

遺伝子の解析

1. 制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP)
2. ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR)
3. DNA塩基配列の決定 (DNA sequencing)
4. DNA Profiling

1. サザン法

1.1 制限酵素

- 1950's, phage感染に対して抵抗性を示す (phageの生存と複製を「制限」restrictする) 大腸菌 (*Escherichia coli*) 系統の発見。
- Arber (1962), phageDNAだけを切断し、大腸菌の染色体を修飾 (modification) して切断から守る制限酵素 (restriction endonuclease) の発見。
- - Restriction and modification model -, 細菌は特定の塩基配列を認識してDNAを切断する酵素と自身のDNAをメチル化して切断から守る酵素を持つ。
- Smith et al. (1970), 特定のDNA塩基配列のところで切断する制限酵素の発見。

EcoRI

E = genus *Escherichia*

co = species *coli*

R = strain RY13

I = first endonuclease isolated

制限酵素の種類

- Type I: 認識部位から遠く(約1000 bp)離れた所でランダムに切断。
- Type II: 認識部位(大部分は4 bp又は6 bp)で切断。
- Type III: 認識部位の近く特定部位で切断。

Type II

- 認識される塩基配列は回文構造 (palindrome) になっている。
- DNA二重鎖の同じ所 (blunt-ended) で切るものと入れ違い (sticky-ended) に切るものがある。
- 切断DNA断片は認識塩基配列の数に比例して大きくなる。
4 bpなら、平均 $4^4=256$; 6 bpなら、平均 $4^6=4096$

*Hind*II

G	T	Py		Pu	A	C
C	T	Pu		Py	T	G

*Eco*RI

G	A	A	T	T	C
C	T	T	A	A	G

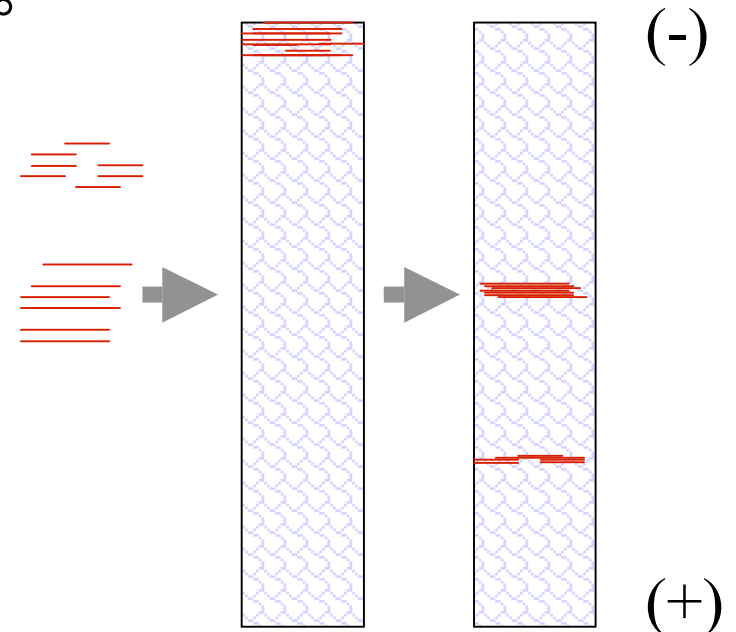
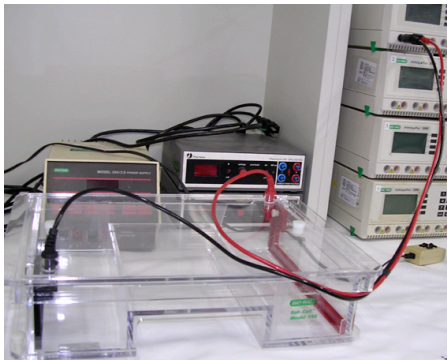
Py: pyrimidine (T, C)

Pu: purine (A, G)

