

## 核酸を検出したい

### 使用製品

#### ○ハイブリダイゼーション法

・ Agarose - I	[A003]	・ 10x TBE	[MB04]
・ Agarose - II	[A004]	・ 20x SSC	[MB06]
・ Agarose - III	[A005]	・ -CellStain®- EB	[E262]
・ 0.5M EDTA	[MB01]	・ -CellStain®- EB solution	[E272]
・ 10x MESA	[MB02]		

#### ○ DNA プローブ作製

・ FITC - I	[F007]	・ Biotin-AC <sub>5</sub> -OSu	[B305]
・ WSC	[W001]	・ MES	[GB12]
・ Sulforhodamine 101 acid chloride	[S016]	・ N,N-Dimethylformamide,(Lu)	[LU07]

### I はじめに

これまでに目的に合わせて数多くの核酸分析法が開発されてきた<sup>1,2)</sup>。目的塩基配列をもった遺伝子の分析、目的の核酸フラグメントのベクターへの導入チェック、DNA、RNAの塩基配列分析、遺伝子の発現に関わる領域の分析、変異を起こしている塩基の分析や、遺伝子変異と臨床形態の関係が明らかになるにつれて遺伝子分析の臨床的意義が増大したことから、各種ハイブリダイゼーション法<sup>3)</sup>や、塩基配列解析法<sup>4,5)</sup>、その他各種のアッセイ法が用いられるようになってきた。核酸に係わる研究開発により、必要な酵素や装置が容易に入手できるようになって、1980年代前半までに核酸分析の手法はほぼ確立したものとなった。それ以降も遺伝子増幅法(PCR)<sup>6,7)</sup>や自動塩基配列解析法<sup>8-14)</sup>の開発などが進められてきたが、大きな進歩は装置の開発によるところが大きい。これまで高感度に目的遺伝子を検出するために、核酸分析には放射性同位元素である<sup>32</sup>Pや<sup>35</sup>Sが用いられてきた。その取り扱いが制限されていることもあって、放射性同位元素に代わる標識法が強く求められるようになってきた。塩基配列解析では、多くの自動シーケンサーにより同時に多検体を測定できるようになり、解析速度が飛躍的に向上し、それによってヒトの全遺伝子解析をおこなうヒトゲノム解析プロジェクトも進められてきた。これには各種の蛍光標識剤が放射性同位元素の代わりに用いられていた。

ここでは、目的に応じた分析方法毎にその概要を述べ、その分析に用いられる試薬を説明する。核酸分析に用いる溶液は、目的に応じてDNase、RNase 活性がない状態にする必要があり、一般にオートクレーブ処理を行うことが要求される。

#### 1. ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションにも数多くの手法がある。基本的には目的塩基配列を持つ核酸の検出であるので、一般にプローブが用いられる。プローブは目的塩基配列と相補的な塩基配列を持つDNA、RNAフラグメントで通常10から20塩基数のオリゴマーであり、多くはDNAシンセサイザーを用いた合成的手法によって得られる。また、生体サンプルから取り出してきたDNAを用いることもある。通常、<sup>32</sup>Pによる放射性同位元素標識体として用いられる。一般に、プロットングと呼ばれる操作によりニトロセルロースフィルターやナイロンメンブレンにDNAあるいはRNAを転写したあとで、フィルター上で目的DNAやRNAを含むフラグメントを検出する。対象によりコロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーションのように目的DNAを含むベクターの検出を行なう方法や、サザン法と呼ばれるDNA電気泳動後の目的DNA断片を検出する方法や、ノーザン法と呼ばれるRNA(特にmRNA)の検出を行う方法もある。目的遺伝子の量を測定するためにドットプロットング法も用いられている。また、mRNAの組織

での発現を観察したり、染色体上の遺伝子の位置を決定したりするために、*in situ hybridization* が盛んに行われている。また、<sup>32</sup>P標識の代わりに蛍光標識したプローブを用いて行うFluorescence *in situ hybridization*(FISH)法<sup>15-17)</sup>が報告されている。

プローブはこれまで<sup>32</sup>P標識がほとんどであったが、近年、使用に制限がない蛍光や発光、酵素あるいはビオチンによる標識体が用いられるようになった。検出法もX線フィルム以外に、ホトマルによる画像としての取込みが可能になり、装置の発展に伴って高感度に目的の核酸を検出できるようになってきた。オリゴマーを用いる場合には、5'末端へアミノ基を導入したオリゴマーを合成し、そのアミノ基をフルオレセインラベル化剤[FITC-I(Code: F007)]、ローダミンラベル化剤[Sulforhodamine 101 acid chloride(Code: S016)]あるいはビオチンラベル化剤で標識してプローブとする。また、末端をスルフヒドリル基に変換することも可能であるので、スルフヒドリル基と反応性のラベル化剤も使用できる<sup>18)</sup>。蛍光色素をプローブの標識に用いるメリットとして異なる蛍光プローブにより二重染色が可能であることが挙げられる。

また、ビオチン[Biotin-OSu(Code: B304)、Biotin-AC<sub>5</sub>-OSu(Code: B305)、Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub>-OSu(Code: B306)、Biotin Sulfo-OSu(Code: B319)、Biotin-AC<sub>5</sub> Sulfo-OSu(Code: B320)、Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu(Code: B321)]を用いる場合は、同様に末端アミノ基に標識し、ハイブリダイゼーションののち、酵素あるいは蛍光標識アビジンと結合させ、酵素基質による発色検出や蛍光検出を行うことができる<sup>19, 20)</sup>。スルフヒドリル基を導入した核酸の場合は、スルフヒドリル基に対するビオチン標識剤[Biotin-PE-maleimide(Code: B592)、Biotin-PEAC<sub>5</sub>-maleimide(Code: B299)]も用いられる。現在、酵素標識アビジンに用いられている標識酵素は、ペルオキシダーゼかアルカリホスファターゼである。一般に、アルカリホスファターゼの方が検出感度は高い。ペルオキシダーゼの基質としてはDAB(3,3'-Diaminobenzidine → Code: D006)やルミノール(Luminol、Isoluminol)が用いられており、最近では、HPPA(4-Hydroxyphenylpropionic acid)やPOD-3(4-(4-Hydroxyphenylcarbamoyl)butanoic acid)<sup>21)</sup>が蛍光基質として用いられた報告もある。ビオチン以外にジゴキシゲニン標識剤も用いられている<sup>22)</sup>。

