

非放射性プローブを用いた体細胞雑種の解析

大河原敏文*

1. はじめに

体細胞雑種の核や細胞質遺伝子の構成解析には、現在放射性同位元素で標識した核酸をプローブとして解析する方法が広く行われている。この方法は、フラクシオン I 蛋白質などを用いる方法と比較して、感度が高く、また直接遺伝子を解析するため確実であるという利点がある。しかし放射性同位元素は、よく用いられる ^{32}P の場合、長期保存が効かず、また、取扱は RI 使用設備で行わなければならないなどの欠点がある。

近年、ビオチンで標識された核酸をプローブとして DNA や RNA を検出する方法が開発された。ビオチンで標識したプローブは、少なくとも数か月は保存できるため毎回作成する必要がなく、また、オートラジオグラフィの必要がないため、時間的にも経済的にも有利である。核酸をビオチンで標識する方法には、ビオチン化ヌクレオチドをニックトランスレーションなどによって核酸に取り込ませる方法¹⁾と、フォトビオチンを光により核酸に結合させる方法²⁾などがある。ビオチン化ヌクレオチドを用いる方法は、放射性プローブを用いる場合と同一の条件で 2 本鎖 DNA を標識することができる。また、フォトビオチンを用いると 1 本鎖や 2 本鎖の DNA や RNA を容易に標識することができる。

体細胞雑種の核の雑種性の証明には、rRNA 遺伝子の解析が用いられるようになってきたが³⁻⁶⁾、筆者らは最近では、非放射性プローブを用いた解析を行っている^{7,8)}。これらのうち本稿では、フォトビオチンにより標識した rRNA をプローブとして、体細胞雑種の核の雑種性を証明する方法について具体的に解説していきたい。

2. 全 DNA の調製

植物組織からの全 DNA の調製法には、少量の材料で判定を可能にするため、Rogers らの臭化ヘキサデシ

ルトリメチルアンモニウム (CTAB) を用いた方法⁹⁾を用いている。液体窒素で凍結し、乳鉢で粉碎した植物組織から 2 時間程度で制限酵素で切断可能な DNA を調製できる。DNA の収量は、RNase A で処理後、プラスチックラップ法¹⁰⁾により測定する。カンキツの葉を材料とした場合、新鮮重 1 g から約 10 μg の DNA が得られる。

3. 核 rRNA の調製

核 rRNA の調製には、Laulhere らの 1 段階抽出法¹¹⁾を用い、材料には、葉緑体 rRNA の混入を減らすため根を用いている。調製した粗核 rRNA は、ショ糖密度勾配遠心に 2 回かけ精製し、17 S と 25 S のピークをとり、これらを熱変性させ、一本鎖 rRNA の断片とする¹²⁾。

4. ビオチン標識プローブの作成

フォトビオチンは、ビオチニル基と光で活性化される基がリンカーにより結合された構造をしている(第 1 図)。市販されているフォトビオチンラベリングシステム (BRL, コスモ・バイオ扱い) を用いて、rRNA の標識を行うことができる。

(1) 25 S+17 S rRNA 2 μl (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) とフォトビオチン 2 μl (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を混合し、氷中で水銀ランプにより 20 分 光を照射する。

(2) TE buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.0 mM EDTA) を加え 100 μl とし、2 回ブタノールで抽出する。

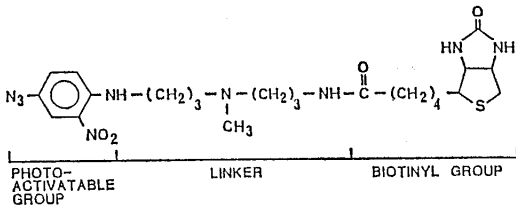
(3) キャリヤーとして変性させたイースト tRNA を 40 μl (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 加え、エタノール沈殿させ、50 μl の 0.1 mM EDTA に溶解する。

5. サザンブロッティング

DNA をトランスファーするフィルターには、ニトロセルロースフィルターやナイロンメンブランを使用することができる。ナイロンメンブランの場合は、エレクトロブロッティングも可能であるが、バックグラウンドが高くなる傾向がある。ニトロセルロースフィルターは破れやすいため、筆者らは、ポリエステルで補強されたも

* Toshifumi OHGAWARA: Analysis of Somatic Hybrids Using Non-radioactive Hybridization Probes.