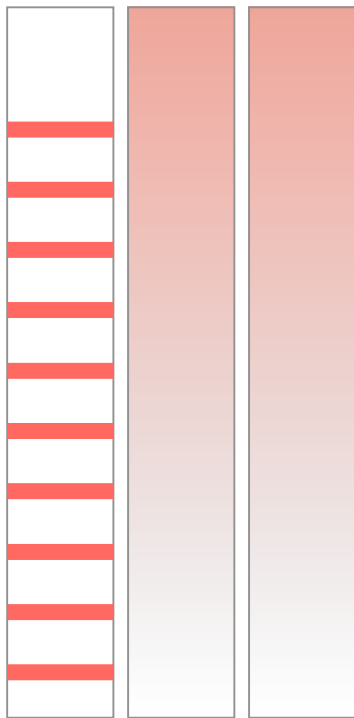
1.2 サザン法

- 全DNAを制限酵素で消化、agarose-gel electrophoresisで分離。
- DNAを一本鎖に変性。
- DNAをnitrocellulose フィルターに固着 (blotting)。
- ^{32}P で標識したプローブDNAを変性し、フィルター上のDNAと結合 (hybridization) させる。
- フィルターをX線フィルムに感光させ (autoradiography) プローブDNAと同じ配列を持つDNA断片を検出。
- 全DNAの構造を研究することができる。

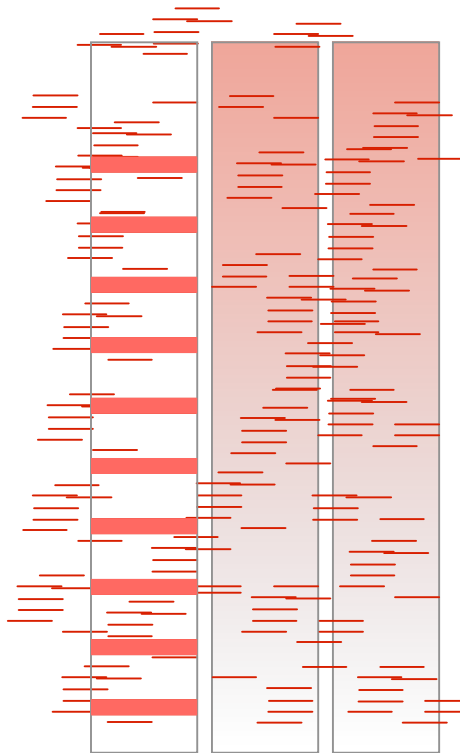
電気泳動法 (electrophoresis)



