

ウイルスの病原性を制御する  
構造ドメインの解析

(研究課題番号 05660042)

平成6年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成7年度3月

研究代表者 佐野 輝男  
(弘前大学農学部助教授)

## 研究代表者

佐野 輝男 (弘前大学農学部・助教授)

## 研究経費

平成5年度	1,700	千円
平成6年度	400	千円
計	2,100	千円

## 研究発表

(学会誌、他)

佐野輝男: ウイロイド (Viroid) / hepatitis  $\delta$  との関連、ウイルス 44 巻、27-34、1994.

佐野輝男: ウイロイドの病原性発現機構の解析と弱毒化の可能性について、平成5年度文部省特定研究「有用微生物資源の探索と生物環境制御への応用」、66-72、1994.

石黒亮: ウイロイドの病原性についての研究 弘前大学農学部植物病理学研究室 平成6年度卒業論文 40頁

(口頭発表)

Sano, T., Candresse, T., Hammond, R. W., Diener, T. O. and Owens, R. A.: Investigation of structural domains regulating viroid pathogenicity. 6th International Congress of Plant Pathology, Montreal, Canada, 1993. 8.

佐野輝男、石黒亮: ホップ矮化ウイロイド (HSVd) -カンキツエクソコーテイスウイロイド (CEVd) 間キメラウイロイドの複製能と病原性、平成5年度日本植物病理学会東北部会 (1993.10)

佐野輝男、石黒亮、Owens, R. A.: ウイロイドの病原性と構造ドメイン、第16回日本分子生物学会大会 (1993.12)

石黒亮、佐野輝男、Owens, R. A.: ウイロイドの右末端領域 (TRドメイン) の組換えと病徴、複製量の変化、平成6年度日本植物病理学会東北部会 (1994.10)

佐野輝男、石黒亮、Owens, R. A.: ウイロイドの病原性と右末端領域 (TRドメイン) の解析、第17回日本分子生物学会大会 (1994.12)

## 目次

### 第1章、ホップ矮化ウイルス (HSVd) とカンキツエクソコーテイスウイルス (CEVd) 間キメラウイルスの複製能と病原性の解析 ----- 1

- (1) 共通の制限酵素認識部位を用いた構造ドメイン組換えの概略
- (2) 実験方法
  - A、キメラウイルス (HS/CE-TRとCE/HS-TR) 作製手順
  - B、感染性試験
- (3) 実験結果
  - A、HS/CE-TRの感染性
  - B、CE/HS-TRの感染性
  - C、CE/HS-TR と HS/CE-TR の複製能と病原性

### 第2章、カンキツエクソコーテイスウイルス (CEVd) とトマト apical stunt ウィルス (TASVd) 間キメラウイルスの複製能の解析 ----- 7

- (1) PCR法による構造ドメイン組換えの概略
- (2) 実験方法
  - A、キメラウイルス (CE/AS-TR) 作製手順
  - B、感染性試験
- (3) 実験結果
  - A、CE/AS-TRの感染性

### まとめと考察 ----- 10

- (1) ウィルスの組換えと2次構造について
- (2) ウィルスの右末端領域 (TR ドメイン) の機能について

### 実験プロトコール

- 1、Double Restriction Enzyme Digestion of Plasmid DNA
- 2、DNA断片をゲルから回収する方法
- 3、ゲルから回収したDNA断片のLigationとPCRによる増幅
- 4、トランスフォーメーション (形質転換)
- 5、cDNA接種試験方法
- 6、ウィルス抽出法
- 7、DIG標識RNAプローブによるハイブリダイゼーション (1995, 3.24版)
- 8、DIG Taq Cycle Sequencing Protocol

## 第1章、ホップ矮化ウイロイド (HSVd) とカンキツエクソコーテイスウイロイド (CEVd) 間キメラウイロイドの複製能と病原性の解析

### (1) 共通の制限酵素認識部位を用いた構造ドメイン組換えの概略

CEVdとHSVdのcDNAには共に可変領域 (Vドメイン) と右末端領域 (TRドメイン) の境界に Sac II, Pvu I 2種類の制限酵素認識部位が在り、この2つの制限酵素を利用して両者のTRドメインを交換することが可能である。プラスミドpBluescript II SK(-)のBam HI 部位に挿入されたHSVdのBamHI 1ユニットcDNA (以下 pBS-HS-3と略す) とpUC9のBam HI 部位に挿入されたCEVdのBam HI 1ユニットcDNA (以下 pCE15-6と略す) から、図1 a、1 bに示したように両ウイロイドcDNA間でTRドメインの交換を行なって、キメラウイロイドcDNAクローン pBS-HS/CE-TR及び pBS-CE/HS-TRを作製した。

### (2) 実験方法

#### A. キメラウイロイドcDNAクローン (pBSHS/CE-TRとpBSCE/HS-TR) 作製手順

##### 1) Bam HI - Pvu I断片の調製

供試したプラスミドDNAは、約5～10 mlの1晩培養液からQIAprep Spin Plasmid Kit (50) (QIAGEN社) を用いて抽出し、最終的に100 ulの滅菌蒸留水 (DW) に溶解したものをを用いた。

まず、プラスミドDNAを制限酵素 (Bam HIとPvu I) で実験プロトコール1の要領で切断した。

次に、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) に積み、1倍TAE緩衝液、250V、25 mAの条件で、マーカー色素中のブロムフェノールブルー (速く泳動する方) がゲルの4/5程度移動するまで泳動した。

臭化エチジウム溶液 (1 ug/ml) でゲルを2-3分染色後、トランスイルミネーター上で目的のバンドを切り取り、実験プロトコール2の要領でゲルから回収した。なお、回収したDNA断片のサイズは、pBS-HS-3から186 bpと111 bp、pCE15-3から245 bpと126 bpであった。

## 2) 組換え中間体の作成

HSVd の186 bp断片とCEVdの 245 bp断片、及び HSVdの 111 bp断片とCEVdの 126 bp断片を T4 DNA リガーゼで結合後、Bam HI で切断し、pBluescript II SK(-) の Bam HI 部位に挿入して、431 bp と 237 bp の組換え中間体を作成した。

大腸菌 (E.coli JM 109) を形質転換しそれぞれ 100 以上のコロニーを得たので、各12個を選んで、アルカリ-SDS法でプラスミド抽出を行い、1%アガロースゲル電気泳動及び5%PAGE等で確認した結果、組換え中間体 431 bpが組み込まれているもの1クローン (430-9)、237 bpが組み込まれているもの2クローン (238-4, 238-6) が得られた。

## 3) Bam HI - SacII 断片の調製

上記のクローン (430-9及び238-4) を有する大腸菌約 10 ml の 1 晩培養液から QIAprep Spin Plasmid Kit を用いてプラスミドDNAを抽出し、最終的に 100 ul の滅菌蒸留水に溶解した。

各プラスミドDNAを制限酵素 (Bam HI と Sac II) で実験プロトコール 1 と同じ要領で切断した。さらに先と同様 5 %PAGEで泳動し、目的のバンドを切り取り、実験プロトコール 2 の要領でゲルから回収した。なお回収したDNA断片のサイズは、430-9 から287 bpと144 bp、238-4 から 176 bp と 57 bpであった。

## 4) pBS-CE/HS-TR の作成

430-9 の 287 bp断片と238-4の 57 bp断片を T4 DNA リガーゼで結合後、Bam HI で切断し、pBluescript II SK(-) の Bam HI 部位に挿入して、pBS-CE/HS-TRを作成した。

大腸菌 (E.coli JM 109) を形質転換 (実験プロトコール 4) し、200 以上のコロニーを得たので、12個を選んで、アルカリ-SDS法でプラスミド抽出を行い、1%アガロースゲル電気泳動及び5%PAGE等で確認した結果、2つのクローン (pBS-CE/HS-TR#3, #11) が得られた。

## 5) pBS-HS/CE-TR の作成

430-9 の 144 bp断片と238-4の 176 bp断片を T4 DNA リガーゼで結合後、Sac II 切断で欠けた末端の Bam HI 部位を PCR で付加した (実験プロトコール 3)。これを

Bam HI で切断し、pBlueScript II SK(-) の Bam HI 部位に挿入して、pBS-HS/CE-TR を作成した。

大腸菌 (E.coli JM 109) を形質転換し 200 以上のコロニーを得たので、12個を選んで、アルカリ-SDS法でプラスミド抽出を行い、1%アガロースゲル電気泳動及び5%PAGE等で確認した結果、5つのクローン (pBS-HS/CE-TR#1, #2, #3, #5, #10) が得られた。

しかし、この各クローンの塩基配列を確認した結果、上側中央保存領域の上流に13塩基の余分な配列が挿入されていることが明らかになった。この配列を除くため、pBS-HS/CE-TRから Bam HI 切断と PAGE によりキメラウイロイドの全長 cDNA を回収し、自己 ligation 後、プライマー HSV 73M と HSV 83 M で PCR して、13塩基の挿入配列を除去し、Xma I で末端を切断して pBluescript II SK(-) の Xma I 部位に挿入して2つのクローン pBS-HS/CE-TR #9, 16 を得た。

#### 6) キメラウイロイド cDNA のシーケンシング

作成したキメラウイロイド cDNA の塩基配列は、上記の組換え体プラスミド DNA を ALF RED DNA シークエンサー (ファルマシア社) 及び DIG Taq cycle sequencing kit (ベーリンガー社) 等を用いて行った (実験プロトコール 8)。

