

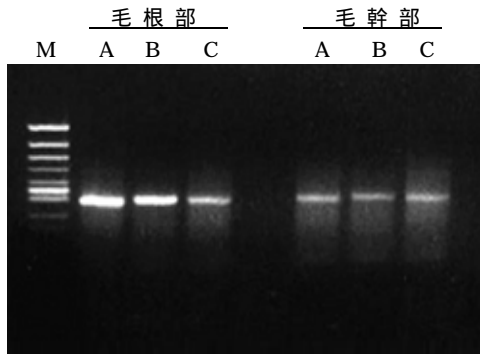
ISOHAIR データ集

1. ヒトの毛髪を用いた実験例	1
ミトコンドリア DNA の検出	1
<i>p53</i> 遺伝子の検出	1
MCT118 型検査	2
T4 gene 32 protein を用いた PCR 阻害の緩和	3
毛髪から得られる DNA 量	5
毛髪の部位と DNA 量	5
脱毛後の時間経過と DNA 量	6
PCR 条件	6
2. ヒトの爪を用いた実験例	7
ミトコンドリア DNA の検出	7
<i>p53</i> 遺伝子の検出	8
MCT118 型検査	9
3. マウスの体毛を用いた実験例	9
ミトコンドリア DNA の検出	9
<i>p53</i> 遺伝子の検出	10
4. マウスの爪を用いた実験例	10
ミトコンドリア DNA の検出および <i>p53</i> 遺伝子の検出	10
5. ヒトの毛髪、爪、口腔粘膜を用いた実験例	11

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 1cm または毛幹部 6cm 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; 280bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。



M: Marker 5 (X174/*Hinc* digest)
3% Agarose 21

< PCR 混合液 >

Template DNA	5 μ l
10 \times Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
primer (20pmol each/ μ l)	1 μ l
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	34.5 μ l
Total	50 μl

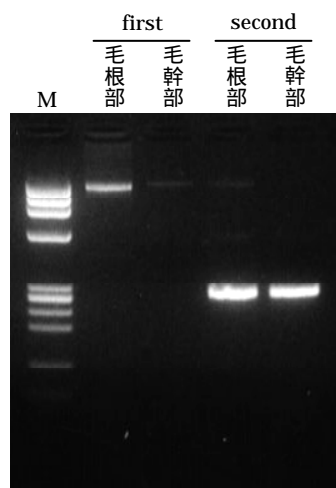
< PCR 条件 >

94	1 min.	} 40 cycles
98	15 sec.	
55	15 sec.	
72	30 sec.	
72	5 min.	

p53 遺伝子の検出

ISOHAIR を用いて、毛根部 1cm または毛幹部 6cm 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(exon11)を semi-nested PCR(first PCR 産物 1296bp、second PCR 産物 265bp) にて増幅し、電気泳動を行った。



M: Marker 4 (X174/*Hae* digest)
3% Agarose 21

< PCR 混合液 >

Template DNA	
10 \times Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
primer-forward (20pmol/ μ l)	1 μ l
primer-reverse (20pmol/ μ l)	1 μ l
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μ l)	0.25 μ l
H ₂ O	
Total	50 μl

< first PCR 条件 >

94	1 min.	} 40 cycles	*テンプレートは 5 μ l を使用した。
98	15 sec.		
55	15 sec.		
72	30 sec.		
72	5 min.		

< second PCR 条件 >

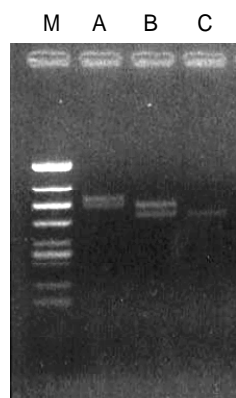
94	1 min.	} 30 cycles	*first PCR 産物 1 μ l をテンプレートとした。
98	15 sec.		
60	15 sec.		
72	30 sec.		
72	5 min.		

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 6cm 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。



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

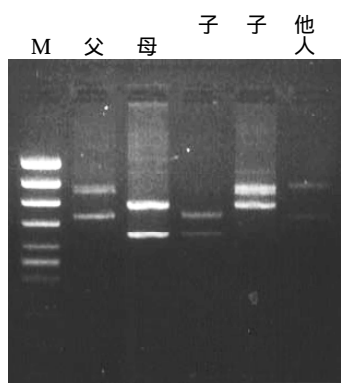
< PCR 混合液 >

Template DNA	5 μ l
10 \times Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
primer-forward (20pmol/ μ l)	1 μ l
primer-reverse (20pmol/ μ l)	1 μ l
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	33.5 μ l
Total	50 μl

< PCR 条件 >

94	1 min.	} 30 cycles
94	30 sec.	
64	30 sec.	
72	2 min.	
72	5 min.	