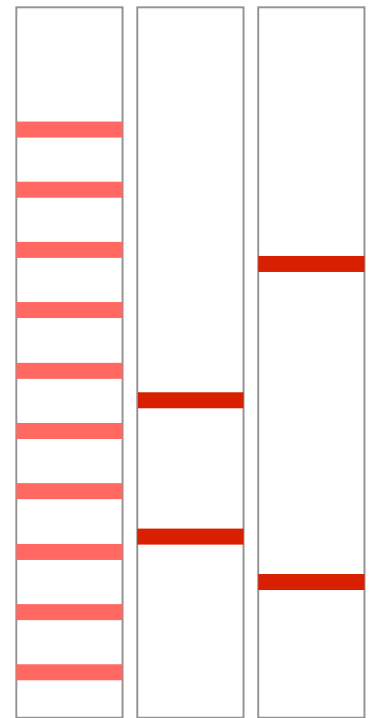
Electrophoresis



Denaturing, Blotting
& hybridization

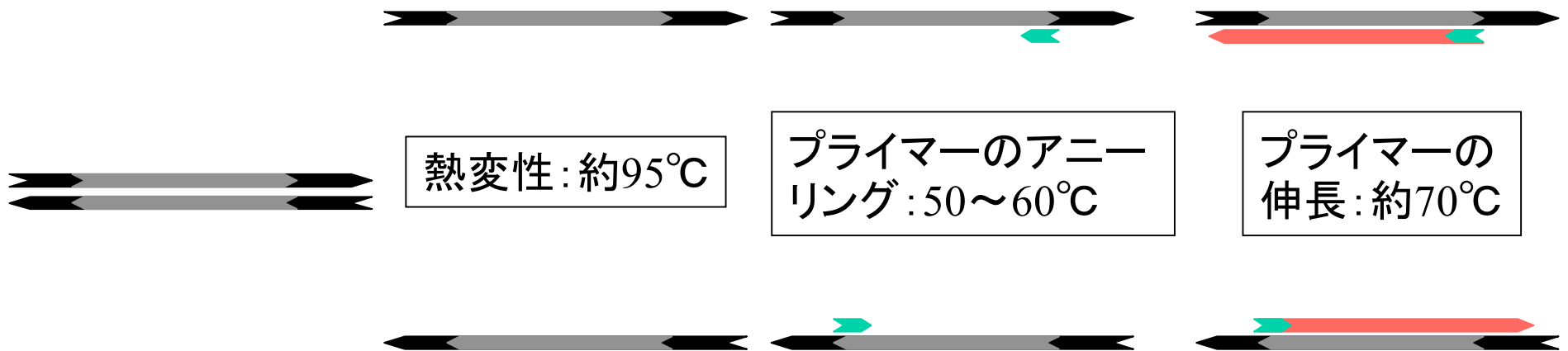


Autoradiography



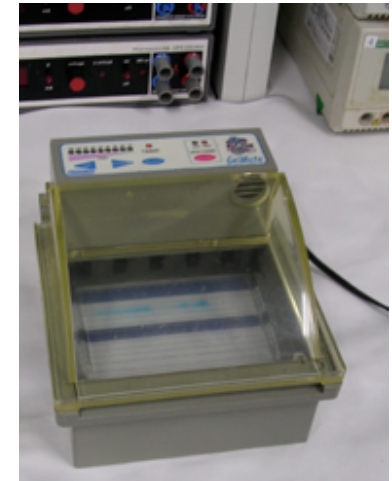
2. ポリメラーゼ連鎖反応

- 任意のDNAの塩基配列を迅速大量に複製できる。
- 目的DNAの始めと終わりの配列を化学合成してプライマーとする。
- DNAの構成成分である4種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸と高温でも作用するDNA合成酵素 (Taq DNA polymerase) を使用してDNA合成反応を行う。





3. ポリメラーゼ連鎖反応

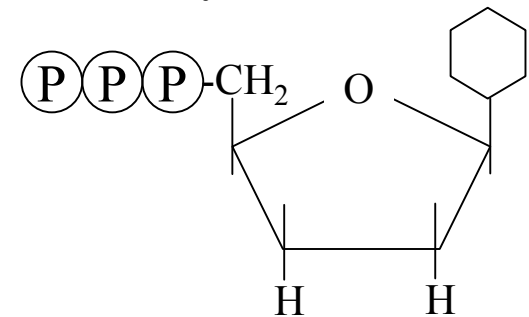


断片	サイクル数 (n)					
	1	2	3	4	5...	11...
短	0	0	2	8	22	2026
中	0	2	4	6	8	20
長	2	2	2	2	2	2
合計 (2^n)	2	4	8	16	32	2048

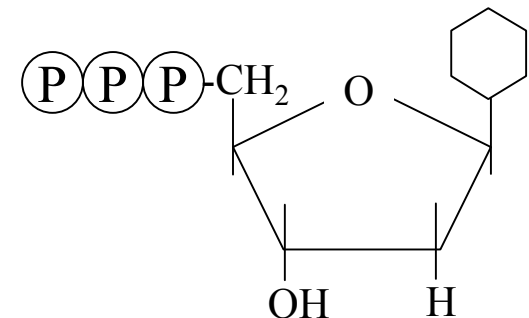
3. DNA 塩基配列決定 (dideoxy sequencing method)