### B. 感染性試験

#### 1) cDNA接種試験 - 複製能の有無の検討

Aで作成した cDNAを含むプラスミド pBS-CE/HS-TR#3, #11 及び pBS-HS/CE-TR#13, #14を10 ml の一晚培養液から QIA prep Spin Plasmid Kit で調製し、以下のように Bam HI で切断してキュウリ (品種; 四葉) とトマト (品種; Rutgers) 各 10 本に接種した (実験プロトコール 5)。

#### 2) ウイロイド RNA接種試験 - 複製能、病原性の比較

1) で感染が認められた pBS-CE/HS-TR 接種トマト及び pBS-HS/CE-TR 接種キュウリから子孫ウイロイド RNA を抽出し (実験プロトコール 6)、2M LiCl 可溶性核酸分画を得た。これを HSVd 接種キュウリ及び CEVd 接種トマトから抽出した同分画試料と共にリターン PAGE にかけて、各試料に含まれるウイロイド濃度を比較し、全試料の濃度が一定になるように調節した。これを原液として10希釈液、100倍希

积液を作成して接種源とし、1)と同様にしてキュウリとトマト各10本に接種した。

接種植物は、25-28℃、16時間照明の培養器内で培養し、接種後5週目まで病徴観察を行うと共に、各個体から1週間毎に葉を径8mmのコルクボーラーで打ち抜き採集した。採集した葉は接種源別に1本の微量遠心用チューブにまとめ、子孫ウイルスを抽出し、ウイルス増殖量（感染葉中の濃度）の比較検定に供試した。

### (3) 実験結果

#### A、CE/HS-TRの感染性

Bam HI で切断したキメラウイルス cDNA クローン pBS-CE/HS-TR をトマト及びキュウリに接種した結果、接種後約4週間目にトマトの上葉に脈壊疽を伴う葉巻症状が現われ、全身に軽い矮化症状が現われた。キュウリには異常は認められなかった。

接種6週間目にトマト発病個体の上葉を刈り取り、ウイルス抽出法に準じて2M LiCl 可溶性核酸分画を得た。これをリターン PAGE で検定したところ HSVd とも CEVd とも異なる位置にウイルス特有の環状 RNA のバンドが現われた。また、DIG 標識した CEVd の RNA プローブを用いてハイブリダイゼーション法（実験プロトコル7）により検定したところ陽性の反応を得た。

さらにリターン PAGE で純化したウイルス様環状 RNA 分子を HSVd, CEVd, ASSVd 等既知のウイルスと 8M 尿素を含む 5% PAGE で同時に泳動して分子サイズの比較を行った結果、約 340 ヌクレオチドと推定され、これはキメラウイルス cDNA クローン pBS-CE/HS-TR から生じるキメラウイルスのサイズとほぼ一致した（図3）。

以上から構築したキメラウイルスの感染がほぼ確認されたので、この RNA から cDNA を合成し、pBluescript II SK(-) にクローニングして塩基配列の解析を行った。その結果、接種したキメラウイルス cDNA クローン pBS-CE/HS-TR から生じたキメラウイルスがトマトの中で安定に増殖していることが確認された。この新しいキメラウイルスを CE/HS-TR と名付けた（図1c）。

#### B、HS/CE-TRの感染性

Bam HI で切断したキメラウイルス cDNA クローン pBS-HS/CE-TR をトマト及

びキュウリに接種した結果、接種後約3週間目にキュウリの上葉に矮化、葉巻症状が現われた。トマトには異常は認められなかった。

接種6週間目にキュウリ発病個体の上葉を刈り取り、ウイルス抽出法に準じて2M LiCl可溶性核酸分画を得た。これをリターンPAGEで検定したところHSVdともCEVdとも異なる位置にウイルス特有の環状RNAのバンドが現われた。また、DIG標識したHSVdのRNAプローブを用いてハイブリダイゼーション法により検定したところ陽性の反応を得た。

さらにリターンPAGEで純化したウイルス様環状RNA分子をHSVd, CEVd, ASSVd等既知のウイルスと8M尿素を含む5% PAGEで同時に泳動して分子サイズの比較を行った結果、約325ヌクレオチドと推定され、これはキメラウイルスcDNAクローンpBS-HS/CE-TRから生じるキメラウイルスのサイズとほぼ一致した(図3)。

以上から構築したキメラウイルスの感染がほぼ確認されたので、このRNAからcDNAを合成し、pBluescript II SK(-)にクローニングして塩基配列の解析を行った。その結果、接種したキメラウイルスcDNAクローンpBS-HS/CE-TRから生じたキメラウイルスがトマトの中で安定に増殖していることが確認された。この新しいキメラウイルスをHS/CE-TRと名付けた(図1c)。

### C、CE/HS-TRとHS/CE-TRの病原性と複製能

前項で述べたようにHSVdとCEVd間で右末端領域(TRドメイン)を交換したキメラウイルスCE/HS-TRとHS/CE-TRはそれぞれトマトとキュウリで安定に増殖することが明らかになった。そこでこの新しい2種のキメラウイルスの病原性と増殖量(複製能)を検討するため、親ウイルスであるHSVd及びCEVdと共にトマトとキュウリに接種した。方法で述べたように各接種源中のウイルス濃度を一定にし、原液とその10倍希釈液をそれぞれトマトとキュウリ各10本ずつに接種した。

外部病徴観察の結果得られた発病個体数の推移を図4に示した。HSVd及びHS/CE-TRを接種したキュウリとCEVd及びCE/HS-TRを接種したトマトに矮化、葉巻、茎壊疽等の病徴が現われた。キメラウイルスの病徴は基本的には一方の親ウイルスと同じで、HS/CE-TRはHSVdと、CE/HS-TRはCEVdとほぼ同様の病



徴を示した。しかし、キメラウイルスの病徴発現は親ウイルスに較べ明らかに遅く、親ウイルスの10倍希釈接種源と同程度の病原性と考えられた。このキメラウイルスの病原性の低下は増殖量（複製能）の低下によるものと考えられ、接種植物から経時的に試料を採集してハイブリダイゼーションにより検定した結果は、感染植物中のキメラウイルス濃度が親ウイルスに較べ1週間程度遅れて立ち上がってくることを示した（図5）。つまりキメラウイルスはTRドメインの交換により増殖量（複製能）が低下し、その結果として発病が遅れたことを意味しており、TRドメインはウイルスの増殖量（複製能）に強く関与しているものと考えられた。

またCEVd及びCE/HS-TRを接種したキュウリと、HSVd及びHS/CE-TRを接種したトマトには外部病徴観察では異常が認められなかった（図4）。しかし、これらの接種植物から先と同様に経時的に試料を採集してハイブリダイゼーション検定を行なった結果、興味深いことにいずれの植物からも接種した各キメラウイルス或はウイルスの感染が確認され、無病徴感染していることが確認された。感染植物体中の各ウイルスの増殖量はキュウリではHSVd、HS/CE-TR、CEVd、CE/HS-TRの順に多く、HSVdを100とした時以下順に50、50~0、1~0であった。またトマトではCEVd、CE/HS-TR、HSVd、HS/CE-TRの順に多く、CEVdを100とした時以下順に25、5、1~0であった。ただし、接種試験は2度、部分的には3度繰り返して行なったが、CEVd-キュウリ、CE/HS-TR-キュウリ及びHS/CR-TR-トマトの場合はよく増殖する場合とほとんど増殖が認められない場合があり、増殖量が一定せず、さらに検討を要する。

## 第2章、カンキツエクソコーテイスウイロイド (CEVd) とトマト apical stunt ウイロイド間キメラウイロイドの複製能の解析

### (1) PCR 法による構造ドメイン組換えの概略

CEVdやHSVdの場合と異なり、TASVdのcDNAの可変領域 (Vドメイン) と右末端領域 (TRドメイン) の境界には2次構造下方のPvuI認識部位は存在するが、上側のSac II認識部位が存在しない。従って制限酵素のみで両者のTRドメインを交換することが出来ない。そこで本試験では図2に示したように4種類のPCR用プライマーを作成し、CEVd-cDNAのTRドメインをTASVd-cDNAのTRドメインで置換し、キメラウイロイドcDNAクローンpBS-CE/AS-TRを作製した。

### (2) 実験方法

#### A、キメラウイロイドcDNAクローン (pBS-CE/AS-TR1) 作製手順

供試したプラスミドDNAは、約5～10 mlの1晩培養液からQIAprep Spin Plasmid Kitを用いて抽出し、最終的に100 ulの滅菌蒸留水に溶解したものを用いた。

上記の方法で抽出したTASVdの全長cDNAを含むプラスミドpAS6を鋳型にしてプライマーCEAS-135PとCEAS-229MでPCRを行ないTASVdのTRドメインに対応する95 bpを、またCEVdの全長cDNAを含むプラスミドpCE15-6を鋳型にしてプライマーCEV-1とCEV-149MでPCRを行ないCEVdの2次構造上側123 bpを増幅した (図2a)。なおPCRは、Tth DNA polymeraseを用い、50 ulの反応系で 94C, 5 min. を1サイクル、94C, 1 min. - 55C, 2 min. - 72C, 3 min. を30サイクル、72C, 7 min. 1サイクル 行なった。