生物サンプルから取り出してきたオリゴマーへの標識は、蛍光標識あるいはビオチン標識したモノマー(NTP)をニックトランスレーションやランダムプライマーにより導入する方法で行われる。また、グルタルアルデヒドなどの架橋剤を用いて、酵素を直接標識したりビオチン[Biotin-hydrazide(Code: B303)、Biotin-AC<sub>5</sub>-hydrazide(Code: B302)、Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub>-hydrazide(Code: B301)]を標識しプローブとする報告<sup>23,24)</sup>もあ

る。さらに、アジド基を持つフォトビオチンによる標識も行われている<sup>25)</sup>。

## 2. 塩基配列解析

新規な塩基配列の解析は現在、ほとんど自動 DNA シーケンサーで行われており、ジデオキシ法が用いられている。通常、蛍光標識した合成オリゴマーを用いて各ジデオキシヌクレオチドで反応をストップさせたのち、電気泳動で分離したフラグメントをレーザーで検出するものである。それぞれの塩基に異なる蛍光体を対応させたシステムは 1 レーンで 4 種塩基の同時検出が可能であるため、処理速度が速いというメリットがある。逆に、異なる蛍光体を用いていることで泳動距離が変り、塩基の分離ができないフラグメントがでてくるのが問題であり、そのため、同一の蛍光体で標識し、放射性標識の場合と同様に 4 レーンを用いているシステムもある。用いられている蛍光体は、フルオレセイン系色素、ローダミン系色素、キサンテン系色素などである。また、3' 末端に導入されるジデオキシヌクレオチドに蛍光標識し、フラグメントに蛍光体を導入する方法も用いられている。その際に用いられる試薬は DNA ポリメラーゼの基質となることが要求されるため、ジデオキシ NTP に特定のスペーサーを介して蛍光体を導入した化合物が用いられる。ここでは、蛍光性 DNA プローブの作製方法について説明する。

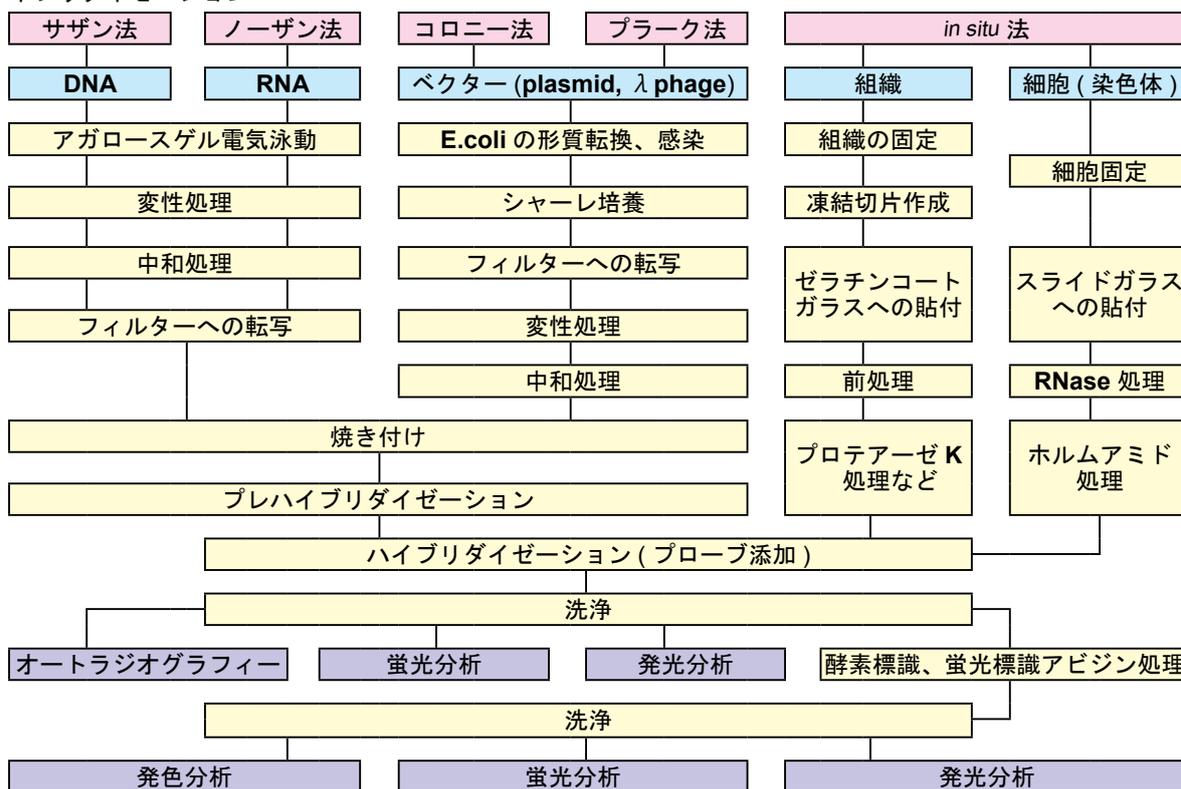
## II ハイブリダイゼーション法

### 1. サザンブロッティング

#### (1) 原理

DNA を制限酵素処理したのちアガロース電気泳動にかけ、分離した DNA フラグメントをニトロセルロースフィルターに転写し、標識プローブを用いて目的塩基配列を含むフラグメントを検出する方法。ここでは、<sup>32</sup>P 標識プローブを用いた検出操作を述べる。ピオチン標識 DNA プローブを用いる場合は酵素標識アビジン処理を行ったのち、発色検出することが必要となる<sup>26-29)</sup>。

#### ハイブリダイゼーション



### (2) 試薬

#### 電気泳動用

- アガロース (Code: A003 ~ A005)
- 泳動用バッファー (10x TBE:0.89 mol/l Tris, 0.89 mol/l boric acid, 20 mmol/l EDTA, pH8.3)(Code: MB04)
- 色素マーカー (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol)
- EB(Code: E262, E272)
- DNA マーカー ( $\lambda$  / Hind III digested)

#### サザンブロッティング用

- 変性用バッファー (1.5 mol/l NaCl, 0.5 mol/l NaOH)
- 中性バッファー (1.5 mol/l NaCl, 1 mol/l Tris, pH8.0)
- 20x SSC(3.0 mol/l NaCl, 0.3 mol/l sodium citrate)(Code: MB06)