- オリゴヌクレオチドのプライマーを用いてDNA合成を行う。
- ヌクレオチドとして、通常のdNTPとジデオキシリボヌクレオシド三リン酸(ddNTP)を用いる。
- ヌクレオチドのどれか一つは ^{32}P か蛍光で標識する。
- 異なるddNTPが入ったDNA合成反応を4種類行う。
- ddNTPsは合成されるDNAにとりこまれるが、次のヌクレオチドは付加されず、DNA合成は停止する。
- 合成された4種類のDNAを変性し、新たに合成されたDNA鎖を電気泳動で分離する。
- DNAの標識シグナルからddNTPsの取り込まれた位置を明らかにする。

dideoxynucleotide



deoxynucleotide



3' 20 bp CTGCGACGCT 5'

5' 20 bp GACGCTGCGA 3'



3' 20 bp CTGCGACGCT 5'

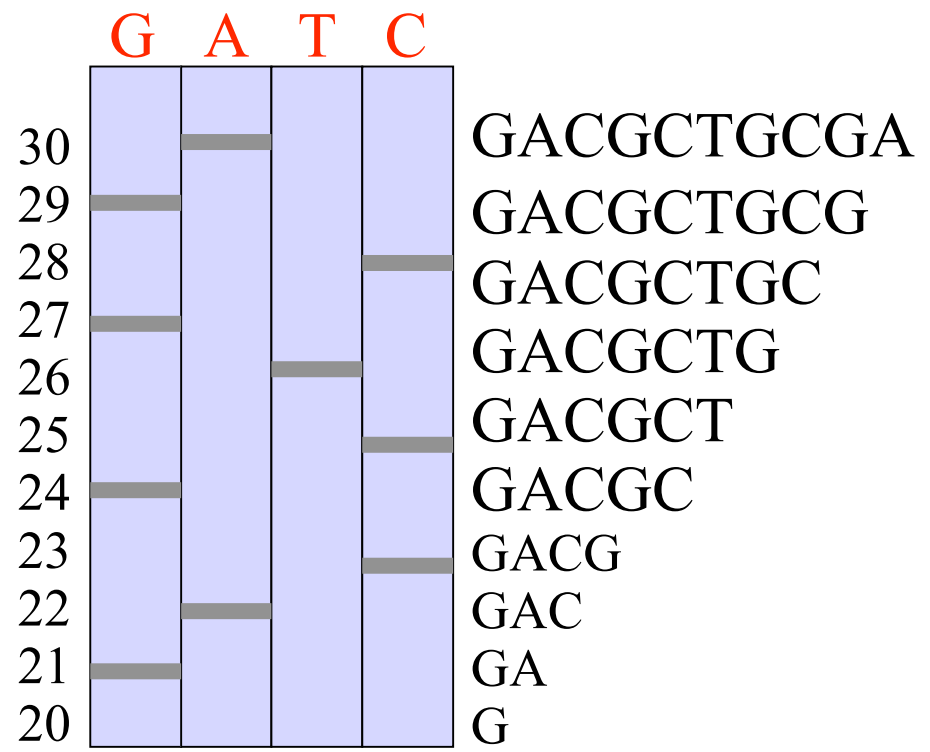
5' 20 bp 3'



PCR (ddG, ddA, ddT, ddC)



