNA の正常な複製や転写を妨げる、突然変異誘起剤の効果を持っている。取り扱いの際には必ず使い捨て手袋を着用し、皮膚等に付着した場合は、すぐに水でよく洗う。

また、エチジウムブロマイドを含む物質は、必ず除染処理を行ってから廃棄する。



[4] Loading Buffer

電気泳動する際にサンプルに加えるバッファーである。色素マーカーとして BPB (Bromophenol blue) 等が含まれており、色素マーカーの位置で、どのくらい泳動が進んでいるかを判断できる。電気泳動用バッファー中でアガロースゲルのウェルにサンプルを沈めるため、重み付けのグリセリンが含まれている。添付されている Loading Buffer の組成は、0.02% Bromophenol blue, 0.02% Xylene cyanol, 50% Glycerol, 1% SDS である。

[5] 電気泳動槽

ここでは、ミニゲル型(ミューピッド)を使用する。ミニゲル型は泳動槽が小さく、扱いやすくなっている。ゲルのウェルが小さいので、少量の DNA サンプルで電気泳動できる。アガロースやバッファーの量も少量でよい。

2. 電気泳動

2-1 準備するもの

● 試薬

Agarose 21

50×TAE

EtBr Solution (10 mg/ml)

Loading Buffer

Marker 4 (0.5 μg/μl)

TE

ddH₂O*

*TAE Buffer 希釈用の ddH₂O は、ISOHAIR Jr.に含まれておりません。

● 器具

フラスコ

ラップ

針

ミニゲル用ゲルトレイ

メスシリンダー

電子レンジ

注意！ EtBr (エチジウムブロマイド)が付着、混入しているものを扱う際には、必ず使い捨て手袋を装着して下さい。

2-2 アガロースゲル(3% ゲル, 100 ml)の作製

1. Agarose 21 1 袋 (3 g) 全量を 200 ml または 300 ml フラスコに入れる。(溶解中に泡が出て溢れることがあるので、大きめのフラスコを使用する。)
2. ddH₂O で希釈した 1×TAE 100 ml を 1.に加える。(アガロース終濃度 3%)
3. フラスコの口にラップをかき、ラップに針などで 2~3 ケ所小さい穴をあける。
4. 電子レンジで溶かす。ゲル濃度が高いため、溶解中にふき上がる(泡が出て溢れる)ことがあるので、様子を見ながら注意して加熱する。
5. アガロースゲルが完全に溶けたら(フラスコの底にアガロースが残っていることがあるので注意する)、ゲルに EtBr Solution を入れる。アガロースゲル 100 ml 当たり 2 μl の割合で加え、フラスコを穏やかに振って、EtBr 濃度を均一にする。(EtBr 入りアガロースゲル)
電気泳動後 EtBr 染色する場合は、ここで EtBr Solution を加えずに 6.へ。
6. 室温で静置し、フラスコを手で触れる程度(50°C程度)まで冷ます。
7. ゲルトレイに、6.を 3 mm 厚程度になるよう流し入れる(6~8 レーン用のミニゲルで 15~20 ml 程度)、表面に気泡がある場合は、除去しておく。室温で 30 分程度静置する。
8. 7.が完全に固まったら、コームを静かに引き抜く。
9. アガロースゲルを泳動槽にセットする。
10. 泳動槽に、ddH₂O で希釈した 1×TAE バッファーをゲルの表面が浸る程度(約 300 ml)入れる。

2-3 泳動サンプルの準備

1. PCR産物に Loading Buffer を 1/10 量加える。
2. ボルテックスで攪拌する。
3. 軽く遠心(flash)する。

* Marker 4 (0.5 μg/μl) は、添付の TE (pH 8.0) で使いやすい濃度に希釈し、1/10 量の Loading Buffer を加えた後、ボルテックスによる攪拌、遠心(flash)を行う。

ミニゲル 6~8 レーン/枚の場合、Marker 4 を 1 ウェルあたり 0.2~0.5 μg/10 μl に希釈し、さらに Loading Buffer を 1/10 量加える。

2-4 電気泳動

1. ゲルのウェルにマイクロピペットで 2-3 で用意した泳動サンプル (PCR 産物に Loading Buffer を加えたもの) をアプライする。サンプル量は、ウェルの大きさによって異なるので、あらかじめどのくらいの量をアプライできるか確認しておく。

(ミニゲル 8 レーン/枚の場合、1 ウェルあたり 10 μl 程度アプライできる。)

2. サンプルの隣の空きレーンに、DNA サイズマーカーとして、希釈済みの Marker 4 (1/10 量の Loading Buffer を加えたもの) をアプライする。

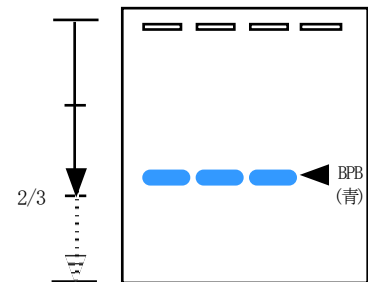
3. ミニゲルの場合、100 V で電気泳動する。

4. BPB (青い色素) がウェルからゲルの 2/3 位まで移動したら、泳動をとめる。(図参照)

5. 泳動槽からゲルを取り出す。エチジウムブロマイド入りゲルの場合には、そのままゲル撮影装置で撮影する。エチジウムブロマイドが入っていない場合は、ddH₂O または 1×TAE で希釈した 0.5~1 μg/ml エチジウムブロマイド溶液に 20 分浸して染色し、UV トランスイルミネーターで適度に染色されたのを確認してからゲルを撮影する。

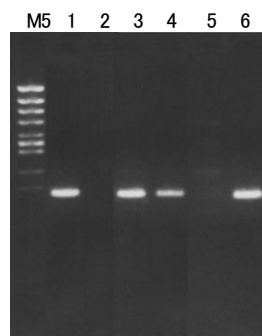
注意！ UV イルミネーターで、バンドを確認する場合、

- DNA の分解を防ぐため、UV 照射時間はできるだけ短時間にしてください。
- 確認する際には、眼鏡などを着用し、絶対に目で直接見ないでください。



2-5 電気泳動例

ALDH2 遺伝子型の検出



Marker 5 (φX174/ HincII digest)

- レーン 1 正常型(+) } 正常型ホモ接合体
- レーン 2 変異型(-) }
- レーン 3 正常型(+) } ヘテロ接合体
- レーン 4 変異型(+) }
- レーン 5 正常型(-) } 変異型ホモ接合体
- レーン 6 変異型(+) }