#### ハイブリダイゼーション用

- 20x SSC(3.0 mol/l NaCl, 0.3 mol/l sodium citrate)
- 5 wt% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液 (SDS)
- 50x Denhardt's(1 wt% Ficoll, 1 wt% polyvinylpyrrolid-one, 1 wt% BSA)
- 1 mg/ml サケ精子 DNA 水溶液 (ssDNA)
- 0.5 mol/l EDTA, pH8.0(Code: MB01)
- 標識プローブ (DNA probe)

#### 洗浄用

- 20x SSC(3.0 mol/l NaCl, 0.3 mol/l sodium citrate) (Code:MB06) pH:7 ~ 7.5
- 5 wt% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液 (SDS)

#### (3) 消耗品

- ニトロセルロースフィルター、パストールピペット、エペンドルフチューブ (オートクレーブ済)、ヒートシールバッグ

#### (4) 装置

- 電気泳動装置一式 (泳動槽 電源 電源コード)
- ゲル写真撮影装置一式 (トランスイルミネーター、インスタント写真撮影装置)、恒温槽、シーラー (ヒートシールバッグ用)

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

(5) 操作  
電気泳動

- 1) アガロースを 1x TBE に加温溶解する。
  - ・アガロースの粒子が完全に溶解していることを確認する。
  - ・突沸することがあるので十分に攪拌しながら溶解する。
- 2) 液温が 60°C 程度に下がったのち、エチジウムブロマイド溶液を 0.5 µg/ml になるように加える。
- 3) ゲルを成型する容器の両端に紙テープを貼り、アガロース溶液を入れた際に漏れないようにパスツールピペットで紙テープと容器の境目をアガロース溶液でシールする。
- 4) コームをセットし、シールが固化したらアガロース溶液を流し込む。
- 5) 十分固化したことを確認したのちコームを静かに引き抜き紙テープを剥がす。
  - ・この時強くコームを引くとウェルの底が抜けたりウェルが壊れたりするので注意を要する。
- 6) 0.5 µg/ml の EB を含む 1x TBE を容器に注ぎゲルを置く。ウェルをパスツールピペットを用いてバッファーでよく洗浄する。
- 7) 0.1~1 µg の DNA を含む溶液 10 µl 程度に 1 µl の色素マーカーを加え、よく混和したのちマイクロピペットを用いてウェルに入れる。
  - ・移動距離が異なることがあるので、できればウェルは両側二つを避ける。
  - ・マイクロピペットのチップはウェルの真上に置き、ゆっくりと DNA 溶液を押し出すと溶液はウェルの底へ沈む。
  - ・分析する DNA フラグメントのサイズに応じたマーカーを用いる。マーカーとしては *Hind III* で切断した λ ファージ (λ/*Hind III* digested) がよく用いられる。
- 8) 定電圧で一定時間泳動したのち、トランスイルミネーターで DNA のバンドを観察する。赤色フィルターを用いて EB 染色されたバンドを写真撮影する。
  - ・最後にエチジウムブロマイド染色する場合は、泳動後のゲルを 0.5 µg/ml の EB 溶液 (1x TBE または水) に 45~50 分間浸したのち観察する。蛍光のバックグラウンドが高く低濃度の DNA フラグメントが観察できない場合は、ゲルを 1 mmol/l の硫酸マグネシウム水溶液に 1 時間浸す。
- 9) DNA のバンドに合わせてアガロースゲルを長方形に切りだす。ゲルの方向が分かるように一か所だけ角を落とす。
- 10) 切り出したゲルを変性用バッファーに 1 時間浸す。
  - ・DNA 鎖長が 15 kb 以上の場合には、始めに 0.25 mol/l 塩酸水溶液に 10 分浸し切断する。
  - ・長すぎると短鎖フラグメントとなりニトロセルロースフィルターへの付着率が低下するので注意する。
- 11) 次にゲルを中性バッファーに 1 時間浸す。
- 12) トレイに素焼の板の上部が液面から数 mm 出るように 10x SSC を入れ、ワットマン 3MM ペーパーを素焼の板の形に切って載せる。
  - ・または 10x SSC を入れたトレイにガラス板を渡し、ワットマン 3MM ペーパーを敷き、ペーパーの両端が 10x SSC に浸るようにする。
- 13) アガロースゲルをワットマン 3MM ペーパーの中央に載せる。
  - ・気泡が入らないように注意する。
- 14) ラップをアガロースゲルの部分を除いてトレイにかぶせる。バッファーの蒸発を防ぐためと、バッファーがゲルを通らずに吸い上げられるのを防ぐためである。
- 15) アガロースゲルの大きさに切ったニトロセルロースフィルターを 2x SSC に浮かべ、十分に浸透したのち底に沈めて数分間静置する。
  - ・バッファーが浸透しなくなるのでニトロセルロースフィ