キッコーマン株式会社研究本部 (〒278 野田市野田 399) Research & Development Division, Kikkoman Corporation (399 Noda, Noda 278)



第1図 フォトビオチンの構造

の (MSI NitroPlus 2000, フナコシ扱い) を使用している。

(1) DNA 2.5 μg を適当な制限酵素で切断し, 0.8% のアガロースゲル (20 cm \times 15 cm \times 0.4 cm) を用いて 30 V で 15 時間, 電気泳動を行う。

(2) 定法¹³⁾にしたがって, ニトロセルロースフィルターにトランスファーを行った後, 6 \times SSC (1 \times SSC; 150 mM NaCl, 15 mM Na-citrate) で洗浄する。

(3) 80 $^{\circ}\text{C}$ オープンで 2 時間加熱する。

6. ハイブリダイゼーション

ビオチンと結合するアビジンは, 等電点が 10.5 で非特異的吸着が起こりやすい¹⁴⁾。筆者らは, 中性付近の等電点を持つストレプトアビジンを用いたブルージン非放射線核酸検出システム (BRL) を使用している。

(1) フィルター (100 cm²) に対して 5 ml のハイブリダイゼーション溶液 (第1表) をポリエステル/ポリエチレン袋 (BRL Hybridization Bag) に封入し, 40 $^{\circ}\text{C}$ で 1 晩反応させる。

(2) フィルターを袋から出し, 250 ml の 50% ホルムアミド-5 \times SSC で 20 分ごと 4 回, 次に 2 \times SSC で 20 分ゆっくり振盪しながら洗浄する。

(3) フィルターと 5 ml の 3% (w/v) BSA を含む

第1表 ハイブリダイゼーション溶液の組成 (5 ml/100 cm² フィルター)

ホルムアミド ^a	2.5 ml
20 \times SSC ^b	1.25 ml
H ₂ O ^c	1.25 ml
プローブ rRNA (400 ng)	10 μl ^d

^a 使用直前に, 500 ml のホルムアミドに 30 g のイオン交換樹脂 (Bio-Rad AG 501-X8, 20 \sim 50 mesh) を加え, 30 分時々攪拌し, 2 回濾紙で濾過する。

^b 0.45 μm のニトロセルロースフィルターを通し, オートクレーブにかける。

^c オートクレーブにかける。

^d 40 μg のイースト tRNA を含む。添加直前に 95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分加熱後 0 $^{\circ}\text{C}$ に急冷する。

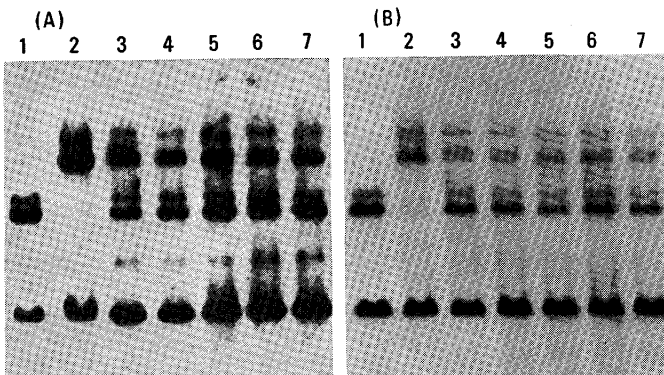
Buffer 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl) を袋に入れ, シールし 65 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分反応させる (ブロッキング)。

(4) BSA 溶液を除き, 7 ml のストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (SA-AP) 複合体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Buffer 1) を加え, 室温で 10 分反応させる。

