

DNAポリメラーゼの応用

1. 塩基配列の決定 (遺伝情報本体)

3' GGACATGAGCT 5'
CC T GTA^{dd}

溶液に入す

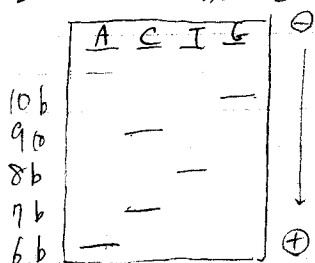
- ① プライマーの連結 (一本鎖DNA)
- ② DNAポリメラーゼの付加
- ③ dATP, dCTP, dGTP, dTTP + ddATP (化学修飾) → 伸長反応が停止する
- ④ ③と同様の操作で ddCTP, ddGTP, ddTTP で別々に行う

GGACATGAGCT
CCT

CCT GTA^{dd} ← ddATP 6b
CCT GTAC^{dd} ← ddCTP 7b
CCT GTACT^{dd} ← ddTTP 8b
CCT GTACTCG^{dd} ← ddGTP 10b

32Pで標識する

② 二本鎖の溶液で電気泳動にかける



④ 小さなほど 強く移動する

二本鎖の下からいくと塩基配列がわかる!

A + C + T → C T G

以上が「A」の例示法

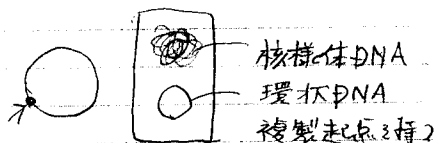
1970年 10コあるが1年

1985年 1日

現在 数100/1日時間

2. 遺伝子クローニング

必須アイテム ① プラスミドDNA



② 制限酵素 (ハサミ)

5' GAATTC 3' EcoRI

CTTAAG

6' AAGCTT 3' HndIII

TTCCAA

様々な塩基配列を認識して切断する

制限酵素を覚える

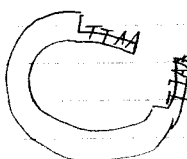
③ DNAリガー (縫い針)

手順

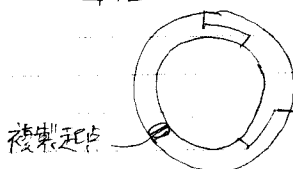
① DNA → EcoRIで消化 (切断)



プラスミドDNAをEcoRIで消化



② DNA断片とプラスミドをDNAリガーで連結



③ 大腸菌に導入 → 大量培養 → DNAを抽出

※ Bera SV40 (ハチカシウイルス) DNA

→ 大腸菌で増やそうとした

→ SV40が「生きている」状態

→ 危険!

毒性のあるDNAのクローニングの法的規制

→ DNA組換え実験の規制、隔離施設