ルターは素手でさわらないように注意する。

- ・ゲルとフィルターの間に気泡がないことを確認する。
- 16) ペーパータオルをアガロースゲルの形に揃えてワットマン 3MM ペーパーの上に 5 cm 程度の厚さに重ねて載せる。
  - 17) ガラス板などの平版を載せ、その上に 500 g 程度の重しを載せて一晩静置する。
    - ・ゲルの大きさによって重しは加減する。
  - 18) ニトロセルロースフィルターを 2x SSC バッファーに浸し洗う。
  - 19) ワットマン 3MM ペーパーの上に置き、15 分程度静置して水分を除く。
  - 20) ニトロセルロースフィルターをワットマン 3MM ペーパーに挟みこんで、80°C 減圧状態で 2 時間乾燥し DNA を固定する。
  - 21) ニトロセルロースフィルターを 6x SSC バッファーに浮かべ、十分に浸透したのち底に沈めて数分間静置する。
  - 22) ニトロセルロースフィルターをフィルターよりわずかに大きめのヒートシールバッグに入れプレハイブリダイゼーションバッファー (6x SSC、0.5% SDS、5x Denhardt's、100 µg/ml ss DNA) で、68°C で 2 時間インキュベートする。
    - ・フィルターの数が多い場合はビーカーなどを用いた方が効率がよい。
    - ・ヒートシールバッグの中には気泡が入らないようにする。
  - 23) プレハイブリダイゼーションバッファーを捨て、ハイブリダイゼーションバッファー (6x SSC、10 mmol/l EDTA、DNA probe、0.5% SDS、5x Denhardt's、100 µg/ml ss DNA) を入れ、適当な温度で一晩インキュベートする。DNA probe はあらかじめ熱変性処理しておく。
    - ・用いるバッファー量はフィルター 1 cm<sup>2</sup> 当たり 50 ~ 100 µl とする。
    - ・ハイブリダイゼーションの温度は用いるプローブの塩基数や GC 含量によって異なる。DNA の変性温度より 20°C 程度低い温度が適当である。
- $$T_m = 81.5 + 16.6 (\log[\text{Na}]) + 0.41(\text{G} + \text{C}) \% - 0.63 (\text{formamide}) \% - (600/n) - 1.5 (\text{mismatch})\%$$
- $T_m$ : 変性温度、[Na]: ナトリウムイオン濃度、n: 塩基数
- 24) ヒートシールバッグからニトロセルロースフィルターをとりだし、洗浄バッファー (2x SSC、0.5% SDS) を入れたトレイに入れ室温で洗浄する。
  - 25) 予め洗浄バッファー (2x SSC、0.1% SDS) を  $T_m$  より 12°C 程度低い温度に加温しておき、トレイをインキュベーターに浮かべ洗浄液を入れ、ニトロセルロースフィルターを洗浄する。10~15 分程度を 2~4 回繰り返す。
    - ・<sup>32</sup>P 標識プローブを用いた場合は GM 計で洗浄が十分かどうかを調べることができる。
  - 26) ニトロセルロースフィルターを 2x SSC で洗浄し、ワットマン 3MM ペーパーで軽く水分をとったのち、ラップに挟んで X 線フィルムに一晩感光させる。
    - ・ノイズを少なくするため、-70°C 程度の冷凍庫で静置する。
  - 27) 現像し、目的フラグメントを確認する。

2. ノーザンブロッティング

(1) 原理

培養細胞や組織より単離したトータル RNA あるいは poly A-RNA をアガロース電気泳動にかけ、分離した RNA フラグメントをニトロセルロースフィルターに転写したのち、標識プローブを用いて目的塩基配列を含む RNA を検出する。基本的にはサザンハイブリダイゼーションと同様であるが、ハイブリダイゼーションを選択的に行うためにホルムアミドや硫酸デキストランを用いることが多い。一般に組織や細胞での mRNA の発現量を求める方法として用いられている。

(2) 試薬  
電気泳動用

アガロース (Code: A003 ~ A005)  
ホルムアミド (イオン交換樹脂処理したもの)  
ホルムアルデヒド (イオン交換樹脂処理したもの)  
泳動用バッファー (10x MESA:0.4 mol/l MOPS, 0.1 mol/l Sodium acetate, 10 mmol/l EDTA, pH7.0)(Code: MB02)  
色素マーカー (0.4 % bromophenol blue, 0.4 % xylenecyanol, 50 % glycerol, 1 mmol/l EDTA)  
EB(Code: E262, E272)

ノーザンブロットング用

変性用バッファー (10 mmol/l NaCl, 50 mmol/l NaOH)  
中性バッファー (0.1 mol/l Tris, pH7.5)  
20x SSC(3.0 mol/l NaCl, 0.3 mol/l sodium citrate)  
(Code: MB06)

ハイブリダイゼーション用

ホルムアミド (イオン交換樹脂処理したもの)  
5 wt% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液 (SDS)  
50x Denhardt's(1 wt% Ficoll, 1 wt% polyvinylpyrrolidone, 1 wt% BSA)  
1 mg/ml サケ精子 DNA 水溶液  
0.5 mol/l EDTA, pH8.0(Code: MB01)  
標識プローブ  
硫酸デキストラン

洗浄用

20x SSC(3.0 mol/l NaCl, 0.3 mol/l sodium citrate)  
(Code: MB06)  
5 wt% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液 (SDS)

(3) 消耗品

ニトロセルロースフィルター、パスツールピペット、エッペンドルフチューブ (オートクレーブ済)、ヒートシールバッグ

(4) 装置

電気泳動装置一式 (泳動槽、電源、電源コード、ペリスタポンプ)  
ゲル写真撮影装置一式 (トランスイルミネーター インスタント写真撮影装置)  
恒温槽  
シーラー (ヒートシールバッグ用)

(5) 操作

電気泳動

- 1) アガロースを水に加温溶解する。
  - ・アガロースの粒子が完全に溶解していることを確認する。
  - ・突沸することがあるので十分に攪拌しながら溶解する。
- 2) 液温が 60°C 程度に下がったのち、10x MESA とホルムアルデヒドをそれぞれ 1x と 2.2 mol/l の濃度になるように加える。
- 3) ゲルを成型する容器の両端に紙テープを貼り、アガロース溶液を入れた際に漏れないようにパスツールピペットで紙テープと容器の境目をアガロース溶液でシールする。
- 4) コームをセットし、シールが固化したらアガロース溶液を流し込む。
- 5) 十分固化したことを確認したのちコームを静かに引き抜き紙テープをとる。
  - ・この時強くコームを引くとウェルの底が抜けたりウェルが壊れたりするので注意を要する。
- 6) 1x MESA と 2.2 mol/l のホルムアルデヒド溶液を泳動容器に入れゲルを置く。ウェルをパスツールピペットを用いてバッファーでよく洗浄する。
- 7) 最大 20 µg の RNA を含む溶液 5 µl 程度に 3.5 µl のホルムアミド、10 µl のホルムアルデヒドおよび 2 µl の色素マーカー