遺伝子型	酵素活性	フラッシング反応*	飲酒に対するタイプ	レーン
正常型ホモ接合体	100%	なし	いわゆる酒が飲めるタイプ	1, 2
ヘテロ接合体	~6%	あり	すぐに顔に出るが、比較的飲めるタイプ	3, 4
変異型ホモ接合体	0%	あり	すぐ顔に出て飲めないタイプ	5, 6

*フラッシング反応: 顔面紅潮、動悸、悪心、低血圧

トラブルシューティング

トラブルの内容

- バンドがゆがむ。
 - ・コームを抜く際に、アガロースゲルが消れて、ウェルが変形した場合は、変形していないウェルを使用する。
 - ・ゲル濃度が均一でない場合は、ゲル濃度を均一にする。
 - 電気泳動後、EtBr で染色しすぎた。
 - ・1×TAE 中に泳動後のアガロースゲルを染色の度合いがちょうどよくなるまで浸す。(脱色)
 - EtBr 入りアガロースゲルで電気泳動後、-から+側のEtBr が抜けて、バンドが見えない。
 - ・DNA は-に電荷が帯びているため、電場にかかると、-から+に向かって移動するが、EtBr は+から-に向かって移動する。つまり、EtBr 入りアガロースゲルで電気泳動を行うと、+から-に向かってEtBr が抜けていく。十分なDNA 量を電気泳動したにも関わらず、バンドが見えない場合、EtBr が抜けた部分にDNA が存在していることが考えられる。この場合は、EtBr で染色する(ddH₂O または1×TAE で希釈した0.5~1 μg/ml EtBr Solution に染色の度合いが丁度よくなるまで浸す)。
 - バンドの見え方が薄い。
 - ・EtBr で染色する。
 - ・サンプル量が少なすぎる場合は、サンプル量を増やす。
 - EtBr で染色しても、バンドが見えない。
 - ・電気泳動時間が長すぎて、DNA がアガロースゲルから流れ出てしまった可能性がある。この場合、残っているサンプルで再度電気泳動する。
 - ・サンプル量が少なすぎる場合は、サンプル量を増やす。
-

Appendix

[ISOHAIR を用いたデータ集]

1. ヒトの毛髪を用いた実験例

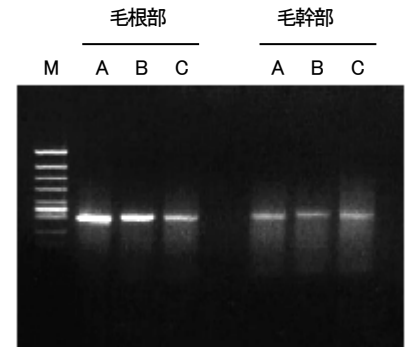
ミトコンドリア DNA の検出

ISOHAIR を用いて、A、B、C 3 人の毛根部 1 cm または毛幹部 6 cm より DNA を抽出した。

得られた DNA の 1/4 量を使用して、ヒト ミトコンドリア DNA (D ループ領域 ; 280 bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>		<PCR 条件>	
Template DNA	5 μ l	94°C	1 min.
10 \times Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	98°C	15 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	55°C	15 sec.
primer (20 pmol each/ μ l)	1 μ l	72°C	30 sec.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l	72°C	5 min.
ddH ₂ O	34.5 μ l		
total	50 μ l		

40 cycles



M: Marker 5 (ϕ X174/ HincII digest)
3% Agarose 21

p53 遺伝子の検出

ISOHAIR を用いて、毛根部 1cm または毛幹部 6 cm より DNA を抽出した。

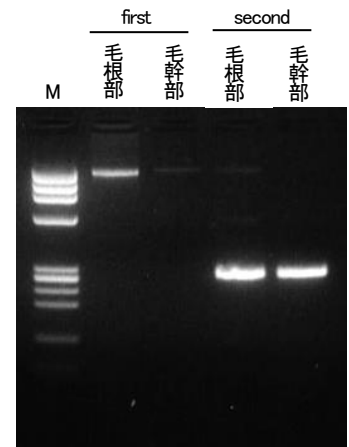
得られた DNA の 1/4 量を使用して、ヒト p53 遺伝子(exon 11)を semi-nested PCR (first PCR 産物 1296 bp、second PCR 産物 265 bp) にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>		<first PCR 条件>	
Template DNA		*テンプレートは 5 μ l を使用した。	
10 \times Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	94°C	1 min.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	98°C	15 sec.
primer-forward (20 pmol/ μ l)	1 μ l	55°C	15 sec.
primer-reverse (20 pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	30 sec.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.25 μ l	72°C	5 min.
ddH ₂ O	38.75 μ l		
total	50 μ l		

40 cycles

<second PCR 条件>	
* first PCR 反応液 1 μ l をテンプレートとした。	
94°C	1 min.
98°C	15 sec.
60°C	15 sec.
72°C	30 sec.
72°C	5 min.

30 cycles



M: Marker 4 (ϕ X174/ HaeIII digest)
3% Agarose 21

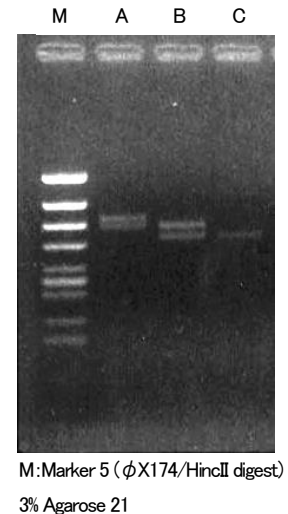
ヒト p53 遺伝子を増幅した first PCR 産物を用いてサイクルシーケンスを行ったところ、毛根部、毛幹部ともにシーケンスすることができた。

MCT118 型検査

MCT118 座位は、第 1 染色体短腕部末端に位置する 16 塩基を繰り返し単位とする VNTR(variable number of tandem repeat)であり、個人によって繰り返し数が異なることを利用して、法医学資料からの個人識別などに用いられている。

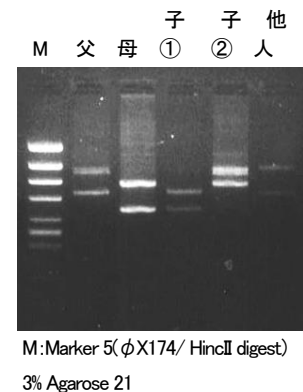
ISOHAIR を用いて、A、B、C 3 人の毛根部 6 cm より DNA を抽出した。得られた DNA の 1/4 量を使用して、MCT118 座位を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>		<PCR 条件>	
Template DNA	5 μ l	94°C	1 min.
10 × Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	94°C	30 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	64°C	30 sec.
primer-forward (20 pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	2 min.
primer-reverse (20 pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	5 min.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l		
ddH ₂ O	33.5 μ l		
total	50 μ l		