上記のPCR反応液の2-5 ulを5%PAGEで検定した結果、共に期待される長さの単一DNA断片の増幅が確認されたので、各PCR反応液2 ulをプライマーCEV-1とCEAS-229MでPCRして2つのDNA断片を結合させCEVdとTASVdのキメラ203 bpのDNA断片を増幅した (図2a)。なおPCRは上記の方法に準じて行なったが、アニリング温度を55Cから40Cに下げて行なった。

上記のPCR反応液の2-5 ulを5%PAGEで検定した結果、期待される長さのDNA断片の増幅が確認されたので、残りのPCR反応物をエタノール沈殿後、Bam HIとPvu Iで切断した (実験プロトコール1)。反応液をフェノール抽出後エタノール沈

殿し、5%PAGEで泳動して図 2 b に示したように末端に Bam HI と Pvu I 部位を持つキメラ 127 bp の DNA 断片を回収した。

一方、CEVd の全長 cDNA を含むプラスミド pBS-CE-4 を Bam HI と Pvu I で切断し、フェノール抽出後エタノール沈殿して、5%PAGEで泳動して図 2 b に示したように末端に Bam HI と Pvu I 部位を持つ CEVd の 241 bp 断片を回収した。なお制限酵素切断とゲルからの回収操作はそれぞれ実験プロトコール 1 と 2 に準じて行なった。

得られた 127 bp と 241 bp 断片をライゲーション後、Bam HI で切断し、フェノール抽出とエタノール沈殿を行なった。これを、Bam HI で切断後 CIP 処理した pBluescript II SK(-) とライゲーションし、大腸菌 (*E.coli* JM 109) を形質転換した。得られたコロニーからアルカリ-SDS法でプラスミド抽出を行い、1%アガロースゲル電気泳動及び5%PAGE等で確認した結果、2つのクローン (pBS-CE/AS-TR #12、26) を得た。

## B、感染性試験

### 1) cDNA接種試験 - 複製能の有無の検討

Aで作成した cDNA を含むプラスミド pBS-CE/HAS-TR1 を 10 ml の一晩培養液から QIAprep Spin Plasmid Kit で調製し、キュウリ (品種 ; 四葉) とトマト (品種 ; Rutgers) 各 10 本に接種した。

### (3) 実験結果

#### A、CE/AS-TRの感染性

Bam HI で切断したキメラウイロイド cDNA クローン pBS-CE/AS-TR1 をトマト及びキュウリに接種し、接種後 6 週間目まで病徴観察を行ったが異常は認められなかった。そこで、接种植物の上葉を刈り取り、ウイロイド抽出法 (実験プロトコール 6) に準じて 2M LiCl 可溶性核酸分画を得て、リターン PAGE と DIG 標識した CEVd の RNA プローブを用いてハイブリダイゼーション法 (実験プロトコール 7) により検定したが、キメラウイロイド CE/AS-TR の感染増殖は認められなかった。

キメラウイロイドの構築に問題があることも考えられたので、その塩基配列と 2 次構造を再度チェックした。その結果 PCR により置換した TASVd の TR ドメインの 5' 末端にもう一つ G を付加することにより、キメラウイロイド中の TASVd の TR

ドメインがより安定な構造をとり、TASVd中のTRドメインと同じ2次構造を取りうることが予想された(図2c)。そこでGを1つ余分に付加したPCRプライマーを作成し、先に作成したキメラウイルス cDNAクローン pBS-CE/AS-TR1を鋳型にPCRを行い改良キメラウイルス cDNAクローン pBS-CE/AS-TR2を作成した(図2c)。

組換え後、cDNAクローンの塩基配列を調べたところGが付加されていることが確認されたので、現在再度トマトとキュウリに接種する準備を進めており、引き続き検討を行う予定である。

## まとめと考察

### (1)、ウイロイドの組換えと2次構造について

本研究で得られた大きな成果の一つは、HSVdとCEVd間でその複製能を損なうことなく右末端領域 TRドメインの交換が可能であることを明らかにしたことである。HSVdとCEVdは現在ウイロイドの分類上、HSVdグループとCEVdグループという異なるウイロイドグループに分類されている (Elena *et al.* 1990)。今までオーストラリアのグループにより同じウイロイド (CEVd) の変異株間 (塩基配列相同性98%)、また我々の先の研究により同一グループ内 (PSTVdグループ) の2種類のウイロイド間 (CEVdとTASVd; 塩基配列相同性70%) で組換えを行った例が報告されているのみで、今回のように塩基配列相同性が僅か50%以下の異なるウイロイドグループ間で組換えに成功したのはこれが始めてである。

従来 *in vitro* mutagenesis の手法でウイロイドに点突然変異を導入して病原性の変化したミュータントを得ようという試みが盛んに行われた時期があったが、ミュータントの多くは複製能を喪失したものか、有っても継代中に野生型に戻ってしまったりして、安定なミュータントは極めて僅かしか得られていない。このような知見よりウイロイドのミュータントは取れにくいという一般的認識ができてしまったようだが、それに対し、今回 HSVdとCEVdの様な異なるウイロイドグループ間でも構造ドメイン単位であれば組換えが可能であることが示されたことは驚きである。このことはウイロイドの複製、機能発現にとって2次構造 (或いは高次構造) が極めて重要な意味を持つことを暗示している。つまり点突然変異であっても2次構造 (高次構造) 的に重大な変化を引き起こすものは致死的に働くのに対し、数十塩基からなる大きな領域 (ウイロイド分子全体の10%以上に相当する) でも安定に受け入れられる場合があり、後者の場合新たに生じた組換え体分子の2次構造 (高次構造) はその複製と機能発現に都合のよい構造を保っていると考えられる。

このことはウイロイドの分子進化という観点からも興味深い暗示を提示する。近年ブドウやカンキツ等から相次いで新しいウイロイドが分離されているが、これらウイロイドの多くが所謂「自然キメラ」と呼ばれる構造をしており、数種類の異種ウイロイドと部分的に極めて高い相同性を示すキメラ構造を持つことが報告されている。これらウイロイドが共通の祖先に由来することは明らかであるが、分子進化

という点から、(1) ある特定の領域が保存され、他の領域が集中的に変化して共通領域がキメラ状に残された。或は(2) 異種ウイロイド間で直接 RNA-RNA の組換えが起こりキメラウイロイドが生じた等、主に2通りの経路が考えられる(図6)。今迄のところどちらとも直接的な証拠はないが、本研究で示したように塩基配列相同性の低いウイロイドグループ間でも構造ドメインの交換が可能であるという事実は、(2) の経路が自然界でも充分起こり得ることを示唆している。今後、異種ウイロイドを重複感染させたようなモデル実験系で直接組換えが起こるか試してみることは興味深い実験と考えられる。

## (2)、ウイロイドの右末端領域(TRドメイン)の機能について

CE/HS-TR と HS/CE-TR の病原性と複製能の項で示したように、本研究で作出した2種類のキメラウイロイドは非常に興味深い病原性と複製能を示した。まず病原性という点において2種類のキメラウイロイドはTRドメイン以外の領域(全分子の80%以上を占める)が由来する親ウイロイドと基本的には同じ病原性を有していた。しかし、親ウイロイドと大きく異なる点は増殖量にあり、CE/HS-TR はCEVdに較べトマトで1/5程度、又、HS/CE-TR はHSVdに較べキュウリで1/5程度の増殖量であり、それぞれ発病は親ウイロイドの10倍希釈液と同程度と考えられた。このことは、従来その機能が明らかでなかったTRドメインがウイロイドの増殖量と関連していることを強く示唆し、増殖量を介して病原性に関与しているものと考えられる。今回の実験では増殖量が直接複製量と関与しているのか、或は細胞内の移行性等の要因も関わっているのか明確にできなかったが、今後プロトプラストへの感染実験等を行ないキメラウイロイドと親ウイロイドの複製能を細胞レベルで詳細に比較検討していく必要があると考えられる。特にCE/HS-TRをキュウリ、HS/CE-TRをトマトに接種した場合ほとんど感染増殖が認められないが、この変化が細胞中での複製能に由来するものかどうかプロトプラストへの感染実験等で確認する予定である。