ISOHAIR を用いて、父、母、子、子、他人の各々の毛根部 1cm \times 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。



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

< PCR 混合液 >

Template DNA	5 μ l
10 \times Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
primer-forward (20pmol/ μ l)	1 μ l
primer-reverse (20pmol/ μ l)	1 μ l
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	33.5 μ l
Total	50 μl

< PCR 条件 >

94	1 min.	} 30 cycles
94	15 sec.	
66	15 sec.	
72	2 min.	
72	5 min.	

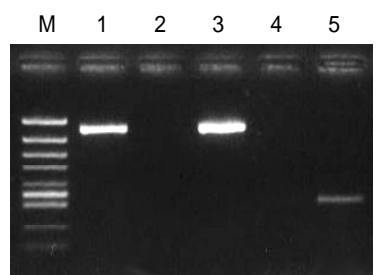
T4 gene 32 protein を用いた PCR 阻害の緩和

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 15cm 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(280bp)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)。



M: Marker 5 (X174/*Hinc* digest)
3% Agarose 21

- Lane 1: ColE1 をテンプレートとした 900bp の増幅
- Lane 2: Lane 1 + 毛幹部 6cm 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 μg)
- Lane 4: 毛幹部 6cm 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 (280bp) の増幅
- Lane 5: Lane 4 + T4 gene 32 protein (2 μg)

< ColE1 PCR 混合液 >

Template DNA (ColE1/ <i>Sau96</i> I digest)	0.1ng
10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μl
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μl
primer-forward (20pmol/ μl)	1 μl
primer-reverse (20pmol/ μl)	1 μl
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μl)	1 μl
Total (H ₂ O up to)	40 μl

< 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 (2.5mM each)	4 μl
primer-forward (20pmol/ μl)	1 μl
primer-reverse (20pmol/ μl)	1 μl
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μl)	1 μl
H ₂ O	28 μl
Total	40 μl

	Lane1	Lane2	Lane3
ColE1 PCR 混合液	40 μl	40 μl	40 μl
メラニンを多く含む DNA 溶液	0 μl	1 μl	1 μl
T4 gene 32 protein(0.5 μg/ μl)	0 μl	0 μl	4 μl
H ₂ O	10 μl	9 μl	5 μl
Total	50 μl	50 μl	50 μl

	Lane4	Lane5
ヒトミトコンドリア DNA PCR 混合液	40 μl	40 μl
メラニンを多く含む DNA 溶液(鑄型)	1 μl	1 μl
T4 gene 32 protein(0.5 μg/ μl)	0 μl	4 μl
H ₂ O	9 μl	5 μl
Total	50 μl	50 μl

< PCR 条件 >

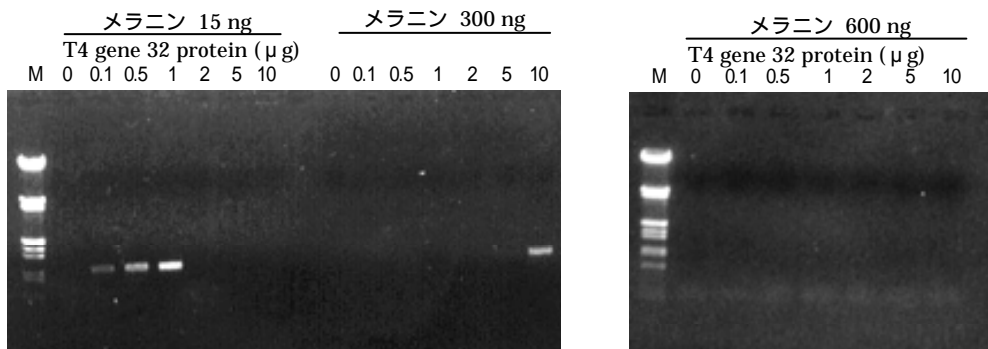
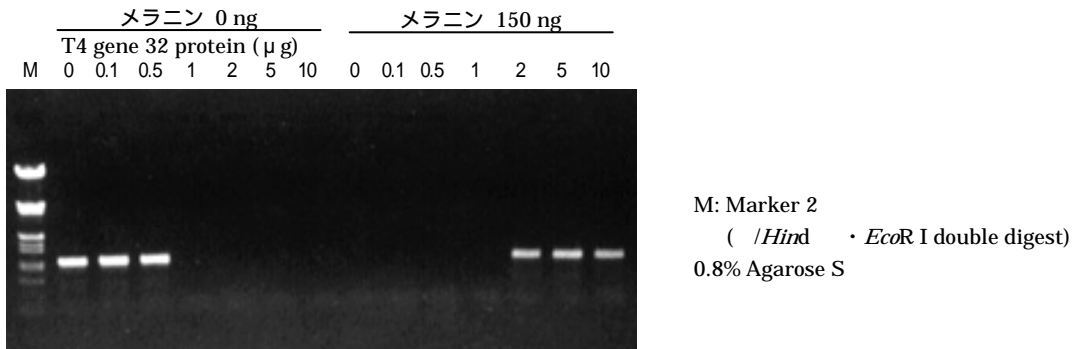
94	1 min.	} 20 cycles
94	20 sec.	
55	20 sec.	
72	20 sec.	
72	5 min.	