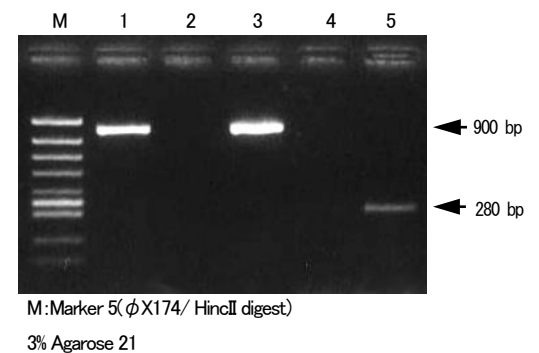
ISOHAIR を用いて、父、母、子①、子②、他人の各々の毛根部 1 cm × 2 本より DNA を抽出した。得られた DNA の 1/4 量を使用して、MCT118 座位を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>		<PCR 条件>	
Template DNA	5 μ l	94°C	1 min.
10 × Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	94°C	15 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	66°C	15 sec.
primer-forward (20 pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	2 min.
primer-reverse (20 pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	5 min.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l		
ddH ₂ O	33.5 μ l		
total	50 μ l		



T4 gene 32 protein を用いた PCR 阻害の緩和

毛髪から抽出した DNA 溶液が、茶褐色や黒色に着色していることがある。これは 15 cm 以上の長い毛髪の毛先部や脱色された毛髪において特に顕著である。着色の原因物質は毛髪に含まれている色素メラニンであると考えられ、PCR を阻害することが報告されている。ISOHAIR を用いて、毛髪よりメラニンを多く含むと思われる DNA を抽出した。既に PCR による増幅が確認されている(lane 1)反応混合液に、得られた DNA の 1/20 量を添加したところ増幅しなかった(lane 2)。そこで、さらに T4 gene 32 protein を添加したところ増幅した(lane 3)。また、得られた DNA をテンプレートとして、ヒト ミトコンドリア DNA(280 bp)の PCR を行ったところ増幅しなかった(lane 4)が、T4 gene 32 protein を添加したところ増幅した(lane 5)。



- lane 1 CoIE1 をテンプレートとした 900 bp の増幅
lane 2 lane 1 + 毛幹部 6 cm より抽出した、メラニンを多く含む DNA1/20 量
lane 3 lane 2 + T4 gene 32 protein (2 μ g)
lane 4 毛幹部 6 cm より抽出した、メラニンを多く含む DNA1/20 量をテンプレートとしたヒト ミトコンドリア DNA (280 bp) の増幅
lane 5 lane 4 + T4 gene 32 protein (2 μ g)

<ColE1 PCR 混合液>			
Template DNA (ColE1/Sau96I digest)			0.1 ng
10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer			5 μl
dNTP mixture (2.5 mM each)			4 μl
primer-forward (20 pmol/μl)			1 μl
primer-reverse (20 pmol/μl)			1 μl
Gene <i>Taq</i> NT (5 units/μl)			1 μl
ddH ₂ O			
total			40 μl
	lane 1	lane 2	lane 3
ColE1 PCR 混合液	40 μl	40 μl	40 μl
メラニンを含む DNA 溶液	0 μl	1 μl	1 μl
T4 gene 32 protein (0.5 μg/μl)	0 μl	0 μl	4 μl
ddH ₂ O	10 μl	9 μl	5 μl
total	50 μl	50 μl	50 μl
<PCR 条件>			
94°C	1 min.		
94°C	20 sec.	} 20 cycles	
55°C	20 sec.		
72°C	20 sec.		
72°C	5 min.		

<ヒト ミトコンドリア DNA PCR 混合液>			
10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer			5 μl
dNTP mixture (2.5 mM each)			4 μl
primer-forward (20 pmol/μl)			1 μl
primer-reverse (20 pmol/μl)			1 μl
Gene <i>Taq</i> NT (5 units/μl)			1 μl
ddH ₂ O			28 μl
total			40 μl
	lane 4	lane 5	
ヒト ミトコンドリア DNA PCR 混合液	40 μl	40 μl	
メラニンを含む DNA 溶液 (Template)	1 μl	1 μl	
T4 gene 32 protein (0.5 μg/μl)	0 μl	4 μl	
ddH ₂ O	9 μl	5 μl	
total	50 μl	50 μl	
<PCR 条件>			
98°C	1 min.		
98°C	15 sec.	} 20 cycles	
60°C	15 sec.		
72°C	30 sec.		
72°C	5 min.		

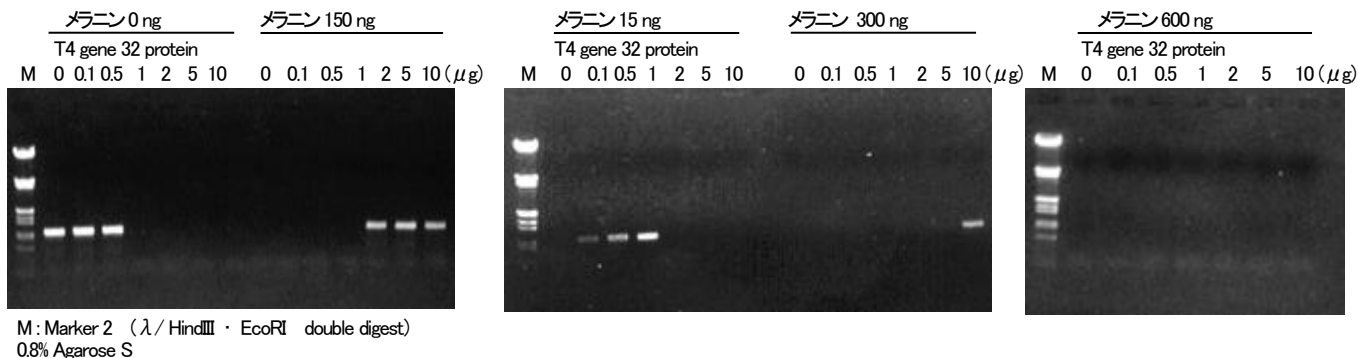
<参考データ>

次に、メラニン量と T4 gene 32 protein の添加量の関係について例を示した。

T4 gene 32 protein によるメラニンの PCR 阻害の緩和について前ページで記述したが、T4 gene 32 protein 自身も、過剰量添加することにより、PCR 阻害を引き起こす。