を加え、よく混和したのちマイクロピペットを用いてウェルに入れる。

- ・マイクロピペットのチップはウェルの真上に置き、ゆっくりと RNA 溶液を押し出すと溶液はウェルの底へ沈む。
  - ・必要に応じてマーカーを用いる。マーカーは同様に処理した DNA でもよい。
- 8) 定電圧で一定時間泳動したのち、バンドを観察する場合は 0.1 mol/l 酢酸アンモニウム水溶液に 1 時間浸したのち、EB 溶液 (0.5 µg/ml ethidium bromide, 0.1 mol/l ammonium acetate, 0.1 mol/l β -mercaptoethanol) に 30~40 分間浸し、トランスイルミネーターで RNA のバンドを観察する。赤色フィルターを用いて EB 染色されたバンドを写真撮影する。
    - ・RNA は DNA に比べ染色が弱いのでロードした量が少ない場合には検出しにくいことが多い。
  - 9) RNA のバンドに合わせてアガロースゲルを長方形に切り出す。ゲルの方向が分かるように一か所だけ角を落とす。
  - 10) 切り出したゲルを数回水洗したのち変性用バッファーに 45 分間浸す。
  - 11) 次にゲルを中性バッファーに 45 分間浸す。
  - 12) トレイに素焼の板の上部が液面から数 mm 出るように 10xSSC を入れ、ワットマン 3MM ペーパーを素焼の板の形に切って載せる。
    - ・または 10x SSC を入れたトレイにガラス板を渡し、ワットマン 3MM ペーパーを敷き、ペーパーの両端が 10x SSC に浸るようにする。
  - 13) アガロースゲルをワットマン 3MM ペーパーの中央に載せる。
  - 14) ラップをアガロースゲルの部分を除いてトレイにかぶせる。バッファーの蒸発を防ぐためと、バッファーがゲルを通らずに吸い上げられるのを防ぐためである。
  - 15) アガロースゲルの大きさに切ったニトロセルロースフィルターを 2x SSC に浮かべ、十分に浸透したのち底に沈めて数分間静置する。
    - ・バッファーが浸透しなくなるのでニトロセルロースフィルターは素手でさわらないように注意する。
    - ・ゲルとフィルターの間には気泡がないことを確認する。
  - 16) ペーパータオルをアガロースゲルの形に揃えてワットマン 3MM ペーパーの上に 5 cm 程度の厚さに重ねて載せる。
  - 17) ガラス板などの平版を載せ、その上に 500 g 程度の重しを載せて一晩静置する。
  - 18) ニトロセルロースフィルターを 2x SSC バッファーに浸し洗う。
  - 19) ワットマン 3MM ペーパーの上に置き、15 分程度静置して水分を除く。
  - 20) ニトロセルロースフィルターをワットマン 3MM ペーパーに挟みこんで、80°C 減圧状態で 2 時間乾燥し RNA を固定する。
  - 21) ニトロセルロースフィルターを 3x SSC バッファーに浮かべ、十分に浸透したのち底に沈めて数分間静置する。
  - 22) ニトロセルロースフィルターをフィルターよりわずかに大きめのヒートシールバッグに入れプレハイブリダイゼーションバッファー (~50% formamide, 3x SSC, 0.5% SDS, 5x Denhardt's, 100 µg/ml ss DNA) で、68°C で 2 時間インキュベートする。
    - ・フィルターの数が多い場合はビーカーなどを用いた方が効率が良い。
    - ・ヒートシールバッグの中には気泡が入らないようにする。
    - ・硫酸デキストランを加えた方が感度が上がるので RNA の量で添加するか否かを判断する。
  - 23) プレハイブリダイゼーションバッファーを捨て、ハイブリダイゼーションバッファー (~50% formamide, 3x

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

SSC, 10 mmol/l EDTA, RNA probe, 0.5% SDS, 5x Denhardt's, 100 µg/ml ss DNA) を入れ、適当な温度で一晩インキュベートする。

- 24) ヒートシールバッグからニトロセルロースフィルターをとりだし、洗浄バッファー (2x SSC, 0.5% SDS) を入れたトレイに入れ室温で洗浄する。
- 25) 予め洗浄バッファー (2x SSC, 0.1% SDS) をインキュベーター温度より 10°C 程度高い温度に加温しておき、トレイをインキュベーターに浮かべ洗浄液を入れ、ニトロセルロースフィルターを洗浄する。10 分から 15 分程度を 2 ないし 4 回繰り返す。
  - ・<sup>32</sup>P 標識プローブを用いた場合は GM 計で洗浄が十分かどうかを調べることができる。
- 26) ニトロセルロースフィルターを 2x SSC で洗浄し、ワットマン 3MM ペーパーで軽く水分をとったのち、ラップに挟んで X 線フィルムに一晩感光させる。
  - ・ノイズを少なくするため、-70°C 程度の冷凍庫で静置する。
- 27) 現像し、目的フラグメントを確認する。

### 3. コロニーハイブリダイゼーション

#### (1) 原理

ベクターが導入された、あるいは目的とする DNA が組み込まれた形質転換菌を検出するために用いられる手法である。一般に *E. coli* を用い、含まれる DNA をニトロセルロースフィルターに転写したのち、標識プローブを用いて目的塩基配列を含むコロニーを検出する。小数のコロニーから目的コロニーを検出する場合は、マスを描いたニトロセルロースフィルターへ、滅菌したつま楊枝でコロニーを移し、アガロースゲル上でインキュベートしたのちニトロセルロースフィルターに付着したコロニーに含まれる DNA を固定し、プローブで検出する方法がとられる。多数のコロニーを検出する場合には、アガロースゲルでコロニーを形成させたのち、ニトロセルロースフィルターに移しとる方法が一般的である。ここではアンピシリン耐性遺伝子を組み込んだベクターを用いて多数のコロニーからの形質転換 *E. coli* の検出操作を述べる。

#### (2) 試薬

##### コロニー形成用

- 寒天 (Bacto agar)
- LB 培地 (Bacto Tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10 g, pH7.5)
- アンピシリン溶液 (25 mg Ampicillin/ml water, ろ過滅菌し、-20°C に保存)
- 変性用バッファー (0.5 mol/l NaOH, 1.5 mol/l NaCl)
- 中性バッファー (1.5 mol/l NaCl, 0.5 mol/l Tris, pH8.0)

#### (3) 消耗品

ニトロセルロースフィルター (シャーレにあったサイズ)、滅菌シャーレ

#### (4) 装置

オートクレーブ、クリーンベンチ、インキュベーター

#### (5) 操作

コロニーのニトロセルロースフィルターへの転写

- 1) 寒天 15g を LB 培地 1L に分散させ、オートクレーブにかける。
- 2) 液温が 55°C 程度に下がったのち、アンピシリン溶液 2 ml を加える。
- 3) 滅菌シャーレに気泡を生じないように寒天溶液を注ぎ入れる。
  - ・気泡が生じた場合にはバーナーの炎で軽くあぶるとよい。
- 4) シャーレに蓋をし固化したらクリーンベンチへ移し、蓋をずらして寒天表面を乾燥させる。