< PCR 条件 >

98	1 min.	} 35 cycles
98	15 sec.	
60	15 sec.	
72	30 sec.	
72	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 >

Template DNA (ColE1/Sau 96 I digest)	0.1 ng
10 × Gene Taq Universal Buffer	5 μl
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μl
primer-forward (20pmol/μl)	1 μl
primer-reverse (20pmol/μl)	1 μl
Gene Taq NT (5units/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
H ₂ O	
Total	50 μl

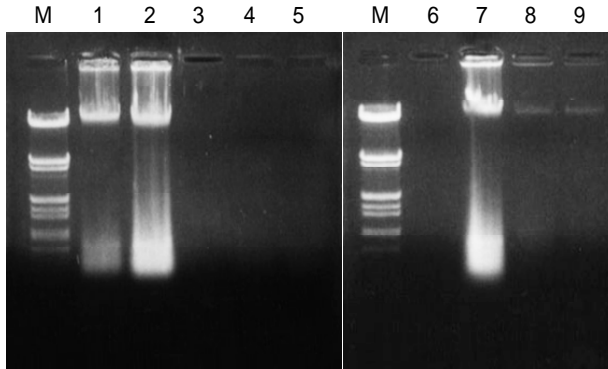
< PCR 条件 >

94	1 min.	} 20 cycles
94	20 sec.	
55	20 sec.	
72	1 min.	

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 10ng 以下であると思われる⁴⁾。



* Lane 1, 2, 7 の下部のバンド (矢印の位置) は RNA である。

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

*

M: Marker 2

(/Hind · EcoR I double digest)

0.8% Agarose S

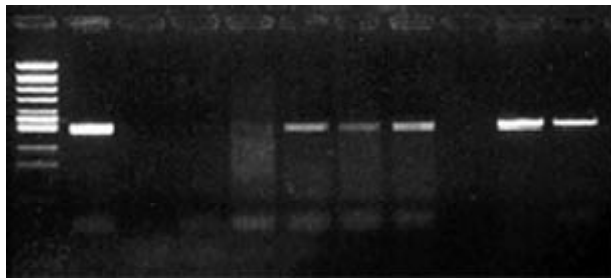
毛髪の部位と DNA 量

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 45cm または 11cm の毛髪の毛根部から 0~6cm、6~12cm、12~18cm、18~24cm、24~30cm、30~36cm、36~42cm 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; 280bp) 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。

	全長45cm							全長11cm	
	0	36	30	24	18	12	6	0	6
	}	}	}	}	}	}	}	}	}
M	6	42	36	30	24	18	12	6	11 (cm)



M: Marker 5 (X174/Hinc digest)

3% Agarose 21

< PCR 混合液 >

Template DNA	5 μ l
10 × Gene Taq Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
primer (20pmol each/ μ l)	1 μ l
Gene Taq NT (5units/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	34.5 μ l
Total	50 μ l

< PCR 条件 >

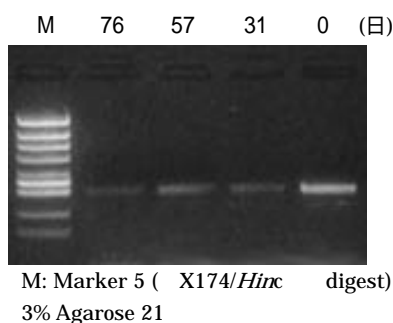
94	1 min.	} 40 cycles
98	15 sec.	
55	15 sec.	
72	30 sec.	
72	5 min.	