また、メラニン含量が非常に高い場合、T4 gene 32 protein を添加しても、阻害を緩和することができないことが予想される。

<ColE1 PCR 混合液>			<PCR 条件>	
Template DNA (ColE1/Sau96I digest)		0.1 ng	94°C	1 min.
10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer		5 μl	94°C	20 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)		4 μl	55°C	20 sec.
primer-forward (20 pmol/μl)		1 μl	72°C	1 min.
primer-reverse (20 pmol/μl)		1 μl		} 20 cycles
Gene <i>Taq</i> NT (5 units/μl)		1 μl		
メラニン	0, 15, 150, 300, 600 ng			
T4 gene 32 protein	0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 μg			
ddH ₂ O				
total		50 μl		



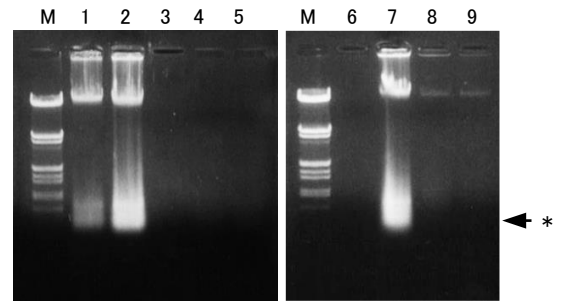
毛髪から得られるDNA量

ISOHAIR を用いて、A、B、C 3 人の毛根部または毛幹部より DNA を抽出し、電気泳動を行った。

個人によって、あるいは同一人物でも毛髪によって DNA 量に差があることが認められた。

抽出されてくる DNA 量は、アガロース電気泳動の結果より、毛髪 1 本あたり毛根部では約 0.5 μ g、毛幹部では、ごく微量で検出できないことから 10 ng 以下であると思われる。

Lane 1 A 毛根部	1 cm	lane 6 B 毛根部	1 cm
2 A 毛根部	1 cm × 5 本	7 B 毛根部	1 cm × 5 本
3 A 毛幹部	6 cm	8 C 毛根部	1 cm
4 A 毛幹部	18 cm	9 C 毛根部	1 cm × 5 本
5 A 毛幹部	36 cm		



* lane 1, 2, 3 の下部のバンド(矢印の位置)は RNA である。

M : Marker 2 (λ /HindIII-EcoRI double digest)
0.8% Agarose S

毛髪の部位とDNA量

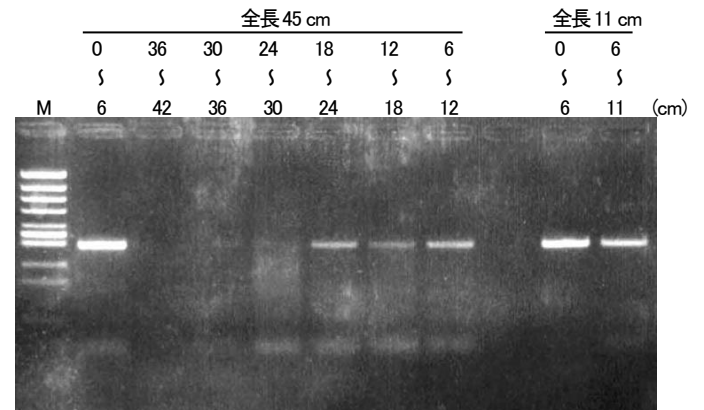
毛幹部から DNA を抽出する際、毛髪の長さが同じでも、部位によって収量に差が認められる。

ISOHAIR を用いて、全長 45 cm または 11 cm の毛髪の毛根部から 0~6 cm、6~12 cm、12~18 cm、18~24 cm、24~30 cm、30~36 cm、36~42 cm の部位より DNA を抽出した。

得られた DNA の 1/4 量を使用して、ヒト ミトコンドリア DNA(D ループ領域 ; 280 bp)を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。毛根部により近い部位の方が増幅量が多く、試料に含まれる DNA が多いと思われる。

<PCR 混合液>		<PCR 条件>	
Template DNA	5 μ l	94°C	1 min.
10 × Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	98°C	15 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	55°C	15 sec.
primer (20 pmol each/ μ l)	1 μ l	72°C	30 sec.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l	72°C	5 min.
ddH ₂ O	34.5 μ l		
total	50 μ l		

40 cycles



M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)

3% Agarose 21

脱毛後の時間経過とDNA量

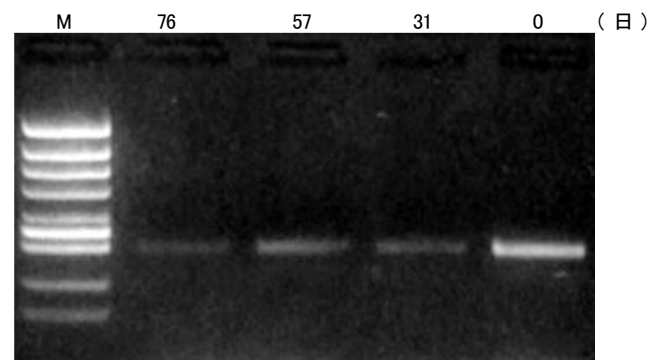
毛髪から回収できる DNA 量は、毛髪が抜けた後、時間の経過とともに徐々に減少していく。

ISOHAIR を用いて、抜いた毛髪の毛幹部 4 cm を 76 日、57 日、31 日、0 日放置したものから DNA を抽出した。

得られた DNA の 1/4 量を使用して、ヒト ミトコンドリア DNA(D ループ領域 ; 280 bp)を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。脱毛後時間が経っていないものの方が増幅量が多く、回収率が高い、あるいは PCR 阻害物質の溶出が少ないと思われる。

<PCR 混合液>		<PCR 条件>	
Template DNA	5 μ l	98°C	1 min.
10 × Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	98°C	15 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	60°C	15 sec.
primer-forward (20 pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	30 sec.
primer-reverse (20 pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	30 sec.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l	72°C	5 min.
ddH ₂ O	33.5 μ l		
total	50 μ l		

35 cycles



M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)

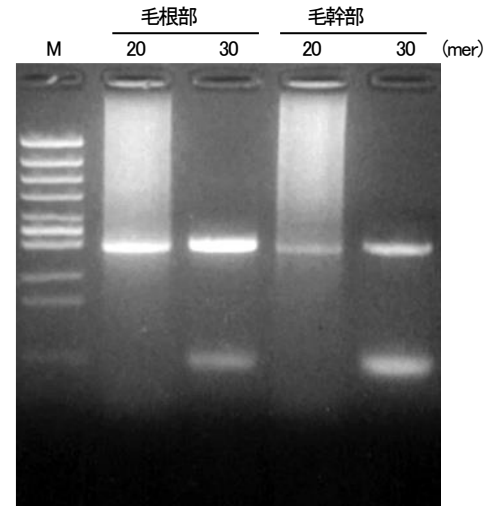
3% Agarose 21

PCR 条件

毛髪から抽出される DNA は非常に微量であるため、再現性の高いデータをとるためには PCR の反応条件に細かな配慮が必要である。

ISOHAIR を用いて、毛根部 1 cm または毛幹部 6 cm より DNA を抽出した。得られた DNA の 1/4 量をテンプレートとし、20 mer または 30 mer のプライマーを用いて、ヒト ミトコンドリア DNA(D ループ領域 ; 280 bp)を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