- 5) 他の抗生物質含有シャーレと区別するために色テープを巻き冷蔵庫に保管する。
- 6) 形質転換した *E. coli* (10,000/0.4 ml) 懸濁液をアンピシリンシャーレに注ぎ、滅菌ガラス棒でまんべんなく広げバクテリア液を浸透させる。
- 7) 37°C のインキュベーターに入れ 10~20 時間静置する。
  - ・時折、コロニーのサイズを確認し、直径 1~1.5 mm 程度でインキュベーターから取り出す。
- 8) 滅菌したニトロセルロースフィルターをゲルに載せ培地がフィルターに浸透するまで静置する。フィルターの位置が分かるように <sup>32</sup>P 標識した DNA あるいは <sup>14</sup>C 化合物を含むインクで非対称になるように注射針でマークをつける。
  - ・インクはインディアンインクを用いる。
  - ・マークは 1 スポット、2 スポット、3 スポットを三角形の各頂点に置くとよい。
  - ・別のニトロセルロースフィルターをゲルに載せスベアを作成する。
- 9) ラップに変性バッファーを置き、この溶液にゲルから剥したフィルターを入れ、液が十分浸透したのち 5 分間静置する。
- 10) 次にラップに中性バッファーを置き、変性バッファーを十分に切ったフィルターを入れ、5 分間静置したのち再度新たな中性バッファーに浸ける。
- 11) 3MM ペーパーにフィルターを挟みこみ、減圧下 80°C で 2 時間加熱固定する。
- 12) 以下、サザンハイブリダイゼーションの手法で DNA プローブとハイブリダイズさせ目的 DNA フラグメントを含む形質転換コロニーを検出する。

### 4. プラークハイブリダイゼーション

#### (1) 原理

ベクターに λ ファージを用いる方法で、λ ファージの感染によって生じた溶菌部分 (プラーク) をニトロセルロースフィルターに転写し、目的 DNA を含むプラークを検出する。コロニーハイブリダイゼーションに比べ一枚のシャーレでスクリーニングできるベクターの数が一桁以上多い。また、プラークに含まれる DNA の濃度が高く、明確なポジティブスポットを与える。但し、プラークが重なる場合があり、数回のスクリーニングを必要とする。

#### (2) 試薬

- プラーク形成用
- 寒天 (Bacto agar)
- アガロース (Code: A003 ~ A005)
- LB 培地 (Bacto Tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 5 g, pH7.2)
- TB 培地 (Bacto Tryptone 10 g, NaCl 5 g, pH7.2)
- 変性用バッファー (0.5 mol/l NaOH, 1.5 mol/l NaCl)
- 中性バッファー (1.5 mol/l NaCl, 0.5 mol/l Tris, pH8.0)

#### (3) 消耗品

ニトロセルロースフィルター、滅菌シャーレ

#### (4) 装置

オートクレーブ、クリーンベンチ、インキュベーター、水平盤

#### (5) 操作

- プラークのニトロセルロースフィルターへの転写
- 1) 2 L 三角フラスコ中で寒天 15 g を LB 培地 1 L に分散させ、オートクレーブにかける。また、アガロース 7 g を TB 培地 1 L に分散させ、オートクレーブにかける。
  - 2) オートクレーブにかけた寒天溶液を 55°C の恒温槽に浸け、液温を 55°C に下げる。溶液を滅菌シャーレに気泡を生じないよ

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

うに注ぐ。

- ・気泡が生じた場合にはバーナーの炎で軽くあぶるとよい。
  - ・水平盤の上で作成すること。このあとに加えるアガロースゲルの厚さによってプラークの大きさが異なることがある。
- シャーレに蓋をし、固化したらクリーンベンチへ移し、蓋をずらして寒天表面を乾燥させる。
  - DNA フラグメントを組み込んだ  $\lambda$  ファージと *E. coli* を混合し、これに 48°C に保ったアガロース溶液を加え、寒天シャーレに注ぐ。
    - ・  $\lambda$  ファージ DNA は一般に 1 ng あたり  $1 \times 10^5$  個のプラークを形成するため、シャーレ 1 枚に対し、数 100 個のプラークをつくるように濃度を調節する。
    - ・ 同様に水平盤の上で作製すること。
  - 37°C のインキュベーターで 8 時間インキュベートしたのち、41°C のインキュベーターに移し数時間インキュベートする。
    - ・ 時折プラークの形成状態を確認すること。プラーク同士が混合し合わないよう注意する。
  - シャーレを 4°C に 1 時間程度保ちアガロースを十分固化させたのち、ニトロセルロースフィルターを載せ、培地が浸透するのを確認して放射性インクでマークする。
    - ・  $\lambda$  ファージのニトロセルロースフィルターへの付着は極めて速い。
    - ・ スペアのニトロセルロースフィルターを作成する。
  - ラップに変性バッファーを置き、この溶液にゲルから剥したフィルターを入れ、液が十分浸透したのち 5 分間静置する。
  - 次にラップに中性バッファーを置き、変性バッファーを十分に切ったフィルターを入れ、5 分間静置したのち再度新たな中性バッファーに浸ける。
  - 3MM ペーパーに、プラークが付着した面を上にしてニトロセルロースフィルターを置き乾燥させる。
  - 3MM ペーパーにフィルターを挟みこみ、減圧下 80°C で 2 時間加熱固定する。
  - 以下、サザンハイブリダイゼーションの手法で DNA プローブとハイブリダイズさせ目的 DNA フラグメントを含むプラークを検出する。

### III DNA プローブ作製

<sup>32</sup>P などの放射性同位元素標識プローブの作成については、多くの成書があるので、それらを参考にすること<sup>1,2)</sup>。ここでは、DNA オリゴマーへのアミノ基修飾法と、アミノ基に対する蛍光標識剤およびビオチン標識剤を用いた DNA プローブの作製方法についてまとめた。

#### 1. FITC 標識プローブ

##### (1) 原理

FITC-I は DNA あるいは RNA フラグメントとはそのままでは反応しない。一般に末端をアミノ基標識した DNA オリゴマーを用い FITC-I と反応させる。DNA オリゴマーの 5' 末端アミノ化合物は、DNA シンセサイザーを用いて目的塩基配列としたのちアミノ基導入のためのアミダイト試薬を反応させることで容易に得ることができる。標識 DNA は励起波長 500 nm、発光波長 520 nm の蛍光を持つ。ここでは、DNA フラグメントへのアミノ基導入方法を紹介<sup>30)</sup>、具体的な FITC 標識法を説明する。その他、固相合成反応時にアミノ基を導入する方法もある<sup>31)</sup>。