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 4cm 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 ; 280bp) 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 >	
Template DNA	5 μ l
10 \times Gene Taq Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
primer-forward (20pmol/ μ l)	1 μ l
primer-reverse (20pmol/ μ l)	1 μ l
Gene Taq NT (5units/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	33.5 μ l
Total	50 μl

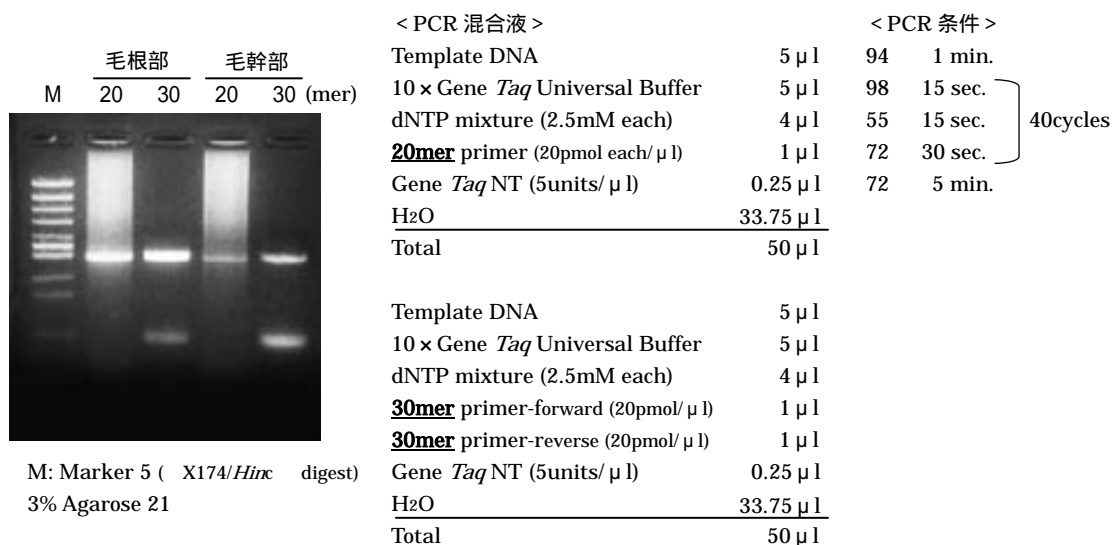
< PCR 条件 >	
98	1 min.
98	15 sec.
60	15 sec.
72	30 sec.
72	5 min.

} 35 cycles

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 1cm または毛幹部 6cm 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、20mer または 30mer 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 ; 280bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。プライマーを 20mer から 30mer に伸ばすことにより、非特異的な増幅が抑えられた。



< PCR 混合液 >		< PCR 条件 >	
Template DNA	5 μ l	94	1 min.
10 \times Gene Taq Universal Buffer	5 μ l	98	15 sec.
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l	55	15 sec.
20mer primer (20pmol each/ μ l)	1 μ l	72	30 sec.
Gene Taq NT (5units/ μ l)	0.25 μ l	72	5 min.
H ₂ O	33.75 μ l		
Total	50 μl		

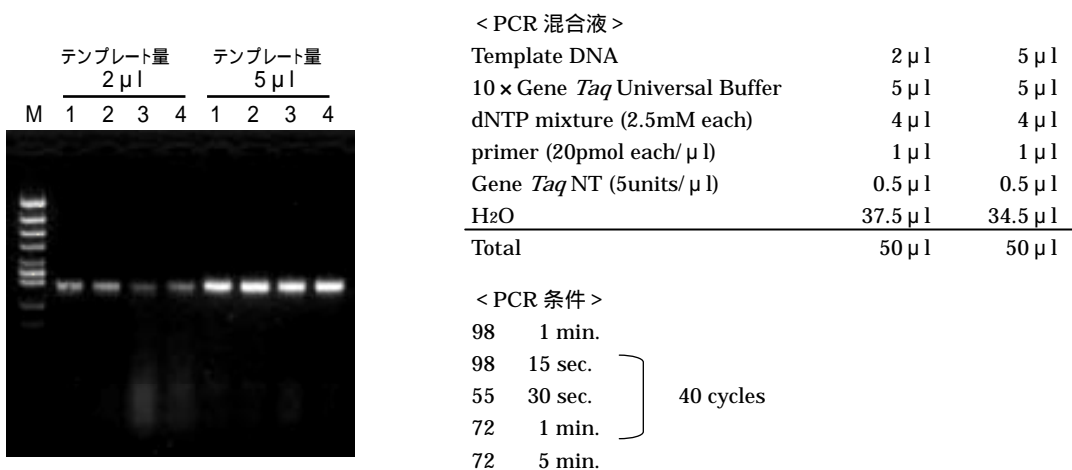
} 40cycles

Template DNA	5 μ l
10 \times Gene Taq Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
30mer primer-forward (20pmol/ μ l)	1 μ l
30mer primer-reverse (20pmol/ μ l)	1 μ l
Gene Taq NT (5units/ μ l)	0.25 μ l
H ₂ O	33.75 μ l
Total	50 μl