HSVd - CEVd TR chimeras

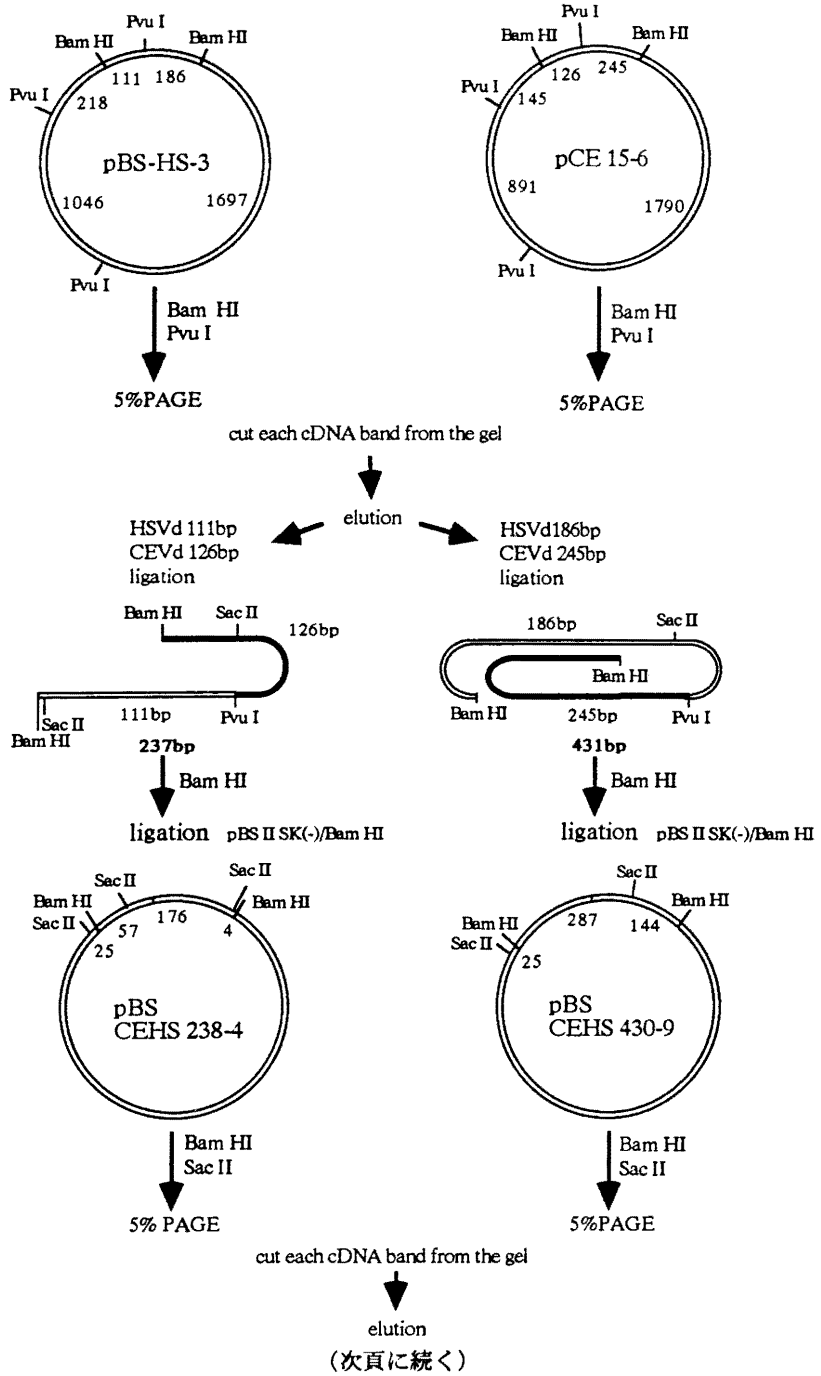
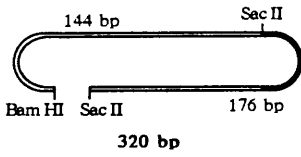


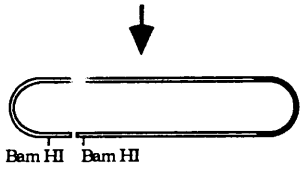
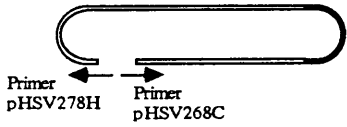
図 1 a

(つづき)

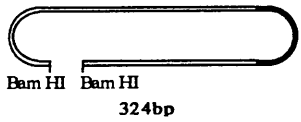
pBS CEHS 230 - 176bp  
pBS CEHS 430 - 144bp  
ligation



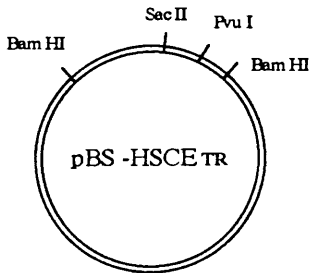
320 bp  
↓  
PCR



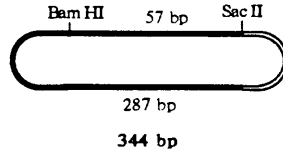
Bam HI  
↓



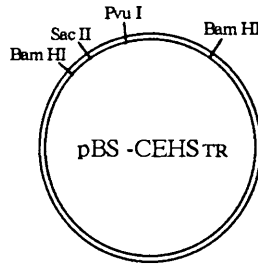
ligation pBS II SK(-)/Bam HI



pBS CEHS 230 - 57bp  
pBS CEHS 430 - 287bp  
ligation



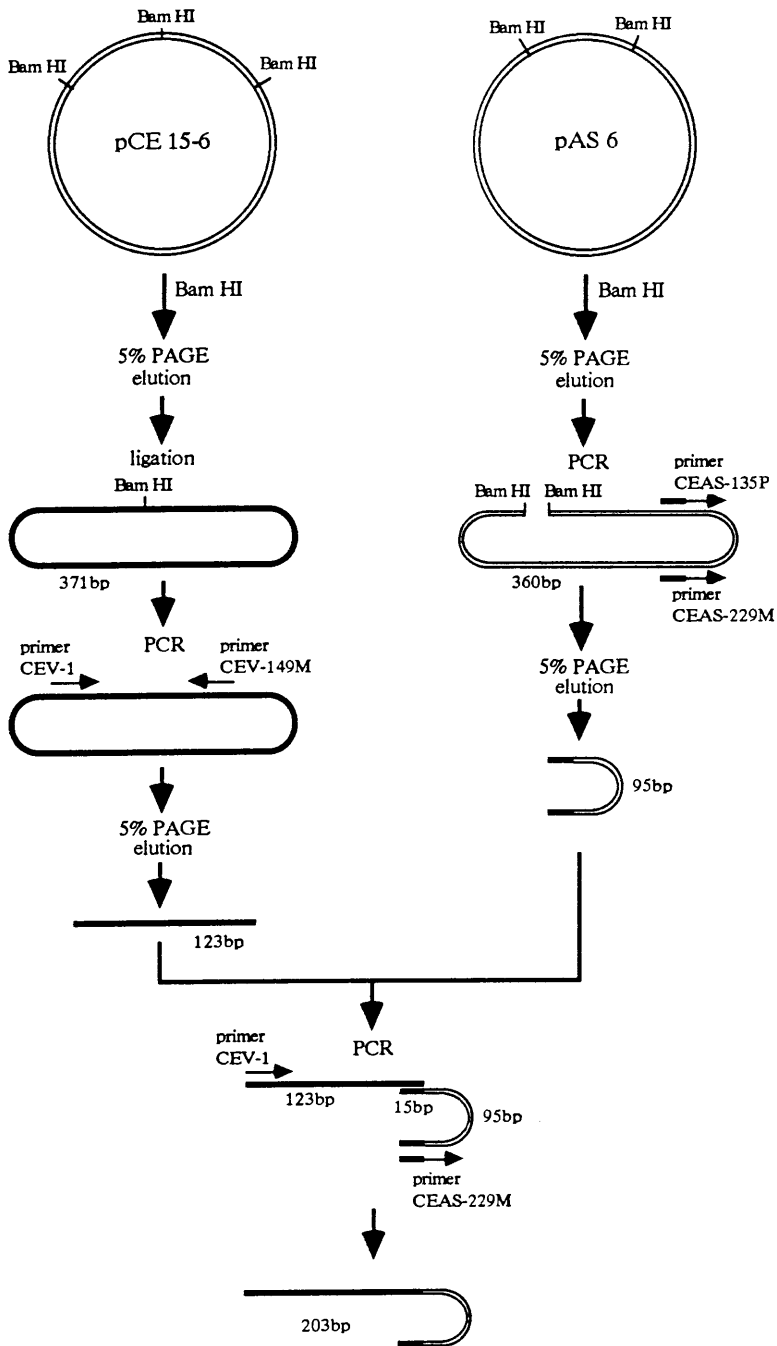
344 bp  
↓ Bam HI  
ligation pBS II SK(-)/Bam HI







### CEVd-TASVd-TR chimera



(次頁に続く)

図 2 a

(つづき)