DNAを1本鎖にして電気泳動

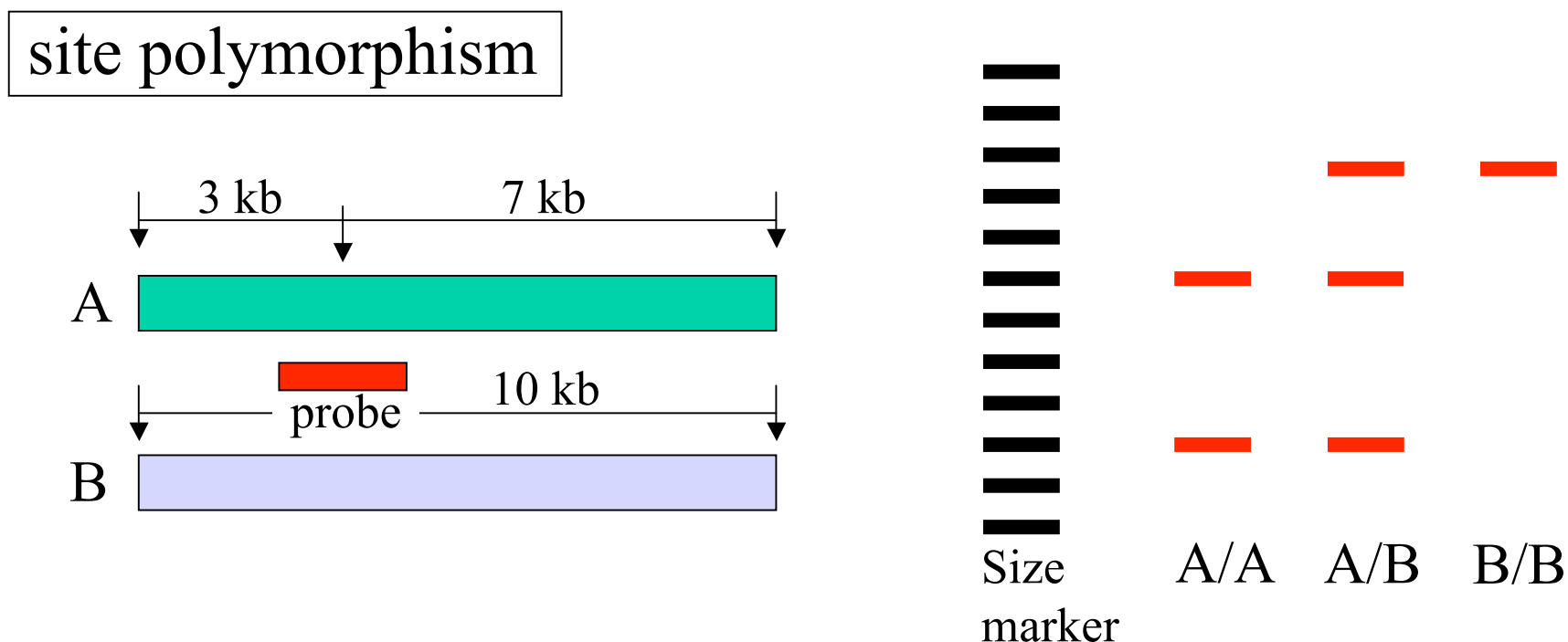


4. DNA Profiling

- ヒトのゲノムには個人間でDNA配列の変異が多数存在する。
- このような変異(DNAマーカー)は親から子にメンデル遺伝をする。
- 遺伝病の原因遺伝子と密接に連鎖しているDNAマーカーを利用して、遺伝病の診断や研究が可能になる。
- ヒト集団内で高い多型を示す複数のDNAマーカーを用いると、親子関係の推定や個人識別が可能になる(DNA fingerprinting)。
- DNAマーカーの検出には、サザン法、PCRが用いられ、究極的には塩基配列の決定が行われる。