2. ヒトの爪を用いた実験例

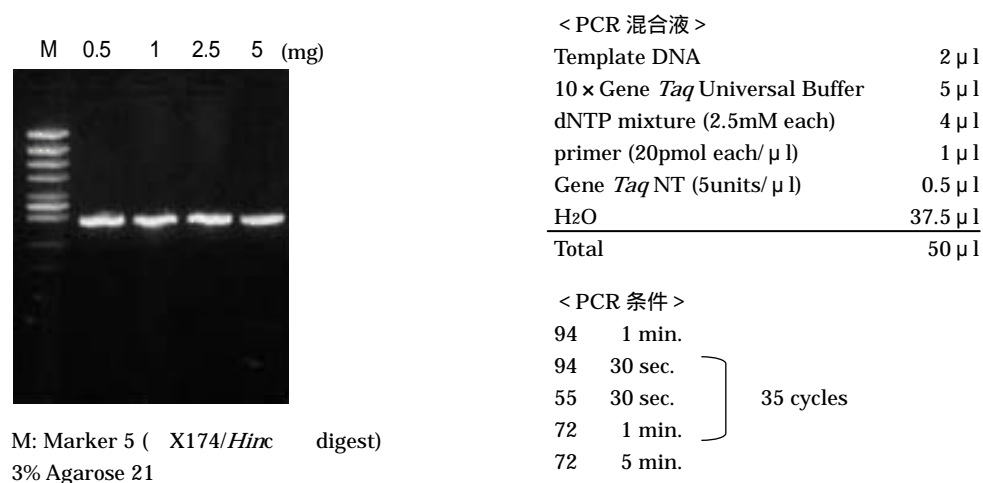
ミトコンドリア DNA の検出

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 ; 279bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。



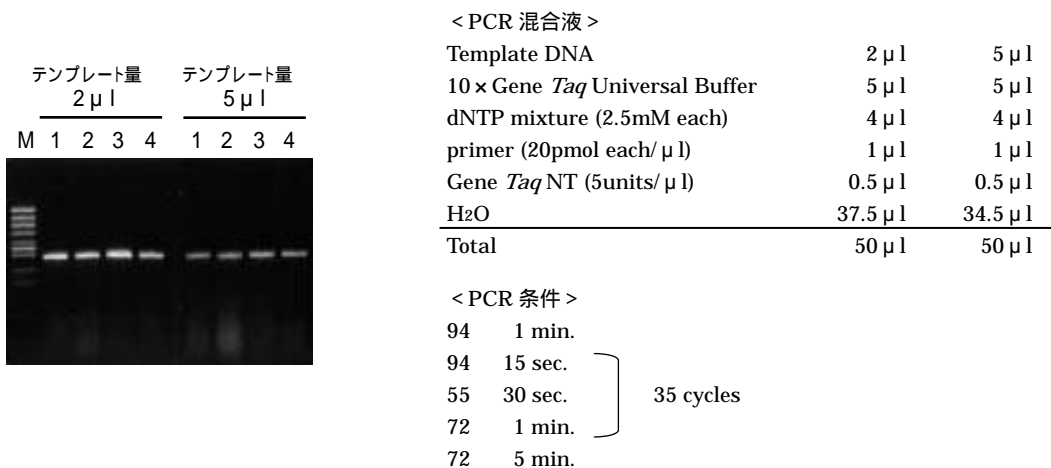
Lane 1: A 爪きりで切った爪をカッターで約 1mm 角に刻んだもの (9.7 mg)
 Lane 2: A 爪きりで切った爪をカッターで約 1mm 角に刻んだもの (26.3 mg)
 Lane 3: A 爪きりで切ったままのもの (34.0 mg)
 Lane 4: B 爪きりで切った爪をカッターで約 1mm 角に刻んだもの (12.5 mg)
 M: Marker 5 (*X174/Hinc* digest), 3% Agarose 21

ISOHAIR を用いて、カッターで約 1mm 角に切った爪 0.5mg、1mg、2.5mg、5mg 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 ; 279bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。