##### (2) 試薬

###### リン酸化用

10x kinase buffer(0.5 mol/l Tris、0.1 mol/l MgCl<sub>2</sub>、50 mmol/l DTT、1 mmol/l spermidine 1 mmol/l EDTA pH7.6)

リン酸化バッファー (1x kinase buffer、50 pmol ATP、10 ~ 20 units T4 polynucleotide kinase、total 50  $\mu$ l)

###### DNA フラグメント

ストップバッファー (0.2 mol/l EDTA、pH8.0)  
フェノール/クロロホルム (phenol/chloroform=50 v/v%)  
酢酸ナトリウム溶液 (3 mol/l sodium acetate、pH5.2)

###### 末端アミノ化用

アミノ化バッファー (0.5 mol/l ethylenediamine、0.2 mol/l WSC(Code: W001)、0.2 mol/l MES(Code: GB12)、pH6.0)  
溶出バッファー (0.1 mol/l sodium carbonate、pH9.0)

###### 標識用

FITC-I(Code: F007)  
ジメチルホルムアミド (DMF)(Code: LU07)

##### (3) 消耗品

NAP-5 あるいは Sephadex G-25(共に GE ヘルスケア製)、  
エペンドルフチューブ

##### (4) 装置

電気泳動装置一式 (ポリアクリルアミドゲル用)

##### (5) 操作

1) DNA フラグメントの 5' 末端を酵素的にリン酸化する。  
以下にリン酸化の方法を示す。

① 1~50 pmol の DNA フラグメントをリン酸化バッファーに溶かし、37°C で 30 分間インキュベートする。

② 反応液に 2  $\mu$ l のストップバッファーを加える。

③ フェノール/クロロホルム 50  $\mu$ l で 1 回抽出する。

④ 酢酸ナトリウム溶液 5 ml およびエタノール 100  $\mu$ l を加え冷凍庫で 10~30 分間冷却する。

⑤ 遠心し DNA ペレットを集め、70 % エタノール溶液 50  $\mu$ l で洗浄し遠心する。

⑥ 上清を除き、ペレットを ddH<sub>2</sub>O (double deionized H<sub>2</sub>O) 500  $\mu$ l に溶かし、NAP-5 を通してリン酸化 DNA フラグメントを得る。溶出溶媒は ddH<sub>2</sub>O を用いる。

・ NAP-5 は GE ヘルスケアから入手できる。

また、Sephadex G-25 も使用できる。

・ 酵素反応液をそのままカラム処理してもよい。

⑦ 遠心濃縮する。

2) 5'リン酸化 DNA フラグメントを 0.2~1 ml の ddH<sub>2</sub>O に溶かす。

3) 同量のアミノ化バッファーを加え、室温で 12~18 時間インキュベートする。

4) 反応液を NAP-5 につけ、溶出バッファーで溶出させる。

5) 1 mg の FITC-I を DMF 50  $\mu$ l に溶かし、アミノ標識 DNA フラグメント溶液に加える。

・ 一般に FITC-I 量は DNA に対して数倍モル量加える。

・ DMF 量は DNA 溶液に対して 20 v/v% 程度になるようにする。

・ DMF の代わりにジメチルスルホキシド (DMSO) でもよい。

6) 4°C で 16 時間反応させたのち、Sephadex G-25 で FITC 標識 DNA フラグメントを分離する。

・ 反応は 37°C、1 時間でもよい。

7) 高純度の FITC 標識 DNA フラグメントを必要とする場合には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、目的フラグメントを切り出す。

#### 2. Sulforhodamine 101 acid chloride 標識プローブ

##### (1) 原理

Sulforhodamine 101 acid chloride は FITC 同様 DNA あるいは RNA フラグメントとはそのままでは反応しない。一般に末端をアミノ基標識した DNA オリゴマーを用い Sulforhodamine 101 acid chloride と反応させる。標識 DNA

は励起波長 570 nm、蛍光波長 600 nm の蛍光を持つ。

(2) 試薬

標識用

標識バッファー (0.1 mol/l sodium borate、pH9.3)  
Sulforhodamine 101 acid chloride(Code: S016)  
ジメチルホルムアミド (DMF)(Code: LU07)

(3) 消耗品

NAP-5 あるいは Sephadex G-25(共に GE ヘルスケア製)、  
エッペンドルフチューブ

(4) 装置

電気泳動装置一式 (ポリアクリルアミドゲル用)

(5) 操作

- 1 mg の Sulforhodamine 101 acid chloride を DMF 50 µl に溶かし、アミノ標識 DNA フラグメント溶液に加える。  
・一般に Sulforhodamine 101 acid chloride 量は DNA に対して、数倍加える。  
・DMF 量は DNA 溶液に対して 20 v/v% 程度になるようにする。  
・ジメチルスルホキシド (DMSO) でもよい。
- 4°C で 16 時間反応させたのち、Sephadex G-25 でローダミン標識 DNA フラグメントを分離する。
- 高純度の Sulforhodamine 101 acid chloride 標識 DNA フラグメントを必要とする場合にはポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、目的フラグメントを切り出す。

3. ビオチン標識プローブ

(1) 原理

ビオチン-アビジンを用いる検出方法は、その高い親和性により検出感度が高いために、タンパクなどの生体成分の分析や生化学分析に用いられている。一般に末端をアミノ標識した DNA オリゴマーを作成し目的 DNA とハイブリダイズしたあと、蛍光標識、またはペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼなどの酵素標識したアビジンを作用させ、付加したビオチン量を蛍光強度あるいは酵素量 (発色あるいは発光基質) で分析する。(ビオチン標識法の詳細については、ビオチン標識の総説を参照すること。一般に、FITC 標識と比べ、反応の至適 pH は低く 7.5~8.5 のため、グッドバッファーなどでコントロールした溶液で行っていただきたい。反応後の精製操作は蛍光標識プローブの場合と同様である。)

(2) 試薬

標識用

標識バッファー (0.1 mol/l phosphate、pH8.0)  
Biotin-AC<sub>5</sub>-OSu (Code: B305)  
ジメチルホルムアミド (DMF) (Code: LU07)