(5) フィルターを, 250 ml の Buffer 1 で 15 分 2 回, 250 ml の Buffer 2 (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂) で 10 分洗浄する。

(6) フィルターを新しい袋に移し, 下記の基質を加え, 暗所で約 3 時間反応させる。

基質: 使用直前に, 7.5 ml の Buffer 2 に 33 μl のニトロブルー-テトラゾリウム (NBT) 液 (75 mg NBT を 70% ジメチルホルムアミドに溶かしたもの) を加え穏やかに混合した後, 25 μl の 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルりん酸 (BCIP) 液 (50 mg BCIP を 1 ml ジメチルホルムアミドに溶かしたもの) を加えて穏やかに混合したもの



第2図 体細胞雑种植物の rRNA 遺伝子の解析例
A は ³²P 標識プローブを用いた場合, B はビオチン標識プローブを用いた場合を示す。1: オレンジ, 2: カラタチ, 3~7: 体細胞雑种植物。

(7) フィルターを取り出し反応停止液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA) で 10 分洗浄し, さらに水で 10 分洗浄する. 濾紙にはさんで乾燥させ, 袋に入れシールして保存する.

第 2 図は, オレンジとカラタチの体細胞雑種の解析において, ^{32}P 標識プローブを用いた場合とビオチン標識プローブを用いた場合を比較したものである. ビオチン標識プローブを用いた場合は, ほとんどバックグラウンドを生じず, またバンドもシャープで ^{32}P 標識プローブを用いた場合には重なってしまうような近接したバンドでも識別することができる. 検出感度も ^{32}P を用いた場合とほぼ同程度であり, 安定している.

7. おわりに

非放射性プローブを用いた rRNA 遺伝子の解析法は, 容易に体細胞雑種を判定できる方法として, 今後広く用いられるようになると考えられる. また, 非放射性プローブを用いると近接したバンドも解析しやすいため, 体細胞雑種等の分子レベルにおける変異を解析する上でも有効であると考えられる.

(1988年10月26日受理)

文 献

- 1) Langer, P. R., A. A. Waldrop, D. C. Ward, 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6633.
- 2) Forster, A. C., J. L. McInnes, D. C. Skingle, R. H. Symons, 1985. *Nucleic Acids Res.*, **13**:

- 745.
- 3) Uchimiya, H., T. Ohgawara, H. Kato, T. Akiyama, H. Harada, M. Sugiura, 1983. *Theor. Appl. Genet.*, **64**: 117.
- 4) Ohgawara, T., S. Kobayashi, E. Ohgawara, H. Uchimiya, S. Ishii, 1985. *Theor. Appl. Genet.*, **71**: 1.
- 5) Ozias-Akins, P., R. J. Ferl, I. K. Vasil, 1986. *Mol. Gen. Genet.*, **203**: 365.
- 6) 佐野 浩, 鈴木芳夫, 大野清春, 1988. *植物組織培養*, **5**: 15.
- 7) Kobayashi, S., T. Ohgawara, E. Ohgawara, I. Oiyama, S. Ishii, 1988. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **14**: 63.
- 8) 大河原敏文, 小川省蔵, 大河原依久子, 生山 巖, 石井茂孝, 1987. *日本植物組織培養学会第 10 回植物組織培養シンポジウム講演要旨集*, p. 172.
- 9) Rogers, S. O., A. J. Bendich, 1985. *Plant Mol. Biol.*, **5**: 69.
- 10) Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook, 1982. In "Molecular Cloning," Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 11) Laulhere, J. P., C. Rozier, 1976. *Plant Sci. Lett.*, **6**: 237.
- 12) Oono, K., M. Sugiura, 1980. *Chromosoma*, **76**: 85.
- 13) 口野嘉幸, 平井久丸, 櫻林郁之介, 1987. *遺伝子・蛋白質 実験操作プロットィング法*, ソフトサイエンス社, 東京.
- 14) 藤多和信, 渡辺 格, 大野典也, 1985. *細胞工学*, **4**: 893.