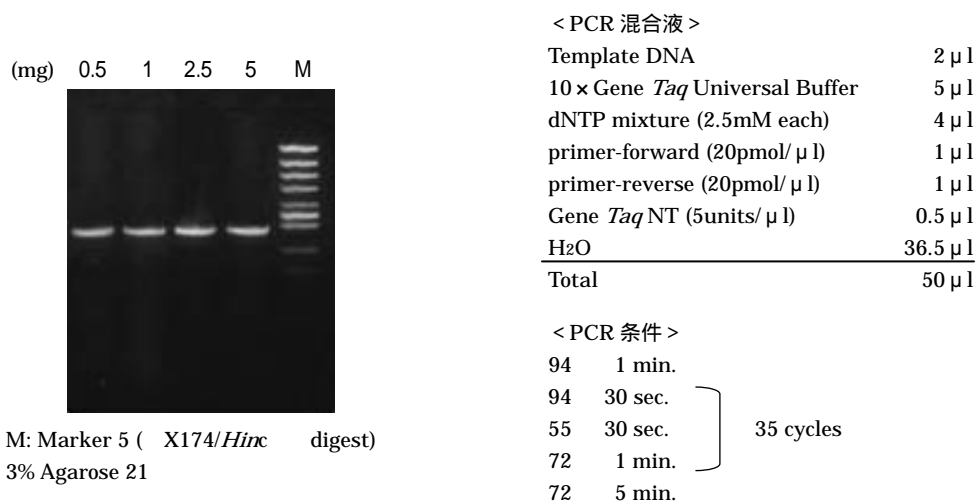
p53 遺伝子の検出

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 (exon 10 ; 279bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。



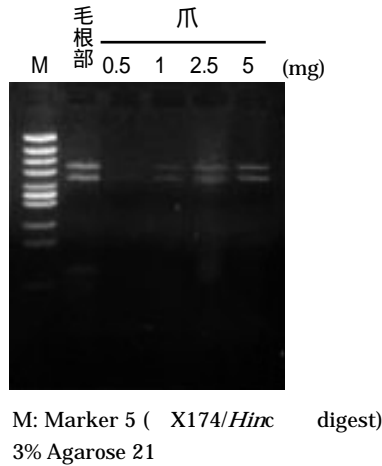
Lane 1: A 爪きりで切った爪をカッターで約 1mm 角に刻んだもの (9.7 mg)
 Lane 2: A 爪きりで切った爪をカッターで約 1mm 角に刻んだもの (26.3 mg)
 Lane 3: A 爪きりで切ったままのもの (34.0 mg)
 Lane 4: B 爪きりで切った爪をカッターで約 1mm 角に刻んだもの (12.5 mg)
 M: Marker 5 (X174/*Hinc* digest), 3% Agarose 21

ISOHAIR を用いて、カッターで約 1mm 角に切った爪 0.5mg、1mg、2.5mg、5mg 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 ; 279bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。



MCT118 型検査

ISOHAIR を用いて、カッターで約 1mm 角に切った爪 0.5mg、1mg、2.5mg、5mg および毛髪の毛根部 1cm より DNA を抽出した。得られた DNA の 1/10 量を使用して、MCT 118 座位を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。



< PCR 混合液 >

Template DNA	2 μ l
10 \times Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
primer-forward (20pmol/ μ l)	1 μ l
primer-reverse (20pmol/ μ l)	1 μ l
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	36.5 μ l
Total	50 μl

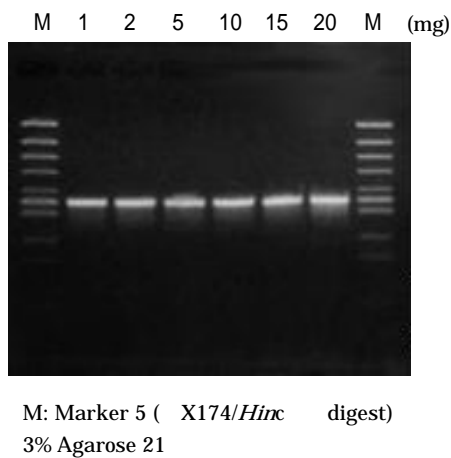
< PCR 条件 >

94	1 min.	} 30 cycles
94	30 sec.	
55	30 sec.	
72	2 min.	

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 (1~20mg) 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 ; 355bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。



< PCR 混合液 >

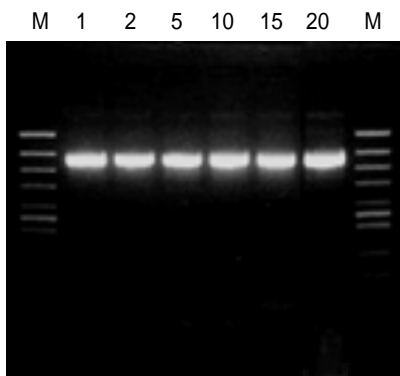
Template DNA	5 μ l
10 \times Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
primer (20pmol each/ μ l)	1 μ l
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	34.5 μ l
Total	50 μl