プライマーを 20 mer から 30 mer に伸ばすことにより、非特異的な増幅が抑えられた。



M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)
3% Agarose 21

<PCR 混合液>	primer 20 mer	primer 30 mer	<PCR 条件>
Template DNA	5 μ l	5 μ l	40 cycles 94°C 1 min. 98°C 15 sec. 55°C 15 sec. 72°C 30 sec. 72°C 5 min.
10 \times Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	5 μ l	
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	4 μ l	
primer (20 pmol each/ μ l)	1 μ l	1 μ l	
		primer-forward (20 p mol/ μ l) primer-reverse (20 pmol/ μ l)	
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.25 μ l	0.25 μ l	
ddH ₂ O	34.75 μ l	33.75 μ l	
total	50 μ l	50 μ l	

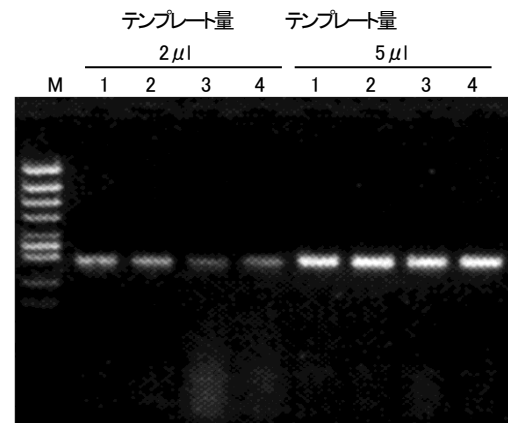
2. ヒトの爪を用いた実験例

ミトコンドリア DNA の検出

ISOHAIR を用いて、A、B 2 人の爪より DNA を抽出した。得られた DNA の 1/10 量または 1/4 量を使用して、ヒト ミトコンドリア DNA (D ループ領域 ; 280 bp)を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>	2 μ l	5 μ l
Template DNA	2 μ l	5 μ l
10 \times Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	5 μ l
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	4 μ l
primer (20 pmol each/ μ l)	1 μ l	1 μ l
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l
ddH ₂ O	37.5 μ l	34.5 μ l
total	50 μ l	50 μ l

<PCR 条件>	40 cycles
98°C 1 min.	40 cycles
98°C 15 sec.	
55°C 30 sec.	
72°C 1 min.	
72°C 5 min.	



lane 1 A 爪切りで切った爪をカッターで約 1 mm 角に刻んだもの (9.7 mg)
2 A 爪切りで切った爪をカッターで約 1 mm 角に刻んだもの (26.3 mg)
3 A 爪切りで切ったままのもの (34.0 mg)
4 B 爪切りで切った爪をカッターで約 1 mm 角に刻んだもの (12.5 mg)

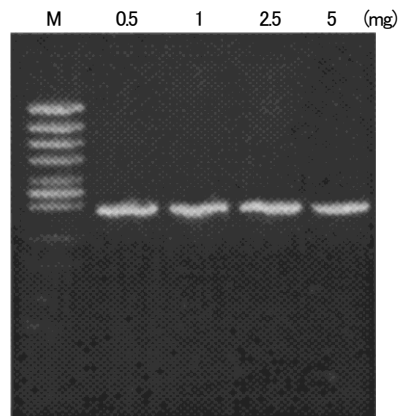
M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)
3% Agarose 21

ISOHAIR を用いて、カッターで約 1 mm 角に切った爪 0.5 mg、1 mg、2.5 mg、5 mg より DNA を抽出した。

得られた DNA の 1/10 量を使用して、ヒト ミトコンドリア DNA(D ループ領域 ; 280 bp)を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>		<PCR 条件>	
Template DNA	2 μ l	94°C	1 min.
10 × Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	94°C	30 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	55°C	30 sec.
primer (20 pmol each/ μ l)	1 μ l	72°C	1 min.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l	72°C	5 min.
ddH ₂ O	37.5 μ l		
total	50 μ l		

} 35 cycles



M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)
3% Agarose 21

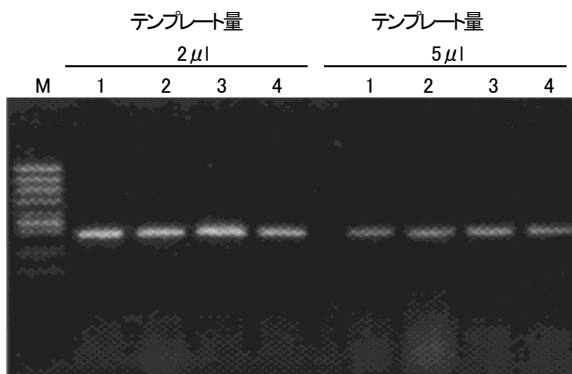
p53 遺伝子の検出

ISOHAIR を用いて、A、B 2 人の爪より DNA を抽出した。

得られた DNA の 1/10 量または 1/4 量を使用して、ヒト p53 遺伝子 (exon10 ; 279 bp)を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>		<PCR 条件>	
Template DNA	2 μ l 5 μ l	94°C	1 min.
10 × Gene Taq Universal Buffer	5 μ l 5 μ l	94°C	15 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l 4 μ l	55°C	30 sec.
primer (20 pmol each/ μ l)	1 μ l 1 μ l	72°C	1 min.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l 0.5 μ l	72°C	5 min.
ddH ₂ O	37.5 μ l 34.5 μ l		
total	50 μ l 50 μ l		

} 35 cycles



lane 1 A 爪切りで切った爪をカッターで約 1 mm 角に刻んだもの(9.7 mg)
2 A 爪切りで切った爪をカッターで約 1 mm 角に刻んだもの(26.3 mg)
3 A 爪切りで切ったままのもの(34.0 mg)
4 B 爪切りで切った爪をカッターで約 1 mm 角に刻んだもの(12.5 mg)