(3) 消耗品

NAP-5 あるいは Sephadex G-25(共に GE ヘルスケア製)、  
エッペンドルフチューブ

(4) 装置

電気泳動装置一式 (ポリアクリルアミドゲル用)

(5) 操作

- 1 mg の Biotin-AC<sub>5</sub>-OSu を DMF 50 µl に溶かし、アミノ標識 DNA フラグメント溶液に加える。  
・一般にビオチン量は DNA に対して、数倍加える。  
・DMF 量は DNA 溶液に対して 20 v/v% 程度になるようにする。  
・ジメチルスルホキシド (DMSO) でもよい。
- 4°C で 16 時間反応させたのち、Sephadex G-25 でビオチン標識 DNA フラグメントを分離する。
- 高純度のビオチン標識 DNA フラグメントを必要とする場合には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、目的フラグメ

ントを切り出す。

参考文献

- 1) T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, **1982**.
- 2) R. L. Rodriguez, R. C. Tait, Recombinant DNA Techniques, an introduction, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., CA, USA, **1983**.
- 3) 村松正実, 岡山博人, 遺伝子工学ハンドブック, 羊土社, **1994**.
- 4) 高木康敬, 遺伝子操作マニュアル, 講談社, **1982**.
- 5) F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 5463.
- 6) A. M. Maxam and W. Gilbert, "A new method for sequencing DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 560.
- 7) R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Ehrlich, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science*, **1988**, *239*, 487.
- 8) M. A. Abbott, B. J. Boiesz, B. C. Byrne, S. Kwok, J. J. Sinisky and G. P. Ehrlich, "Enzymatic gene amplification: qualitative and quantitative methods for detecting proviral DNA amplified in vitro", *J. Infect. Dis.*, **1988**, *158*, 1158.
- 9) W. Ansoerge, B. S. Sproat, J. Stegemann and C. Schwager, "A nonradioactive automated method for DNA sequence determination", *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1986**, *13*, 315.
- 10) W. Ansoerge, B. Sproat, J. Stegemann, C. Schwager and M. Zenke, "Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis", *Nucleic Acids Res.*, **1987**, *15*, 4593.
- 11) L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent and L. E. Hood, "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis", *Nature*, **1986**, *321*, 674.
- 12) J. M. Prober, G. L. Trainer, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen and K. Baumeister, "A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides", *Science*, **1987**, *238*, 336.
- 13) M. Manoni, R. Pergolizzi, M. Iuzzana and G. D. Bellis, "Dideoxy linear PCR on a commercial fluorescent automated DNA sequencer", *BioTechniques*, **1992**, *12*, 48.
- 14) S. Beck, "Colorimetric-detected DNA sequencing", *Anal. Biochem.*, **1987**, *164*, 514.
- 15) S. Wiemann, J. Stegemann, D. Grothues, A. Bosch, X. Estivill, C. Schwager, J. Zimmermann, H. Voss and W. Ansoerge, "Simultaneous on-line DNA sequencing on both strands with two fluorescent dyes", *Anal. Biochem.*, **1995**, *224*, 117.
- 16) A. H. N. Hopman, J. Wiegant, G. I. Tesser and P. V. Duijn, "A nonradioactive in situ hybridization method based on mercapturated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligands", *Nucleic Acids Res.*, **1986**, *14*, 6471.
- 17) R. P. Lichter, S. A. Ledbetter, D. H. Ledbetter and D. C. Ward, "Fluorescence in situ hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 6634.
- 18) E. J. M. Speel, D. Lawson, A. H. N. Hopman and J. Gosden, "Multi-PRINS: Multiple sequential oligonucleotide primed in situ DNA synthesis reaction label specific chromosomes and produce bands", *Hum. Genet.*, **1995**, *95*, 29.
- 19) S. S. Ghosh, P. M. Kao, A. W. McCue and H. L. Chappelle, "Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugated hybridization probes", *Bioconjugate Chem.*, **1990**, *1*, 71.
- 20) P. Richterich and G. M. Church, "DNA sequencing with direct transfer electrophoresis and nonradioactive detection", *Methods Enzymol.*, **1993**, *218*, 187.
- 21) S. Beck, T. O' Keffe, J. M. Coull and H. Köter, "Chemiluminescent detection of DNA: application for DNA sequencing and hybridization", *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 5115.
- 22) M. Shiga, K. Sasamoto, M. Aoyama, M. Takagi and K. Ueno, "Fluorescence detection of DNA using a novel peroxidase substrate, 4-(4-hydroxyphenylcarbamoyl)butanoic acid", *Anal. Sci.*, **1995**, *11*, 591.
- 23) C. Kessler, H. J. Hölte, R. Seibl, J. Burg and K. Mühlegger, "Nonradioactive labeling and detection of nucleic acids. 1. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: Antidigoxigenin ELISA principle (Digoxigenin system)", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1990**, *371*, 917.
- 24) M. Renz and C. Kurz, "A colorimetric method for DNA hybridization", *Nucleic Acids Res.*, **1984**, *12*, 3435.
- 25) H. Arakawa, M. Maeda, A. Tsuji and T. Takahashi, "Highly sensitive biotin-labelled by hybridization probed", *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *37*, 1831.
- 26) A. C. Foster, J. L. McInnes, D. C. Skingle and R. H. Symons, "Nonradioactive hybridization probes prepared by the chemical labeling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin", *Nucleic Acids Res.*, **1985**, *13*, 745.
- 27) J. J. Leary, D. J. Brigati and D. C. Ward, "Rapid and sensitive

colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose : Bioblots” , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, 80, 4045.

28) D. P. Knight, A. C. Simmonds, A. P. Schaap, H. Akhavan and M. A. W. Brady, “Nonradioactive DNA detection on southern blots by enzymatically triggered chemiluminescence” , *Anal. Biochem.*, **1990**, 185, 353.

29) S. Beck, “Nonradioactive detection of DNA using dioxetane chemiluminescence” , *Methods Enzymol.*, **1992**, 216, 143.

30) L. E. Morrison, T. C. Halder and L. M. Stols, “Solution-Phase Detection of Polynucleotides Using Interacting Fluorescent Labels and Competitive Hybridization” , *Anal. Biochem.*, **1989**, 183, 231.

31) L. Wachter, J. A. Jablonski and K. L. Ramachansran, “A simple and efficient procedure for the synthesis of 5’ -aminoalkyl oligonucleotides” , *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14, 7985.

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料