

令和3年度 DNA 塩基配列の解読と情報科学

担当教員：高野博嘉・中山由紀・高宗和史

【実習概要】

プラスミド DNA 抽出、シーケンス反応、および得られた DNA 塩基配列結果の解析を行うのが本実習の目的である。ただ、コロナの再流行がいつ起こるかわからない状況で3密を避けた方が良くことから、シーケンス反応の実習部分はビデオ視聴に切り換えることにした。シーケンスによる塩基配列の解析については、こちらで用意した別々のシーケンスデータを各自に送るので、TAと共にそれを解析し、11月の9日と10日にZoomで発表する。

【提出物とレポート】

- Moodle上のビデオを見てプラスミド抽出の手順と原理についてレポートとしてまとめ、**10月25日（月）17時**までにMoodleの「生物学実験D」・トピック「DNA塩基配列の解読と情報科学」の中の「レポート提出場所（その1）」に提出すること。
- 発表原稿を入れたパワーポイントのプレゼンテーションファイルを**11月5日（金）17時**までにMoodleの「生物学実験D」・トピック「DNA塩基配列の解読と情報科学」の中の「スライド提出場所」に提出すること。
- DNA塩基配列決定法の原理について図表を使わずに文章だけで説明したレポートを作成し、**11月26日（金）17時**までにMoodleの「生物学実験D」・トピック「DNA塩基配列の解読と情報科学」の中の「レポート提出場所（その2）」に提出すること。

【実習スケジュール】

- | | |
|--------------|---|
| 10月19日（火）1日目 | 3限から開始。Zoomによる実習ガイダンス、引き続きプラスミド抽出からDNAシーケンスまでの操作についてビデオを用いて説明。その後、プラスミド抽出の手順と原理についてのレポート作成。 |
| 10月20日（水）2日目 | ZoomによるDNAシーケンス解析法の説明、および各自に与えられたDNAシーケンス結果の解析 |
| 10月27日（水）3日目 | 各自が行なった解析結果の発表準備（パワーポイントによるスライド作成） |
| 10月28日（木）4日目 | 発表の練習 |
| 11月9日（火）5日目 | 3限スタート。Zoomでのプレゼンテーション |
| 11月10日（水）6日目 | Zoomでのプレゼンテーション |

【参考資料】

- 1) DNA Sequence (DNA シーケンス) : デオキシヌクレオチドの塩基配列決定
(本資料の末尾に掲載)
- 2) サンガー法 (di-deoxy 法) の原著論文 PNAS, 1977 (前期の基礎購読で配布済)

【遺伝子に関する発見等の歴史】

- 1865年 メンデルが形質決める粒子が存在すること (今でいう遺伝子) を示唆
- 1903年 サットンの染色体説
- 1906年 ベイトソンが”粒子“を遺伝子 gene という用語で説明し始める (genetics も彼の造語)
- 1953年 J. ワトソンと F. クリック 「DNA 二重らせん構造」を発表
- 1956年 A. コーンバーグによる DNA ポリメラーゼの発見
- 1977年 酵素法 (F. サンガー) と化学分解法 (A. マクサムと W. ギルバート) による DNA 塩基配列決定法の確立
- 1990年 「ヒトゲノムプロジェクト」の計画発表
- 2000年 「ヒトゲノム」ドラフト発表
- 2003年 「ヒトゲノム」完全版を公開
- 2017年 現在、次世代シーケンサーを用いることにより、十数万円くらいの費用で数日間でヒトゲノムが解析できるようになっている。

プラスミド DNA 抽出から DNA シーケンスまで（ビデオ）

[1] プラスミドの少量調整

抗生物質入りの培地でプラスミドを含む大腸菌を培養し、プラスミド抽出用キット（Wizard Plus SV minipreps DNA Purification System : Promega）を用いて、プラスミドを回収する。