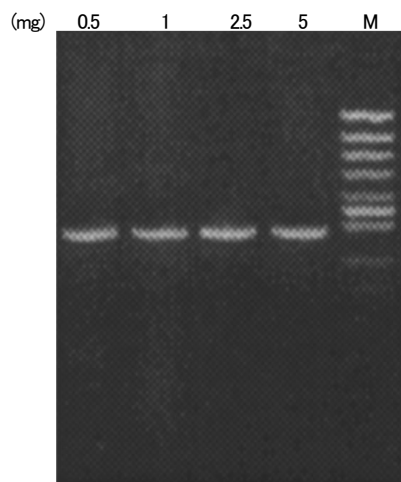
M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)
3% Agarose 21

ISOHAIR を用いて、カッターで約 1 mm 角に切った爪 0.5 mg、1 mg、2.5 mg、5 mg より DNA を抽出した。

得られた DNA の 1/10 量を使用して、ヒト p53 遺伝子(exon 10 ; 279 bp)を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>		<PCR 条件>	
Template DNA	2 μ l	94°C	1 min.
10 × Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	94°C	30 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	55°C	30 sec.
primer-forward (20 pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	1 min.
primer-reverse (20 pmol/ μ l)	1 μ l	72°C	5 min.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l		
ddH ₂ O	36.5 μ l		
total	50 μ l		

} 35 cycles



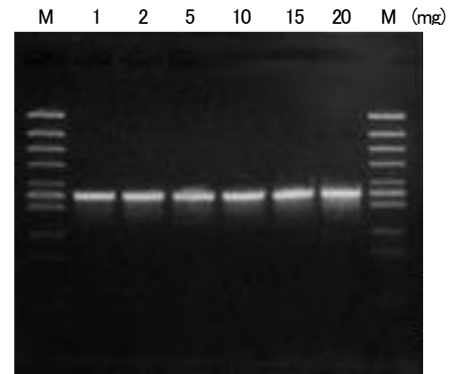
M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)
3% Agarose 21

3. マウスの体毛を用いた実験例

ミトコンドリア DNA の検出

ISOHAIR を用いて、マウスの体毛(1~20 mg)より DNA を抽出した。
得られた DNA の 1/4 量を使用して、マウス ミトコンドリア DNA(D ループ領域 ; 355 bp)を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>		<PCR 条件>	
Template DNA	5 μ l	98°C	1 min.
10× Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	98°C	10 sec.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	55°C	15 sec.
primer (20 pmol each/ μ l)	1 μ l	72°C	30 sec.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l	72°C	5 min.
ddH ₂ O	34.5 μ l		
total	50 μ l		



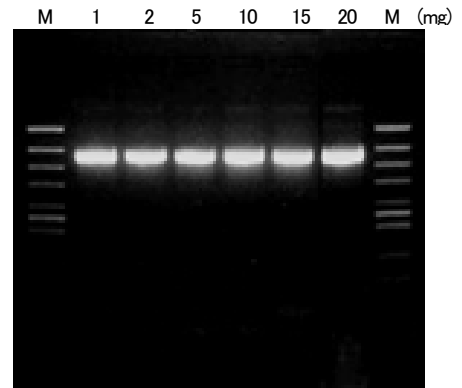
M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)
3% Agarose 21

p53 遺伝子の検出

ISOHAIR を用いて、マウスの体毛(1~20 mg)より DNA を抽出した。
得られた DNA の 1/4 量を使用して、マウス p53 遺伝子(intron 4 ; 714 bp)を nested PCR にて増幅し、電気泳動を行った。second PCR の結果のみ掲載した。

<PCR 混合液>		<first PCR 条件>	
Template DNA	5 μ l	*テンプレートは 5 μ l を使用した。	
10× Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	98°C	1 min.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	98°C	10 sec.
primer (20 pmol each/ μ l)	1 μ l	60°C	15 sec.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l	72°C	1 min.
ddH ₂ O	34.5 μ l	72°C	5 min.
total	50 μ l		

<second PCR 条件>	
*first PCR 産物 1 μ l をテンプレートとした。	
94°C	1 min.
94°C	10 sec.
60°C	15 sec.
72°C	1 min.
72°C	5 min.



M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)
3% Agarose 21

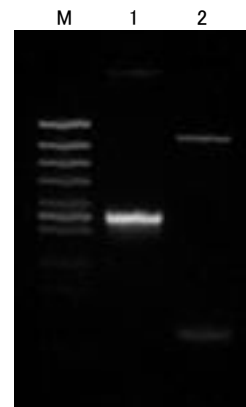
4. マウスの爪を用いた実験例

ミトコンドリア DNA 及び *p53* 遺伝子の検出

ISOHAIR を用いて、マウスの指 1 本分(先端から 1~2 mm 位)の爪より DNA を抽出した。

得られた DNA の 1/4 量を使用して、マウス ミトコンドリア DNA(D ループ領域 ; 355 bp)及び *p53* 遺伝子(intron 4;829 bp)を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。

<PCR 混合液>		<first PCR 条件 (ミトコンドリア DNA) >	
Template DNA	5 μ l	*テンプレートは 5 μ l を使用した。	
10 \times Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	98°C	1 min.
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l	98°C	10 sec.
primer (20 pmol each/ μ l)	1 μ l	60°C	15 sec.
Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.25 μ l	72°C	1 min.
ddH ₂ O	34.75 μ l	72°C	5 min.
total	50 μ l		
		<second PCR 条件 (<i>p53</i> 遺伝子) >	
		*first PCR 産物 1 μ l をテンプレートとした。	
		94°C	1 min.
		94°C	10 sec.
		60°C	15 sec.
		72°C	1 min.
		72°C	5 min.



lane 1 ミトコンドリア DNA
lane 2 *p53* 遺伝子

M : Marker 5 (ϕ X174/HincII digest)
3% Agarose 21

5. データ集で用いられたプライマーの塩基配列

下記は、ISOHAIR Jr.の使用例及びデータ集で用いられたプライマーの塩基配列である。ISOHAIRにより抽出されたDNAを用いたPCRの際に使用できる。

ヒト アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 (ALDH2)

Forward: 5'-CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3'
Reverse/正常型(N): 5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTC-3'
Reverse/変異型(M): 5'-CCACACTCACAGTTTTCTCTTT-3'

ヒト ミトコンドリア DNA (D ループ領域)

Forward: 5'-TACTTGACCACCTGTAGTAC-3'
Reverse: 5'-TGATTTACGGAGGATGGTG-3'

MCT118 型検査

Forward: 5'-GAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCGCCG-3'
Reverse: 5'-GTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCTTGC-3'