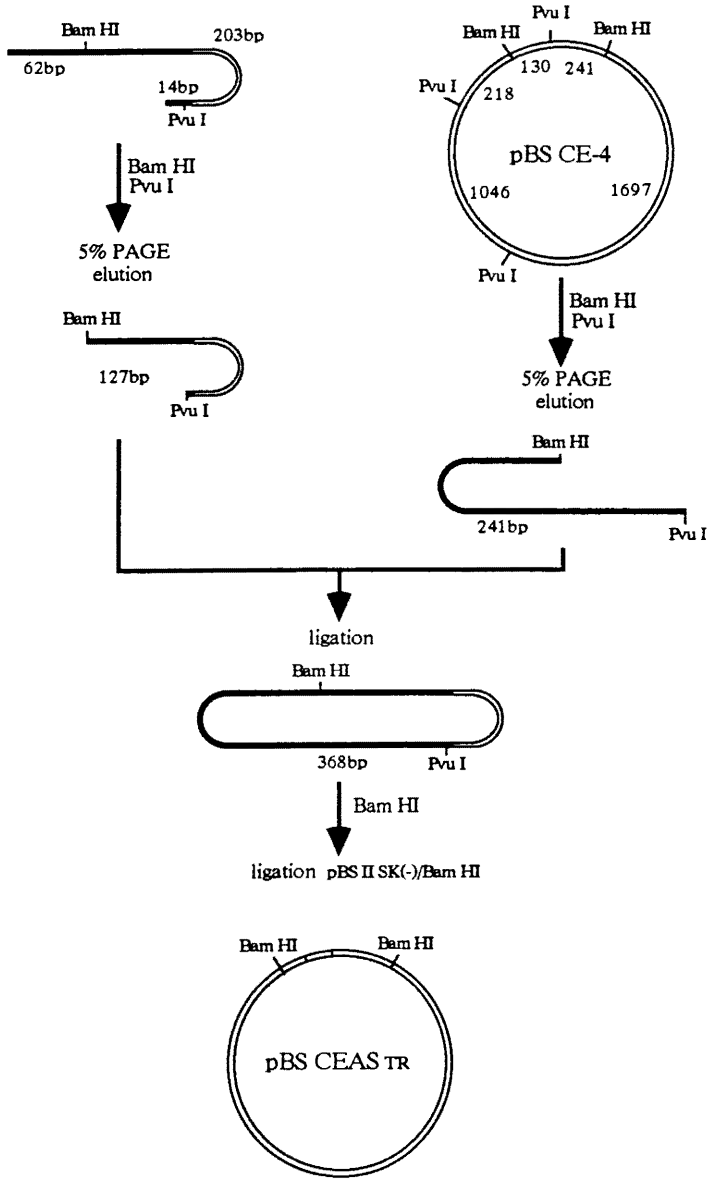


図 2 b



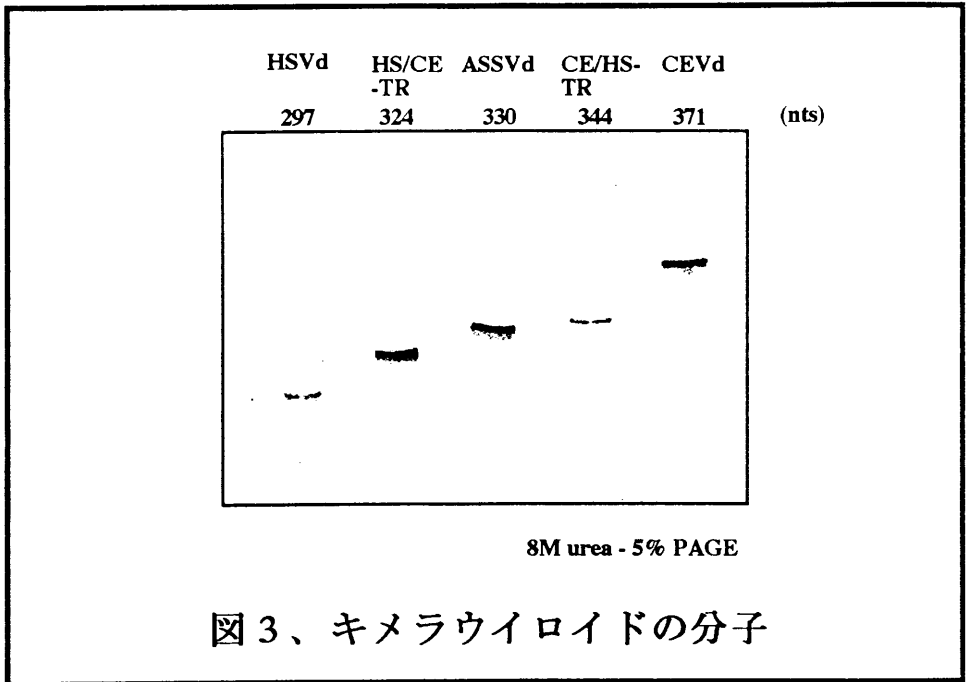


図 3、キメラウイロイドの分子

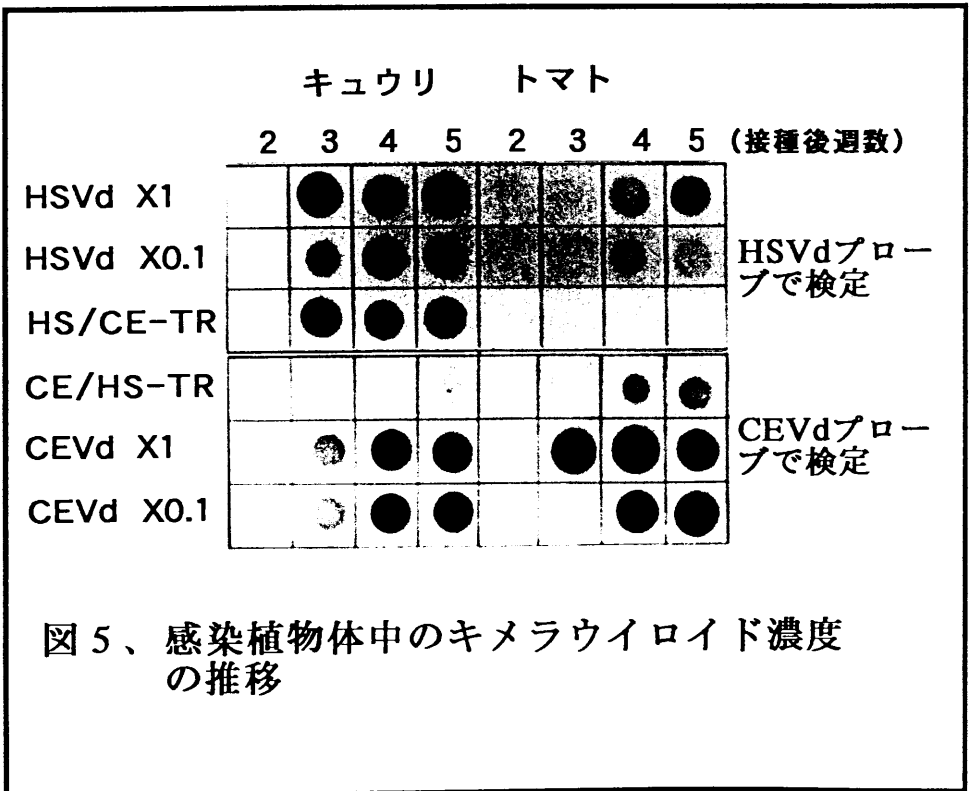
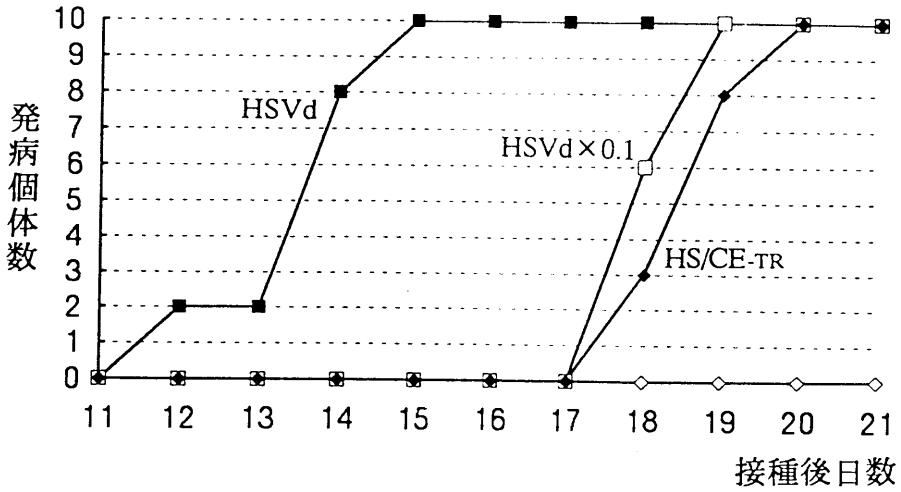


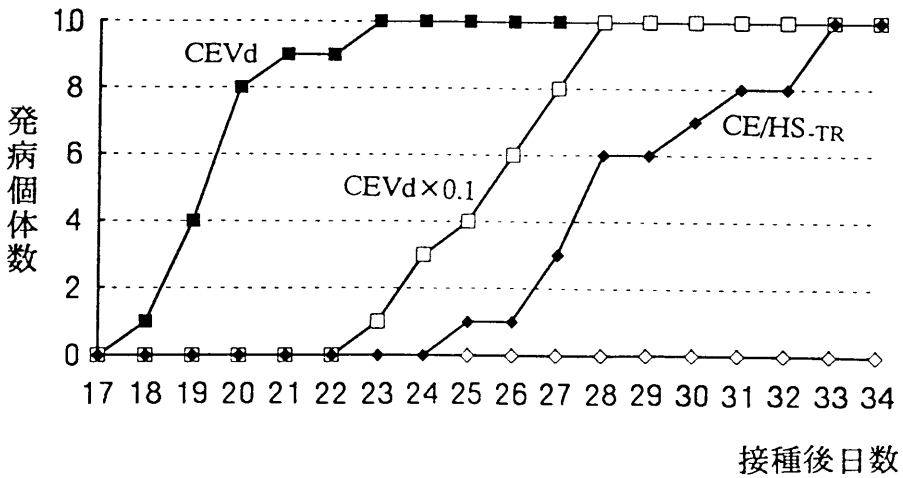
図 5、感染植物体中のキメラウイロイド濃度の推移

### キュウリ



\* CEVd, CE/HS-TR は無病徴

### トマト



\* HSVd, HS/CE-TR は無病徴

# ウイルスの分子分化のメカニズム

(I)

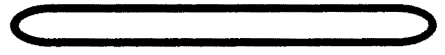


複製能を損なわない  
突然変異



変異株、系統の出現  
(複製能、病原性の変化)

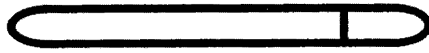
(II)



異種ウイルスの同一  
宿主への混合感染



RNA 組換え  
構造ドメイン等の置換



新しい型のウイルスの出現

複製能、病原性 及び  
宿主特異性の変化

図 6

## Double Restriction Enzyme Digestion of Plasmid DNA

使用する2種類の制限酵素の緩衝液の種類により、以下のように行うとよい。

(1) 緩衝液の種類が同じ或いは塩濃度が同じである場合 ---- 2種類の酵素で同時に処理する。

(2) 緩衝液の塩の種類が同じで濃度が異なる場合 ---- まず、塩濃度の低い酵素で3時間程度処理した後、塩濃度の高い酵素の緩衝液を添加して塩濃度を調節し、反応のスケールを2倍にして次の酵素で処理する。

(3) 緩衝液の種類が異なる場合 ---- 以下のように行う。

plasmid DNA soln.(40 ul) (pBS-HS-4 & pCE-15-6)

「ヌクレアーゼの除去」

+ TE 60 ul

+ 1M MgCl<sub>2</sub> 30 ul

on ice 5 min.