< PCR 条件 >

98	1 min.	} 35 cycles
98	10 sec.	
55	15 sec.	
72	30 sec.	
72	5 min.	

p53 遺伝子の検出

ISOHAIR を用いて、マウスの体毛 (1~20mg) 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 ; 714bp) 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。



M: Marker 4 (X174/*Hae* digest)
3% Agarose 21

< PCR 混合液 >

Template DNA	
10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μl
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μl
primer (20pmol each/μl)	1 μl
Gene <i>Taq</i> NT (5units/μl)	0.5 μl
H ₂ O	
Total	50 μl

< first PCR 条件 >

98	1 min.	} 30 cycles	*テンプレートは 5 μl を使用した。
98	10 sec.		
60	15 sec.		
72	1 min.		
72	5 min.		
72	5 min.		

< second PCR 条件 >

94	1 min.	} 30 cycles	*first PCR 産物 1 μl をテンプレートとした。
94	10 sec.		
60	15 sec.		
72	1 min.		
72	5 min.		
72	5 min.		

4. マウスの爪を用いた実験例

ミトコンドリア DNA および p53 遺伝子の検出

ISOHAIR を用いて、マウスの指 1 本分 (先端から 1~2mm) 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 ; 355bp) および *p53* 遺伝子 (intron 4 ; 829bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。



Lane 1: ヒトミトコンドリア DNA

Lane 2: *p53* 遺伝子

M: Marker 5 (X174/*Hinc* digest)
3% Agarose 21

< PCR 混合液 >

Template DNA	5 μl
10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μl
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μl
primer (20pmol each/μl)	1 μl
Gene <i>Taq</i> NT (5units/μl)	0.5 μl
H ₂ O	34.5 μl
Total	50 μl