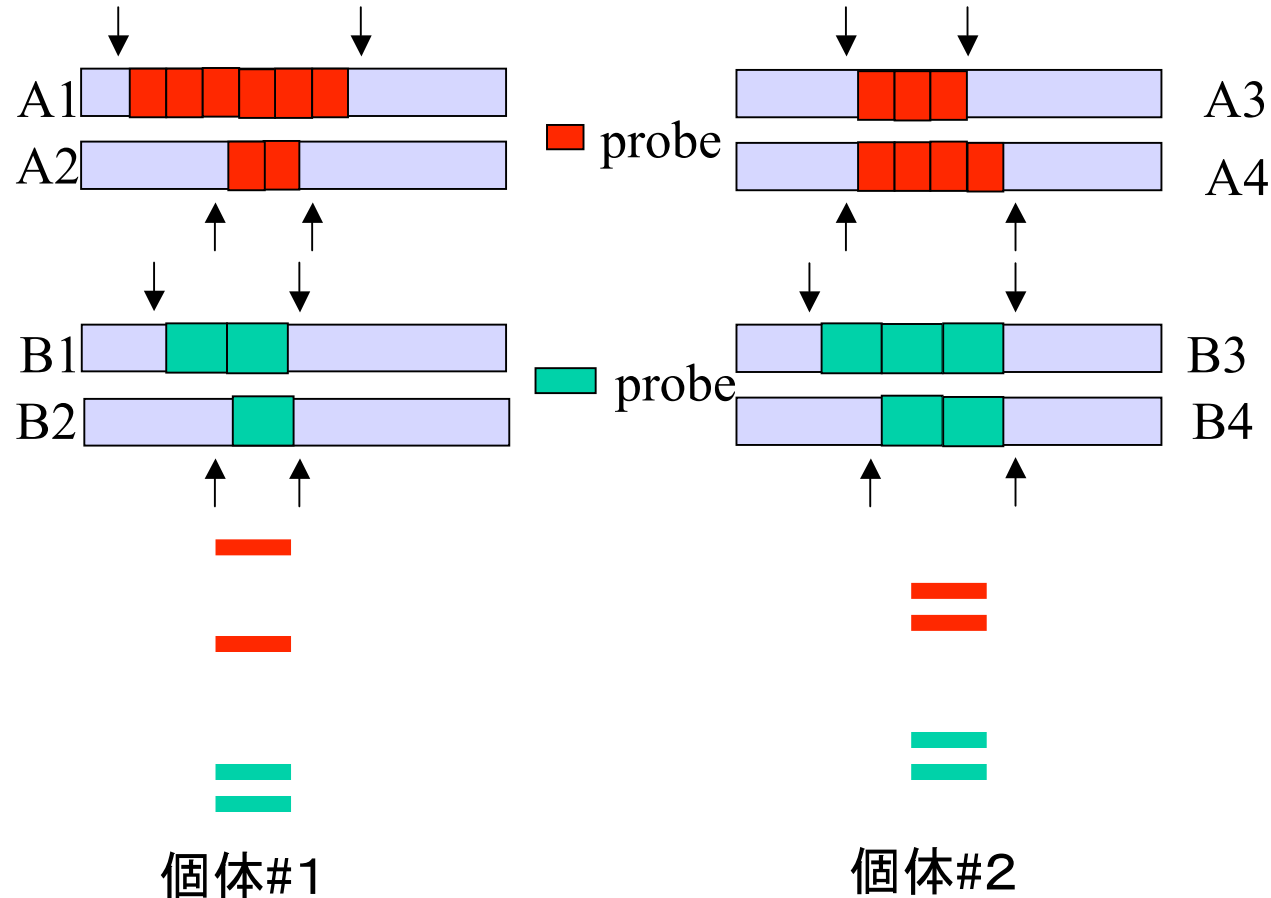
4.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

- 制限酵素の認識配列に違いがあると、その領域をカバーするプローブでサザン解析をするとバンドパターンに違いが見られる。
- そのDNA配列でヘテロの個体には両方のバンドが出現する。
- 制限酵素の制限酵素の認識部位での塩基配列の変化 (site polymorphism) をサザン法で可視化。



4.2 VNTR (VNTR:variable number of tandem repeats)

- ヒトのゲノムには、短い配列がくり返して存在する領域が多くあり、そのくり返し数に個人間で変異がある。
- くり返し領域の外側の変異の無い領域を制限酵素で切断するサザン法やその配列をプライマーにしたPCRで、多型を検出する。



4.3 ミトコンドリアDNAの法医学における利用

- 細胞小器官の一つであるmitochondriaには環状のDNA分子 (Mt DNA) が1000コピー以上存在する。
- Mt DNAの遺伝は厳密に母親からだけである。
- Mt DNAには個人間で変異の高い二つの領域がある。
Hypervariable Region I (HV1): ca. 342 bp
Hypervariable Region II (HV2): ca. 268 bp
- Mt DNA は髪の毛、骨、歯からでも抽出できる。
- Mt DNAをPCRにより増幅する。
- この領域、約 610 bp の配列を読み、標準のものと比較する。

Mitochondrial DNA Analysis at the FBI Laboratory