12,000 rpm 5 min.

sup

+ 100 ul phenol:chloroform(1:1), vortex 1 min.

12,000 rpm 1 min.

sup

+ diethyl ether 100 ul, vortex 10 sec.

12,000 rpm 10 sec.

aqueous phase (lower phase) (上のエーテル相を吸い出して捨てる)

+ diethyl ether 100 ul, vortex 10 sec.

12,000 rpm 10 sec.

aqueous phase (lower phase) (上のエーテル相を吸い出して捨てる)

+ 3M NaOAc 10 ul

+ 99% ethanol 250 ul

-20C, 1 hr (or over night)

12,000 rpm 10 min.

ppt

+ 70% ethanol 100 ul

12,000 rpm 10 sec.

ppt

+ 70% ethanol 100 ul

12,000 rpm 10 sec.

ppt

dry in aspirator 5 min.



「1st 制限酵素処理」

+ DW 43 ul  
vortex 30 sec.  
+ 10X Bam HI buffer 5 ul  
+ Bam HI 2 ul  
incubate 37C 3 hr.  
+ phenol:chloroform(1:1) 50 ul  
vortex 1 min.  
12,000 rpm 1 min.

sup

+ diethyl ether 50 ul, vortex 10 sec.  
12,000 rpm 10 sec.

aqueous phase (lower phase) (上のエーテル相を吸い出して捨てる)

+ 3M NaOAc 5 ul  
+ 99% ethanol 125 ul  
-20C, 1 hr (or over night)  
12,000 rpm 10 min.

ppt

+ 70% ethanol 100 ul  
12,000 rpm 10 sec.

ppt

dry in aspirator 5 min.

「2nd 制限酵素処理」

+ DW 43 ul  
vortex 30 sec.  
+ 10X Pvu I buffer 5 ul  
+ Pvu I 2 ul  
incubate 37C 3 hr.  
+ phenol:chloroform(1:1) 50 ul  
vortex 1 min.  
12,000 rpm 1 min.

sup

+ diethyl ether 50 ul, vortex 10 sec.  
12,000 rpm 10 sec.

aqueous phase (lower phase) (上のエーテル相を吸い出して捨てる)

+ 3M NaOAc 5 ul  
+ 99% ethanol 125 ul  
-20C, 1 hr (or over night)  
12,000 rpm 10 min.

ppt

+ 70% ethanol 100 ul  
12,000 rpm 10 sec.

ppt

dry in aspirator 5 min.

+ DW 10 ul  
+ dye 2 ul

「PAGE による分離へ」

## DNA断片をゲルから回収する方法

1、アルミホイル等の上にゲル片を置き、剃刀で1mm角に裁断し、微量遠心用チューブに移す。

\* ; 潰したりして細かくし過ぎると、後で低分子化したアクリルアミドがコンタミしてきて厄介なので、細かくし過ぎないように注意する。

2、DNA溶出用緩衝液 (0.5M 酢酸アンモニウム、1mM EDTA、0.1%SDS、pH7.5) 400 ulを入れ、37C インキュベーターに一晩静置する。

\* ; 振盪してもよい。

3、ピペットで溶液を吸い出し新しい微量遠心用チューブに移す。

4、エタノール1 mlを加え、-20 Cで1時間~1晩。

\* ; バンドが薄くて回収困難の場合はここで1 ulのグリコーゲンをキャリアーとして入れた方がよいが、その後でPCRを行なうときは、グリコーゲンがPCRの反応阻害をするので絶対に入れてはいけない。

5、12,000 rpm 10分遠心分離し、沈殿を吸わないように注意しながらエタノールをピペットで吸い出して捨てる。

6、70%エタノール洗浄を2回行う。

\* ; -20 Cで冷やしておいた70%エタノールを100 ul位入れ、軽く攪拌後直ぐ12,000 rpm 1分程度の遠心分離をしてエタノールを捨てる。この操作をエタノール洗浄 (wash) と言う。エタノール沈殿で除去しきれなかった塩、フェノールなどを除去するために行う。核酸の沈殿は70%エタノールには溶け出さないが、沈殿が浮くことがあるので、沈殿を無くさないように注意する。

7、アスピレーターに入れて、5分間乾燥させた後、適当量の滅菌蒸留水或いはTE緩衝液に溶かす。

\* ; 電気泳動に流すときは10 ul程度。

Ligationに使うときは10-20 ul程度が適当だが、DNA量が違い過ぎる時には加える液量を調整して大体同じ濃度になるようにした方がよい。

## ゲルから回収した DNA 断片の Ligation と PCR による増幅

### Ligation (Nippon Gene ligation Kit 使用の場合)

DNA fragment A (430-9;144 bp)	5*	ul	(out of 10 ul)
DNA fragment B (238-4;176 bp)	10*	ul	(out of 10 ul)
10X ligation buffer	2	ul	
T4 DNA ligase	0.5	ul	
BSA soln	2.5	ul	

- \*、DNA 断片 A と B の量 (モル比) が凡そ同じになるように液量で調節する。  
PAGE 後 Et-Br で 5 分程度染色して太くはっきり見えるバンドなら、半分量 (5 ul) 程度で充分。

Incubate 16C, for 6 hr.

Incubate 70C, for 10 min. to inactivate ligase.

### PCR

#### [Reaction Mixture]

ligated DNA soln	5	ul
10X PCR buffer	5	ul
1.25mM dNTPs	8	ul
primer pHSV278H (20pmol/ul)	1	ul
pHSV268C (20pmol/ul)	1	ul
Tth DNA polymerase (5U/ul)	0.5	ul *(0.25 ul でも充分)
DW	29.5	ul

#### [Cycle]

(94C, 4min.)

(94C, 1min.- 55C, 2min.-72C, 3min.) X 30 cycles

(72C, 7min.)

## トランスフォーメーション (形質転換)

### 「コンピテントセル (competent cell) の調製」

Hanahan *et. al.* (1985)

大腸菌(JM109) 一晚培養液 0.5 ml を50 ml の SOB培地\*に入れる。

↓ 37°C 振とう培養

OD600=0.4~0.6 (約2時間) になったら、遠沈管に移す。

↓ 氷上5~10分、3,500rpm 5分

沈殿

↓ TFB\*8mlを加え氷中で軽く攪拌しながら菌体を完全に懸濁する。

↓ 氷上15~20分、3,500rpm 5分

沈殿

↓ TFB1mlを加え氷中で軽く攪拌しながら菌体を完全に懸濁する。

↓ 氷上15~20分

コンピテントセル

\* 以上の操作は全て氷水中で行なう。

### \*SOB培地 (100 ml)

Bacto Tryptone	2	g
Bacto Yeast extract	0.5	g
1M NaCl	1	ml
1M KCl	0.25	ml
DW	up to	98 ml
↓ オートクレーブ		
1M MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1	ml
1M MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	ml

### \*TFB (transformation buffer) (100 ml)

Potassium acetate	0.344	g	(35 mM)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.735	g	(35 mM)
DW	80	ml	
Acetic acid (35mM)	4.15	ml	***
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.891	g	(45 mM)
RuCl	1.209	g	(100 mM)
Sucrose	15	g	(15%)
DW	up to	100	ml (pH 5.8)

↓ フィルター (MILEX 0.22 um等) 濾過

分注し、-20°C保存

\*\*\*100% 酢酸を201 ul 取り、DW 100 ml 加える。これを上記の容量使う。

### 「トランスフォーメーション」

ライゲーションしたDNA液 10 μl

コンピテントセル 100 μl

↓ 混合攪拌

↓ 氷中 60分

↓ 42°C 30秒

↓ SOC培地\* 250 μl

↓ 37°C 30~60分

プレート\*\*にまき、37°Cで1晩培養

\*SOC培地：SOB培地10mlに10% glucoseを0.36ml添加したもの (終濃度20mM)。

\*\*1.5% L B 寒天培地 (100 ml 当り、50mg/ml アンピシリン 100 ul、2% X-gal 100 ul、1M IPTG 10 - 20 ul)

## cDNA 接種試験方法

### 「菌の培養」

LB 培地 (+ 50ug/ml ampicillineを含む) 10 ml にプラスミド DNA を含む -80C 保存株 0.1 ml を接種し、37C 1 晩、振盪培養する (目盛り 8-9, 100-120 rpm)。

### 「プラスミド DNA 抽出」

QIA prep Spin Plasmid Kit でプラスミド DNA を抽出し、100 ul の DW か TE に溶かす。これで通常 20 ug 程度のプラスミド DNA が取れる。