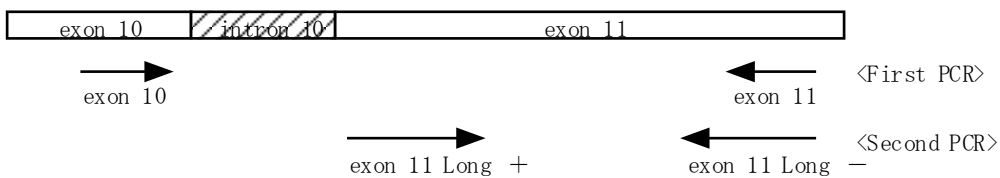
ヒト p53 遺伝子 (exon 11)

<First PCR>

Forward: 5'-GATCCGTCATAAAGTCAAAC-3' (exon 10)
Reverse: 5'-TGCAAGCAAGGGTTCAAAGA-3' (exon 11)

<Second PCR>

Forward: 5'-CCAGCCTTAGGCCCTTCAAAGCATTGGTCA-3' (exon 11 Long +)
Reverse: 5'-CACACCTATTGCAAGCAAGGGTTCAAAGAC-3' (exon 11 Long -)



マウス ミトコンドリア DNA (D ループ領域)

Forward: 5'-TTCTCAAGACATCAAGAAGAAGGGG-3'
Reverse: 5'-GACCAAATGGGGAAGGGGATAGTCA-3'

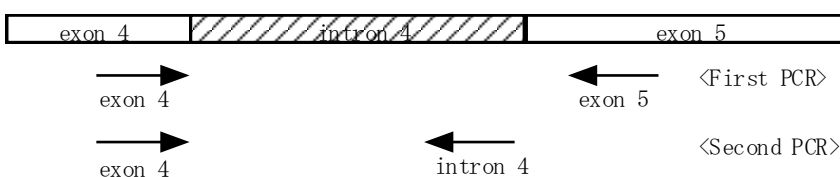
マウス p53 遺伝子 (exon 4)

<First PCR>

Forward: 5'-GGGCTTCCTGCAGTCTGGGACAGCCAAGTC-3' (exon4)
Reverse: 5'-CTGCACAGGGCACGTCTTCGCCAGCTGGCA-3' (exon5)

<Second PCR>

Forward: 5'-GGGCTTCCTGCAGTCTGGGACAGCCAAGTC-3' (exon4)
Reverse: 5'-GGGACAAGCCGAGTAACGATCAGGTGTC-3' (intron 4)



6. 検出遺伝子について

ヒト アルデヒドデヒドロゲナーゼ2

アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2(ALDH2)は、飲酒後エタノールが代謝されてできるアセトアルデヒドを酸化して代謝する酵素である。ヒトのALDHはALDH1～ALDH6の6種類があり、ALDH1及びALDH2はアルコール代謝に関与している。ALDH2の酵素活性を持たない人はアルコールを飲めない。このような人がアルコールを飲んだ場合、アルデヒド代謝が円滑に進まず、様々な不快症状(フラッシング反応*)がもたらされる。東洋人ではALDH2活性の欠損例が多く、欧米人では欠損例がほとんど存在しないことがわかっている。ALDH2活性の欠損は、ALDH2遺伝子^{*2}の突然変異によるもので、ALDH2遺伝子の第12エクソンの114番目の塩基がG(グアニン)からA(アデニン)へ点突然変異を起こしており、その結果、第487番目のアミノ酸がグルタミン酸(Glu:GAA)からリジン(Lys:AAA)に置換している。対立遺伝子の組み合わせから、正常型ホモ接合体(NN型)、ヘテロ接合体(NM型)、変異型ホモ接合体(MM型)の3種類の遺伝子型が知られている。ALDH2の遺伝子型の同定は、アルコール性疾患のリスクマーカーとして有用であると考えられ、PCRを用いて遺伝子型を同定する検査が行われている。

*1 フラッシング反応:血中アセトアルデヒド濃度の上昇により生じる顔面紅潮、動悸、悪心、低血圧等。

*2 ALDH2遺伝子:第12染色体長腕(12q24.2)に位置し、44 kbの塩基配列中に少なくとも13個のエクソンを有し、517個のアミノ酸よりなるALDH2のサブユニットをコードしている。