1. 6g のプラスグロウ（ナカライテスク社）を 150ml の超純水に入れて溶かし、オートクレーブする。
2. 適宜対応する抗生物質を加える。
3. 作成したプラスグロウ培地 20ml に大腸菌を植え付ける。
4. 37℃で 14～16 時間振とうし、培養する。
5. 培養液をピペットを用いて 1.5ml チューブに移し、室温、15000rpm で 1 分間遠心し、ペレットにした後ピペットマンで上清を取り除く。
6. Cell Resuspension Solution (CRA; キット付属) を 250 μ l 加え、ピペッティングして完全に懸濁する。
7. Cell Lysis Solution (CLA; キット付属) を 250 μ l、Alkaline Protease Solution (キット付属) を 10 μ l 加え、穏やかに転倒混和し、室温で 5 分間インキュベートする。
8. Neutralization Solution (NSB; キット付属) を 350 μ l 加え、穏やかに転倒混和する。
9. 室温、15000rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5ml チューブに移す。
10. 上清の入った 1.5ml チューブを室温、15000rpm で 2 分間遠心する。
11. 沈殿を吸わないように、上清をカラム（キット付属）に移し、室温、15000rpm で 1 分間遠心する。
12. フロースルーをデカントで捨て、Column Wash Solution (CWS; キット付属) 750 μ l をカラムに入れ、室温、15000rpm で 1 分間遠心する。
13. フロースルーをデカントで捨て、CWS250 μ l をカラムに入れ、室温、15000rpm で 2 分間遠心する。
14. CWS の液を持ち込まないようにカラムを新しい 1.5ml チューブに入れ、Nuclease-Free Water（キット付属）を 30 μ l 加えて 5 分程静置する。その後室温、15000rpm で 1 分間遠心する。
15. Nuclease-Free Water を 20 μ l 加えて 5 分程静置し、室温、15000rpm で 1 分間遠心する。
16. フロースルーをプラスミド DNA 溶液として回収する。

[2] DNA の定量、制限酵素反応、電気泳動によるチェック

塩基配列を決定するサンプルの DNA 濃度を調べる

1. UV 定量 : DNA 溶液の吸光度を測定し、DNA 濃度と全 DNA 量を決定する。
2. 制限酵素反応 : 0.5 μ g を制限酵素で処理する。

例) DNA 0.5 μ g

10x Buffer 1 μ l

酵素 1 μ l

滅菌水で total 10 μ l にして、37 度で 1 時間インキュベートする。

3. ゲルの作成: フラスコに 0.5 \times TAE (20 mM Tris-acetate、0.5 mM EDTA) と 1% のアガロースが入れ、電子レンジで加熱して溶かす。少し冷めたらゲル作製トレイに注ぎ、室温で固まるまで置く。攪拌により液が噴き出す危険性があるので、注意すること。また、ゲルがきちんと固まっていないと、コームを抜く際にゲルに穴が空いてしまうので注意すること。
4. 電気泳動: サンプルの DNA と一緒に既知の濃度の DNA をアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで DNA を染色する。

DNA と試薬を以下のように混合する。

制限酵素処理した plasmid DNA 5 μ l

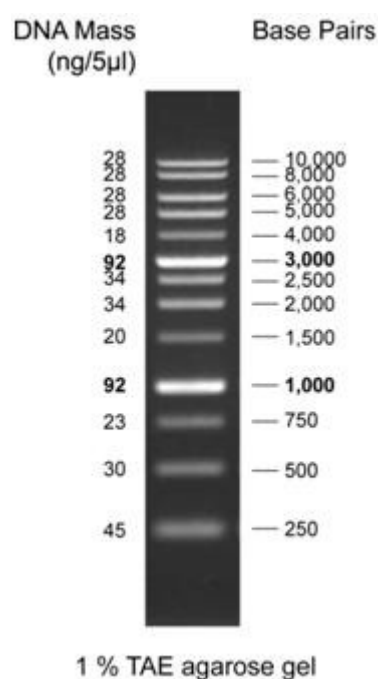
色素溶液 1 μ l

計 6 μ l

全量を 1%アガロースゲルで電気泳動する。サンプルのとなりのレーンに、Kb ラダーマーカー 5 μ l を泳動する。

5. ゲルの染色 : 泳動後、ゲルを 10 分間エチジウムブロマイド溶液で染色し、ゲルに紫外線を当てて写真を撮る。

マーカーDNA の蛍光強度から、UV 定量から算出した DNA 濃度が合っているか確認する。



[3] DNA シークエンス

ベックマン社の Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit を用いてシーケンス反応を行う。

1. プラスミド DNA が 400 ng 含まれるようにそれぞれの濃度に合わせて全量が 11 μ l になるように滅菌水で調製して PCR 用 200 μ l チューブに入れる。
2. 3.2 μ M に調製した各プライマーを 1 μ l、Quick start master mix (キット付属) を 4 μ l 加え、よく混ぜる。この後は、試料は極力遮光しておく。
3. 以下の条件で PCR を行う。