### 「Bam HI 切断」

DNA soln.	42.5 ul	(10 ug 程度)
+ 10X buffer	5 ul	
+ BSA	0.5 ul	
+ Bam HI	2 ul	
37 C over night		
+ phenol:chloroform(1:1)	50 ul	
vortex	1 min.	
12,000 rpm	1 min.	
sup		
+ diethylether	50 ul	
vortex	10 sec.	
12,000 rpm	10 sec.	
aqueous phase (lower phase)		(上のエーテル相を吸い出して捨てる)
+ 3M NaOAc	5 ul	
+ ethanol	125 ul	
-20 C 1 hr or over night		
12,000 rpm	5 min.	
ppt		
+ 70% ethanol	100 ul	
12,000 rpm	1 min.	
ppt		
dry in aspirator		
+ DW or TE	100 ul	

### 「接種源の調製」

Bam HI digested plasmid DNA	100 ul
1M Tris.HCl, pH 7.5	40 ul
bentonite soln (10 mg/ml)	10 ul
DW	250 ul

### 「接種方法」

上記の接種源を、カーボランダムを振りかけたキュウリ及びトマトの子葉 1 枚当たり 10 ul ずつ接種する。接種はガラス棒でおこない、複数の接種源試料があるときには使い捨て手袋を着用する。接種後はただちに水でカーボランダムを洗い流したほうがよい。

## ウイルス抽出法

Plant tissue (10 g)

液体窒素で凍結させて、乳鉢中で粉状になるまで磨砕するか、或は、ワーリングブレンダーにそのまま入れる。

+ Extraction buffer \*1                    20 ml  
 + 2-melcaptoethanol                    0.1 ml  
 + 20% SDS                                0.1 ml

乳鉢と乳棒でさらに磨砕するか、或はワーリングブレンダーで 15,000 rpm、3分攪拌する。蓋付き 50 ml サンプリングチューブに移して、フェノール：クロロフォルム混液 (1:1) を 10 ml 添加して激しく攪拌 3 分するか、ワーリングブレンダーに入れた場合はカップに直接フェノール：クロロフォルム混液 (1:1) を 10 ml 添加してさらに 15,000 rpm、3分攪拌後、蓋付き 50 ml サンプリングチューブに移す。

3,000 rpm    20分

Sup (15 ml)

+ エタノール    30 ml    (2 倍量)  
 -30 C,            1 時間  
 3,000 rpm    30分

ppt

アスピレーター乾燥    5分

+ DW                                        1 ml                    vortex で完全に溶かす。  
 + 2.5 M  $K_2HPO_4$ , pH=8.3    1 ml  
 + 2-methoxyethanol            1 ml  
 攪拌    3分  
 3,000 rpm    30分

Sup

+ DW                    up to            10 ml  
 + 2% CTAB                                1 ml  
 軽く攪拌  
 氷上或は冷蔵庫で 30 分静置  
 3,000 rpm    30分

ppt

+ 70%エタノール -0.2 M 酢酸ナトリウム    4-5 ml, vortex  
 3,000 rpm    10分

ppt

アスピレーター乾燥    5分

+ DW                                        400 ul  
 vortex して完全に溶かしたら、微量遠心用チューブに移す。  
 + 4 M LiCl    400 ul  
 軽く攪拌して氷上或は冷蔵庫で 4 時間～一晚静置  
 12,000 rpm    5分

Sup

+ エタノール            1 ml  
 -30 C                    1 時間  
 10,000 rpm    5分

ppt

アスピレーター乾燥    5分  
 + DW    400 ul

- \*1、キュウリ、トマト、ホップ等からこのスケールで抽出する場合は、1M  $K_2HPO_4$  が良い。  
 一方、カンキツから抽出する場合、或いは 0.5 g 以下の組織から微量遠心機用のチューブを用いてミニスケールで行う場合は、下記緩衝液の方がよい。  
 0.13M Tris.HCl, pH8.9, 0.017MEDTA, pH7.0, 0.83% SDS, 5% PVP, 1M LiCl

DIG-RNA プローブによるハイブリダイゼーション  
1995. 3.24版

1、試料の調製

RNA solution	5	ul
formamide	10	ul
formaldehyde	3.5	ul
20X SSC	1	ul
DW	0.5	ul

68 C, 15分 加熱変性  
20倍SSCを20ul加えて、2ulをナイロンメンブレンにスポット (ハイボンドNを使用)  
80 C, 2時間 ベーキング (Vacuum 不要)

2、ハイブリダイゼーション

Pre-Hybridization & Hybridization buffer

Formamide	2.5	ml
Hybrid-buffer*1	0.625	ml
20%SDS	0.0313	ml (31.3 ul)
salmon sperm DNA (10mg/ml)	0.075	ml (75 ul)
yeast-tRNA (100mg/ml)	0.020	ml (20 ul)
DW	1.749	ml
50% Dextran Sulfate	1.25	ml

\*1: Hybrid-buffer (1.8M NaCl - 0.2M NaCacodylate - 10 mM EDTA) 100 ml

NaCl	10.5	g
Sodium Cacodylate (MW 214.02)	3.64	g
Cacodylic Acid (MW 138.00)	0.414	g
EDTA-2Na	0.372	g

(1) pre-hybridization

hybridization 液にメンブレンを入れ、55 C、1～4時間。  
(5 ml / 30 cm<sup>2</sup>)位で充分

(2) hybridization

新しい hybridization 液に熱変性したDIG-RNA プローブ\*<sup>1</sup>を加える。  
(2-5 ul / 5 ml hybridization 液で充分)

\*<sup>1</sup>熱変性は100 C, 1分で最初に使用する時1回やれば後はやらなくてよい。また全くやらなくてもよい。

55 C, 1晩

プローブ・ハイブリダイゼーション液は再使用できるので回収し - 20 °Cに保存しておくが良い。

(3) Washing

2X SSC room temp. 10 min X 2 (各 70 ml)  
2X SSC - 1ug/ml RNase A room temp. 15 min X 1 (各 5 ml)  
2X SSC 5 ml に 10 mg/ml RNase A を 0.5 ul 入れる。  
0.1X SSC - 0.1% SDS 65 C, 10 min X 2 (各100 ml)

### 3、ケミルミ検出 (Chemiluminescent Detection Kit, Boehringer Mannheim)

1. Washing buffer にメンブレンを入れ、ゆっくり 5 分間攪拌  
(100 ml / 100 cm<sup>2</sup>)

Washing buffer; buffer 1 + Tween-20, 0.3%(W/V)  
buffer 1; 0.1M maleic acid - 0.15 M NaCl; pH7.5 with NaOH  
(autoclave)

2. buffer 2 にメンブレンを入れ、室温で 30 分間ゆっくり攪拌  
(100 ml / 100 cm<sup>2</sup>)

buffer 2; blocking stock solution を buffer 1 で 10 倍希釈  
blocking stock solution; blocking reagent, 10% (W/V) in buffer 1  
(autoclaved and stored at 4 C)

3. anti-DIG-AP, Fab fragments を buffer 2 で 10000 倍希釈 (75 mU/ml)  
\*希釈した anti-DIG-AP, Fab fragments は 4 C で 12 時間安定
4. 3 で作成した溶液にメンブレンを入れ、室温で 30 分間ゆっくり攪拌  
(20 ml / 100 cm<sup>2</sup>)
5. washing buffer にメンブレンを入れゆっくり攪拌、室温 15 分、2 回  
(100 ml / 100 cm<sup>2</sup>)
6. buffer 3 に入れ、室温でゆっくり攪拌、2-5 分 (20 ml / 100 cm<sup>2</sup>)

buffer 3; 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl<sub>2</sub>; pH9.5

1M Tris-HCl pH9.5	3	ml
1M NaCl	3	ml
1M MgCl <sub>2</sub>	1.5	ml
DW	22.5	ml

7. ハイブリシートでナイロンメンブレンを挟み、上のシートを持ち上げて、  
CSPD star (ready to use) 100 ul 程度 (マイクロプレートのサイズまでなら  
これで充分) をメンブレンに均一にたらす。
8. 上のシートを端からゆっくり下ろして発光基質液をメンブレン全体に行き渡らす。  
もう一度ゆっくりシートを挙げ、ゆっくり下ろす。これを 2 回繰り返す。
10. メンブレンをシールし、37 C で 5-15 分ブレインキュベートする。  
----- 以下暗室操作 -----
11. シールしたメンブレンをハイパーフィルムと密着させ、室温で 30 分〜数  
時間静置する。
12. フィルム現像、レンドールで 20 C、3 分。
13. 定着、フジフィックスで 5 分。水洗、流水で 30 分。



#### 4、プローブの調製

(1) プローブ用プラスミドDNA (QIAprep Spin Plasmid Kit等で抽出) の制限酵素切断

Not I 等で切断

DNA solution	a	ul	
10X buffer	5	ul	
Restriction enzyme	2	ul	(10-20 U)
DW	43-a	ul	

37 C、数時間

+ 100 ul phenol:chloroform (1:1)

vortex mixer 3 min, centrifuge 10000 rpm 3 min

sup (上清を新しいチューブに回収 --- 中間層を吸い込まないように注意)

+ 100 ul phenol:chloroform (1:1)

vortex mixer 3 min, centrifuge 10000 rpm 3 min

sup (上清を新しいチューブに回収 --- 中間層を吸い込まないように注意)

+ 10 ul 3M NaOAc (sodium acetate)

+ 250 ul Et-OH(99.5%)

-30 C で1晩保存

centrifuge 10000 rpm 10 min

ppt (沈殿)