< PCR 条件 >

(ミトコンドリア DNA)	
98	1 min.
98	10 sec.
55	15 sec.
72	30 sec.
72	5 min.
} 35cycles	

< PCR 条件 >

(<i>p53</i> 遺伝子)	
98	1 min.
98	10 sec.
60	15 sec.
72	1 min.
72	5 min.
} 30cycles	

5. ヒト毛髪、爪、口腔粘膜を用いた実験例

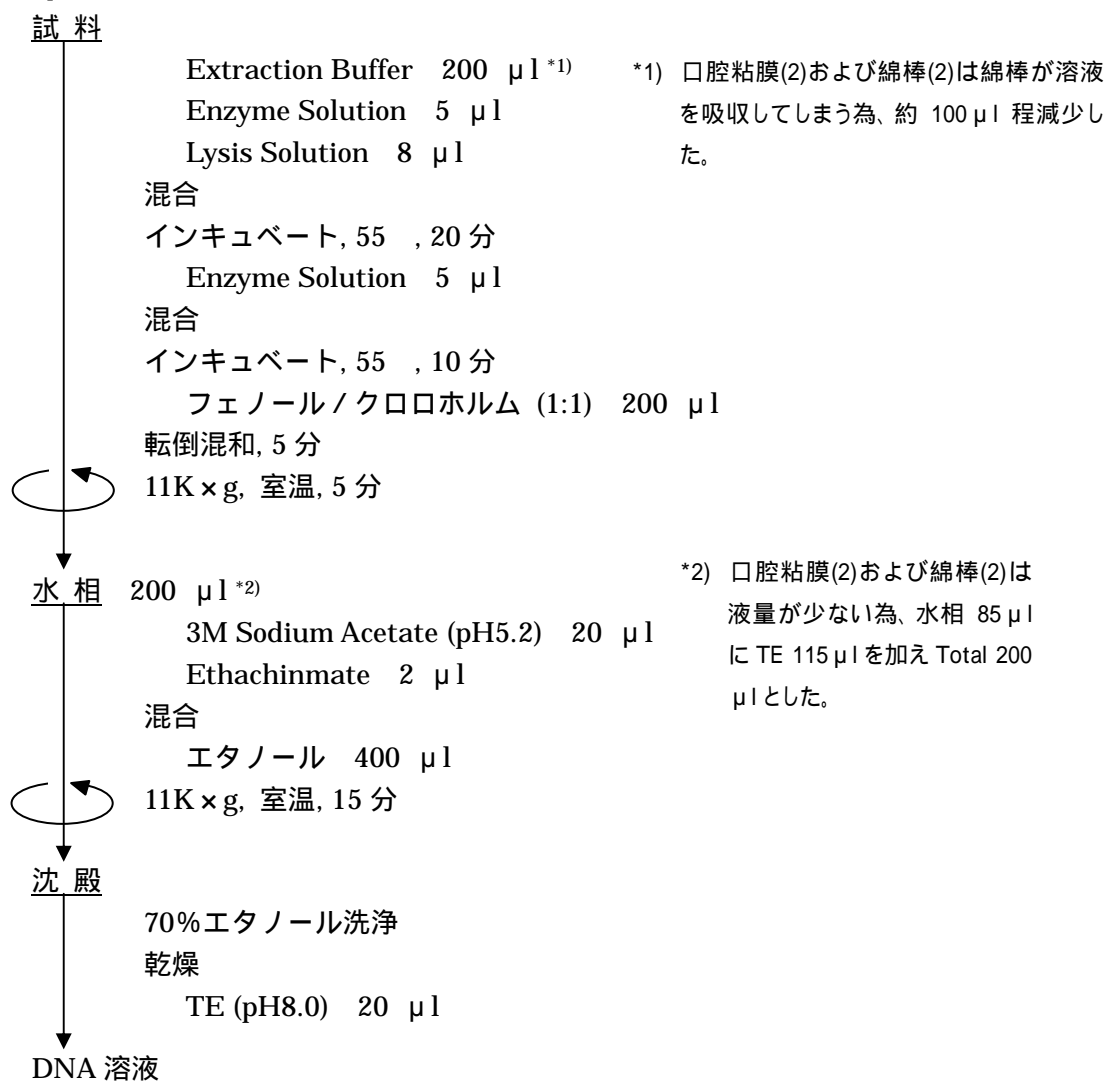
ISOHAIR を用いて、毛根部、爪、口腔粘膜より DNA を抽出した。

口腔粘膜は綿棒で採取し、(1) 1×PBS で懸濁後に遠心分離した沈殿を使用する方法^{*1)}と、(2) Extraction Buffer に直接綿棒を入れて懸濁したものを使用する方法^{*2)}の二通りで試した。

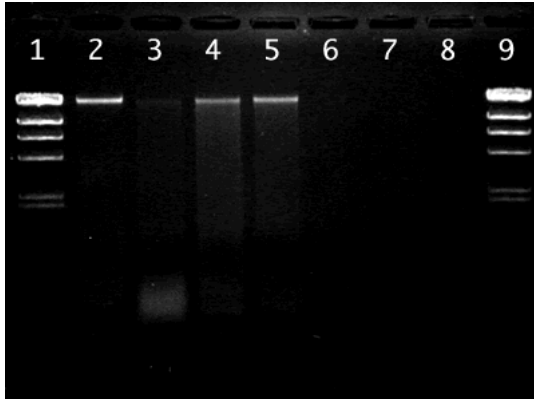
*1) 頬の内側に綿棒をあて、回転させるようにして 15 秒ほど軽くこすって採取後、1×PBS 300 μ l に綿棒を入れて懸濁後、遠心(10,000rpm, 5min.)し、ピペットマンにて、上清を除いた沈殿。(肉眼で確認可能)

*2) 頬の内側に綿棒をあて、回転させるようにして 15 秒ほど軽くこすって採取後、ISOHAIR の Extraction Buffer 200 μ l に直接綿棒を入れて懸濁したもの。

[DNA 抽出]



それぞれの試料から得られた DNA の 1/4 量を使用して電気泳動を行った。



- Lane 1: Marker
- Lane 2: 毛根部 1cm × 3 本
- Lane 3: 爪 1mm 角 × 2 個
- Lane 4: 口腔粘膜 (1)
- Lane 5: 口腔粘膜 (2)
- Lane 6: コントロール：綿棒 (1)
- Lane 7: コントロール：綿棒 (2)
- Lane 8: ネガティブコントロール
- Lane 9: Marker

Marker 1 (*Hind* digest)
0.8% Agarose S

それぞれの試料から得られた DNA 溶液の 1/10 量を使用して、ヒト *p53* 遺伝子 (Exon 10 ; 279bp) を PCR にて増幅し、電気泳動を行った。



Marker 5 (*X174/Hinc* digest)
3% Agarose 21

< PCR 混合液 >

Template DNA	2 μ l
10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μ l
primer-forward (20pmol / μ l)	1 μ l
primer-reverse (20pmol / μ l)	1 μ l
Gene <i>Taq</i> NT (5units / μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	36.5 μ l
Total	50 μl

< PCR 条件 >

94	1 min.	} 35 cycles
94	30 sec.	
55	30 sec.	
72	1 min.	
72	5 min.	

実験例は、ニッポンジーン ホームページでもご紹介しております。

株式会社ニッポンジーン ホームページ <http://www.nippongene.com>