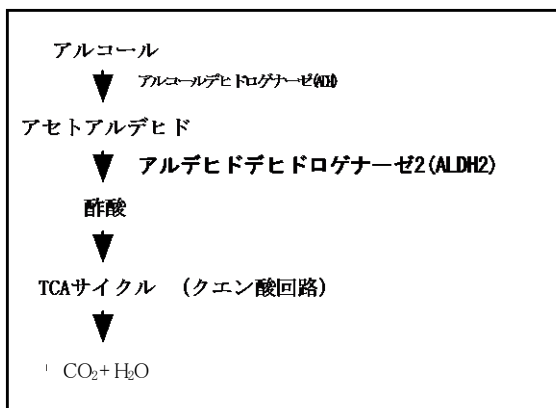


図1 アルコールの代謝

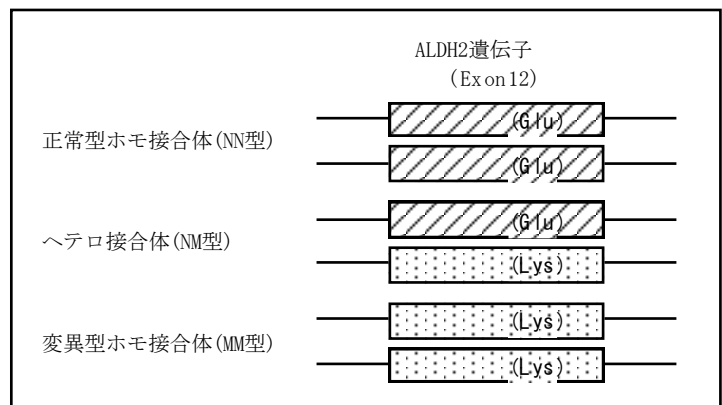


図2 ALDH2遺伝子の3種類の遺伝子型

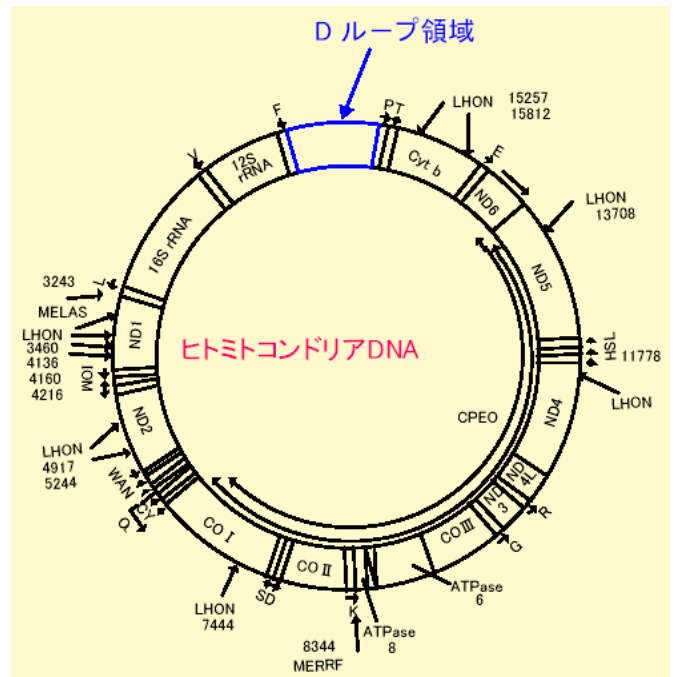
遺伝子型	酵素活性	フラッシング反応	飲酒に対するタイプ
正常型ホモ接合体(NN型)	100%	なし	いわゆる酒が飲めるタイプ
ヘテロ接合体(NM型)	～6%	あり	少量は飲めるが、すぐに顔に出るタイプ
変異型ホモ接合体(MM型)	0%	あり	飲めないタイプ

表1 遺伝子型における飲酒に対するタイプ

ミトコンドリア DNA

ミトコンドリア DNA (mtDNA) は、ミトコンドリアのマトリックス中に存在しており、1 つの細胞に数百～数千コピー存在している。およそ 16.5 kb の環状二本鎖 DNA で、ヒトやマウスでは全塩基配列が決定されている。塩基配列の 90% 以上は遺伝子をコードしている領域で、13 のタンパク質、2 つのリボソーム RNA、22 の転位 RNA の遺伝子を含んでいる。遺伝子をコードしていない領域は、一方の鎖の複製開始点、両方の鎖の転写開始点、そして D ループ^{*3}を含む主要な領域と遺伝子の中に散在する短い配列とにわかれる。ミトコンドリアでは呼吸における酸化的リン酸化が行われており、mtDNA は、その過程で生じる活性酸素に常にさらされているので、活性酸素による DNA の損傷を受けやすい。また、mtDNA はヒストンと結合していないため、非常に変異を受けやすく、DNA 多型を調べるのに有効な材料として用いられる。

*3 D ループ: 二本鎖 DNA の一部に、片方の鎖と相同な塩基配列の一本鎖 DNA 断片が入り込み、追いつかれた本来の二本鎖の一方と新たにできた二本鎖部分とで形成される環状構造。



MCT118 型検査

MCT118 座位は 16 塩基をくり返し単位とする VNTR^{*4}で、第一染色体短腕部末端に位置している。MCT118 型検査は、この VNTR の長さによる多型性に着目し、法医学的な試料からの異同識別を目的として開発された検査法である。法医学試料から精製された DNA を PCR で増幅し、常温でポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、アレリックラダー^{*5}を対象として、DNA 型判定装置により型判定が行われる。

*4 VNTR: variable number of tandem repeat の略。十数塩基から数十塩基の長さの一定の配列がくり返し並んでいて、そのくり返し数が、個人によって異なるという構造を持つ部位。

*5 アレリックラダー: 各対立遺伝子を含むことにより、梯子上のバンドを示す座位特異的のマーカ。

ヒト p53 遺伝子

p53 遺伝子はヒトのガン抑制遺伝子で、DNA の損傷に対する修復、細胞周期の調節、自律的な細胞死(アポトーシス)に深く関わっている。生体の正常な発生、分化、恒常性の維持にとって非常に重要なタンパクで「ゲノムの守護神」「分子警察官」も呼ばれており、多くのガン細胞では p53 遺伝子に変異が確認されている。p53 遺伝子の変異の検出方法として、p53 遺伝子のエクソンを PCR 法で増幅し、シーケンシングや SSCP 解析が行われている。

[関連製品]

製品名	コード No.	容量
Distilled Water, Deionized, Sterile	318-90105	500 ml
Loading Buffer	313-90111	10 ml
Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)	311-90151	250 ml
EtBr Solution	315-90051	10 ml
3 M Sodium Acetate	316-90081	100 ml
50×TAE	313-90035	500 ml
TE (pH 8.0)	316-90025	500 ml
TE Saturated Phenol	313-90091	50 ml
	319-90093	250 ml
1M Tris-HCl (pH 8.0)	314-90065	500 ml
Ethachinmate	318-01793	0.02 ml
	312-01791	0.2 ml
Agarose 21	315-03241	3 g×25(スティックタイプ)
	313-03242	25 g(ボトル)
Agarose X	311-02682	25 g
	313-02681	100 g
Agarose S	312-01193	100 g
アガロース S<錠> Agarose S Tablet	316-06071	0.5 g×140 錠
ISOHAIR	315-03403	10 回分
	319-03401	100 回分
Gene <i>Taq</i> NT	318-03231	250 units
	314-03233	250 units×4
T4 gene 32 protein	318-03253	20 μg
	312-03251	100 μg
Marker 1 (λ/HindIII digest)	316-00454	120 μg
Marker 2 (λ/HindIII, EcoRI double digest)	319-00564	80 μg
Marker 3 (λ/HindIII+ λ/EcoRI digest mixture)	316-00574	80 μg
Marker 4 (φ X174/HaeIII digest)	315-00664	15 μg
Marker 5 (φ X174/HincII digest)	312-00674	15 μg
Marker 6 (λ/StyI digest)	313-00964	80 μg
OneSTEP Marker 1 (λ/HindIII digest)	310-05251	1,500 μl
OneSTEP Marker 2 (λ/HindIII, EcoRI double digest)	317-05261	1,500 μl
OneSTEP Marker 3 (λ/HindIII + EcoRI digest mixture)	314-05271	1,500 μl
OneSTEP Marker 4 (φ X174/ HaeIII digest)	318-05791	375 μl
OneSTEP Marker 5 (φ X174/ HincII digest)	311-05801	375 μl
OneSTEP Marker 6 (λ/StyI digest)	311-05281	1,500 μl
OneSTEP Ladder 50 (0.05~2 kbp)	315-06041	500 μl(100 回分)
OneSTEP Ladder 100 (0.1~2 kbp)	313-05241	500 μl(100 回分)
OneSTEP Ladder 500 (0.5~5 kbp)	313-05361	500 μl(100 回分)
OneSTEP Ladder 1 kb (1~10 kbp)	310-05371	500 μl(100 回分)
オリゴヌクレオチド合成	詳細はホームページをご覧ください。	

株式会社ニッポンジーン

TEL (076) 451-6548

URL www.nippongene.com/siyaku/

お問い合わせはWEB お問い合わせフォームを
ご利用ください。

ISOHAIR Jr. Manual 070516KS-1701