+ 100 ul 70% Et-OH, 0.2M NaOAc

vortex mixer で軽く (10 秒) 攪拌

+ 10000 rpm 5 min

ppt

+ 100 ul 70% Et-OH, 0.2M NaOAc

vortex mixer で軽く (10 秒) 攪拌

+ 10000 rpm 5 min

ppt

アスピレーターで乾燥 5 min

+ DW 20 ul

1 ul を取り、1%アガロースゲル電気泳動で切れているかどうか確認する。制限酵素処理していない試料を隣のレーンで泳動し比較する。切れていたら、DIG RNA probe 作成へ。また、 $\lambda$ /Hind III 等を同時に流しておおよそのプラスミド量をここで定量する。

(2) DIG 標識反応

DNA soln ( Not I digested)	a	ul	(1 ug)
DIG NTP labeling mixture (10X;BMY)	2	ul	
5X T7 buffer (BRL)	4	ul	
0.1 M DTT	1	ul	
DW	11.5	- a	ul
RNase Inhibitor (TAKARA;110U/ul)	0.5	ul	
T7 RNA polymerase (50U/ul;BRL)	1	ul	

--- 37 C, 2 hr ---

+ 2 ul 0.2M EDTA, pH 8.0

+ 2.5 ul 4M LiCl

+ 75 ul Et-OH

- 30 C, over night

13000 rpm, 10 min

ppt

+ 50 ul 70% Et-OH, 0.2M NaOAc

13000 rpm, 1 min

ppt

アスピレーターで乾燥 5 min

+ 100 ul DW

+ 0.2 ul (22U) RNase Inhibitor

37 C, 30 min

DIG RNA プローブ

(3) 確認

2 ul とり dye 2 ul を混ぜ、5% PAGE で泳動する。対照に template DNA 1 ul を泳動比較。泳動後、銀染色等で転写された RNA を確認する。

準備するもの

- 1、DIG-RNAラベリングミックスチャー (BMY)
- 2、DIGルミネッセントデテクションキット、核酸用 (BMY)
- 3、T7 RNA ポリメラーゼか T3 RNAポリメラーゼ (反应用緩衝液は添付されてくる。何処のでもよい。)
- 4、X線フィルムかハイパーフィルム
- 5、ハイボンド N (N<sup>+</sup>ではない)
- 6、RNase Inhibitor

## DIG Taq Cycle Sequencing プロトコール

### 「鑄型プラスミド DNA の調製」

5 ml の大腸菌 6 時間培養液から QIAprep Spin Plasmid kit でプラスミド DNA を抽出し、100 ul の DW 或は TE に溶かした。pBluescript II SK(-) の場合これで通常 20 ug 程度のプラスミド DNA が抽出できる。

### 「シーケンス反応」

ベーリンガー社のキットを用い、下記のように行なった

上記のプラスミド溶液 15 ul (100 ul のうち) ; 約 3 ug 相当

+ 3M NaOAc 1.5 ul  
 + ethanol 37.5 ul  
 -20C 1hr - over night  
 12,000 rpm 5 min.

ppt

+ 70% cold ethanol 100 ul mix  
 10,000 rpm 10 sec.

ppt

+ 70% cold ethanol 100 ul mix  
 10,000 rpm 10 sec.

ppt

dry in aspirator 5 min.  
 + DW 16 ul  
 + DIG-primer (sequencing or reverse) 1 ul  
 + reaction buffer 2 ul  
 + Taq polymerase 1 ul

divide 4 ul each into 4 tubes, then mix with 2 ul each of ddG, ddA, ddT or ddC

\* 予め、4 本のチューブに G, A, T, C のマークを付けて、ddG, ddA, ddT, ddC の順に各 2 ul を入れて、氷水に漬けておくとよい。

mix

10,000 rpm 10 sec.  
 + mineral oil 1 drop

PCR

95C-4 min. 1 cycle  
 94C-36sec., 55C-1min 24sec., 72C-1min. 17 cycles  
 94C-36sec., 72C-1min 24sec. 13 cycles  
 4C soak file  
 + stop solution 2 ul  
 mix then on ice

### 「シークエンスゲル」

- 1、5%PAGE (acrylamide:bisacrylamide= 19:1) を以下のように調合する。

40% acrylamide stock solution (19:1)	5	ml
10x TBE	4	ml
urea	20	g
DW	15	ml
10% APS	0.2	ml
TEMED	0.02	ml
- 2、シークエンス用ゲル板を発泡スチロール箱等に乗せ水平な所に置く。
- 3、ゲル板に汚れのないことを確かめ、アルコールを浸した濾紙でゲル板表面を丁寧に拭く（油等の汚れを取るため）。
- 4、耳のある方のゲル板表面はさらに少量（100 ul 位）の Sigma Coat 液を浸した濾紙で1回軽く拭く（泳動後ゲル板が剥がれ易くするため）。
- 5、スライド法等でゲルを作製する。
- 6、サンプルコームの上に 500 ml 程度のメジューム瓶を2つ重石に乗せ、1晩静置する。
- 7、ゲル装置にセットし、1倍 TBE 緩衝液 800 ml を上下の泳動槽に入れる。
- 8、サンプルコーム（シャークテイスコーム）を抜き、逆さに刺す。
- 9、シークエンス試料からミネラルオイルを除去し、別のチューブに移し、90 C, 3 min. 加熱変性後、氷水に入れ急冷する。
- 10、スポイトでゲルのサンプルウェルに緩衝液を吹き付けゲルから染み出てきた尿素を除去した後、変性した試料を 4 ul ずつゲルに積む。  
8 ul 全部積んでもよい。  
また必要なら、時間をずらして残りの 4 ul を積む。
- 11、1600 V, 20 mA にセットして泳動する。  
泳動距離は以下を目安にする。

リバースプライマーで	pBlue Script	を読むとき	XC= 36 cm
	pGEM	を読むとき	XC= 38 cm
シークエンスプライマーで	pBlue Script	を読むとき	XC= 42 cm
	pGEM	を読むとき	XC= 28 cm

### 「メンブレンへのトランスファー」

- 1、泳動終了後耳のある方のゲル板を上にして剥がす。
- 2、サンプルを流したレーンの両端 1 cm ずつ、及びゲルの下端から上方 26 cm を残し、周囲をカミソリ等で切って除去する。---- サイズ A
- 3、サイズAより、上下各0.5cm 左右各1cm大きいワットマン3MMを2のゲルに張り付け、全面を軽く押しつける（ピペットかガラス棒を転がすとよい）。
- 4、端から濾紙と共にゲルをガラス板から剥がし、平らな板上にゲルが上になるように置く。
- 5、ゲルの上にサイズAと長さと同じ巾がそれぞれ1cm（両端が各0.5cmずつ）ずつ狭いプラスチックチャージナイロンメンブレンを置き、ピペット等を転がし気泡を除く。
- 6、そのままキャピラリーブロッターに乗せ、一番下の濾紙とウィッキング部

位に気泡がないようにピペット等を転がし気泡を除く。

\*キャピラリープロッターは、ウイッキング部位にアルコールをかけてよく洗った後、0.5 x TBE 500 ml をウイッキング部位にかけながら注ぎ入れる。

- 7、上にメンブレンよりさらに上下左右各 0.5 ml ずつ小さいワットマン 3MM、及びそれと同じサイズのプロッタータオルを 5 枚重ねておく。
- 8、キャピラリープロッターの蓋をして、さらにその上に 500 ml のメジューム瓶を 2 つ重石に乗せ、1 晩静置する。

### 「化学発光によるバンドの検出」

- 1、メンブレンをゲルより剥がす。

\*この時トランスファーがうまく言っていれば、ゲル中のXC色素がメンブレンフィルターだけでなく、プロッタータオルの 2 枚目位まで染み通っているはず。

- 2、メンブレンフィルターをラップで挟み、UV クロスリンカーに入れて、エネルギー 1200 (x 100 uJ/cm<sup>2</sup>) で処理する。
- 3、ナイロンバックに 1ヶ所口を開けてシールし、以下の手順で化学発光処理を行なう。  
なお、詳細は DIG-RNA プローブの発光の手順を参照する。

Washing buffer	20 ml	3 min.
Buffer 2	20 ml	15 min.
Buffer 2 + Anti-DIG-F(ab)-AP	10 ml(+ 2 ul)	15 min.
Washing buffer	30 ml x 2	10 min. x 2
Buffer 3	20 ml	3 min.
lumigen diluted 1/5 in buffer 3	1 ml	

- 4、Buffer 3 を処理したら、メンブレンフィルターをナイロンバックより取りだし、新しいナイロンシートの上に挟み、上のシートを持ち上げて、メンブレンフィルターの上に上記の希釈した lumigen 液をマイクロピペット等で全面に均等にたらす。
- 5、上のシートを端からゆっくり下ろして lumigen 希釈液をメンブレンの全体に行き渡らす。もう一度ゆっくりシートを上げ、ゆっくり下ろす。これを 2 回位繰り返す。
- 6、上から押して余分の液を追い出し 4 方をシールする。  
\*この時中央にシワができないように注意する。
- 7、暗室でハイパーフィルムに密着させカセットにいれ、室温で 6 時間露光する。
- 8、20°C のレンドールで現像 3 分 (像が濃すぎたら短くするが、3 分以上はバックグラウンドが上がるので効果がない)、フジフィックスで定着 10 分程度、水洗 30 分程度を行なう。