96°C denature (plasmid DNA の変性)	3 分	
↓		
96°C denature (plasmid DNA の変性)	20 秒	} 30cycle
50°C annealing (plasmid DNA と primer の塩基対形成)	20 秒	
60°C extention (DNA polymerase による反応)	4 分	
4°C	∞	

4. シークエンス反応後のサンプルを新しい 1.5 ml チューブに移す。
5. シークエンス反応後のサンプルに、以下の試薬を加える。

3M NaOAc	2 μ l
0.2M EDTA	1 μ l
グリコーゲン	1 μ l
滅菌水	1 μ l
Total	5 μ l

6. 99%エタノールを 60 μ l 加える。
7. 4°C、15,000 rpm、15 min 遠心。
8. ピペットマンを用いて上清を注意深く取り除く。
9. 70% エタノールを 700 μ l 加える。
10. 4°C、15,000 rpm、5 min 遠心。
11. ピペットマンを用いて上清を注意深く取り除く。(上清が残らないように、しっかりと取り除く。)
12. 乾燥するまで 10-15 分間放置する。この時、試料をアルミホイルで覆い、遮光しておく。
13. 沈殿に SLS 液 (キット付属) を 30 μ l 加え、ピペットマンを用いてよく混ぜる。
14. サンプルを 96 穴プレートに移す。サンプルの上からミネラルオイルを一滴落す。ベックマンの自動シーケンサーにサンプルをセットし、解析をスタートする (8 サンプルが約 2 時間)。

シーケンスの解析とインターネットを用いた解析

塩基配列の入力とアミノ酸への翻訳・インターネット検索

1. 塩基配列が綺麗に読めているか、シーケンスのピークをよく見る。
2. シーケンスのピークを元に、塩基配列のテキストファイルの修正を行う。
 - ・うまくシーケンスできていても読み始めのところで、最後付近は結構曖昧になっている。
 - ・特に後半で、全くピークが見られないのに塩基配列が出てきている箇所は、テキストファイルの塩基配列から除去し、間違いのない塩基配列だけにする。
 - ・波形データを元に、塩基配列を訂正し、できるだけ長く読んでみる。
3. 塩基配列を決定したら、テキストファイルに名前を付けて保存する。
4. インターネットで、DDBJ (DNA data Bank of Japan) にアクセスする。NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> にアクセスしても可 (英語)。検索・解析から、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を選ぶ。まずは、blastn (nucleotide blast) を使い、インターネット上で公開されている全てのデータに関して、クエリー (自分のデータ) DNA - 検索対象 DNA での相同性検索を行う。
5. 結果から、シーケンスしたプラスミド DNA に何が入っていたのかを推測する。自分の配列データと検索対象の DNA の間で大幅な違いがないか、1~数塩基の塩基置換がないか、詳細に調べる。塩基置換等がある時は、それを塩基配列の印刷データに書き込んで行く。自分の塩基配列データが 100% マッチしていれば、シーケンスした配列が検索結果のものと同じだということができる。公開データに自分の塩基配列データを合わせてしまわないこと。自分の塩基配列データを詳細に検討すること。
6. 出てきた塩基配列の全領域について、何に由来している DNA なのかを特定し、塩基配列の印刷データに書き込んで行く。

次のようなものが考えられる

 - ・ タンパク質 (アミノ酸) コード領域
 - ・ 5' または 3' 非翻訳領域
 - ・ プモローターまたはターミネーター領域
 - ・ DNA クローン化のために用いたプラスミド・ベクター
7. 相同性検索ででてきた配列と自分の配列データを並べてみて、もしある箇所から大幅な違いがあった場合、その原因を考察する。
 - ・ 自分の配列データに間違いがないか、シーケンスのピークを見直す。
 - ・ シーケンスが間違いでない場合、ベクター配列かもしれない。
8. "expasy" & "translate" で検索すると、DNA をタンパク質に翻訳するツール

(Trnaslate tool - Expasy)が見つかる。自分の塩基配列データをアミノ酸配列にしてみる。遺伝コードは Standard にして全 6 フレームでアミノ酸に変換する。アミノ酸が切れ目なくつながるフレームがあれば、それがタンパク質として発現している可能性が高い。この配列をコピーして、アミノ酸配列のファイルを作る。

- ・ 短いアミノ酸配列しかでてこない場合は、フレームシフトを疑ってみる。
- ・ Blastx でサーチすると、フレームシフトの位置がわかるかもしれない。

9. アミノ酸配列を用い、blastp (protein blast)でホモロジー検索を行う。

10. 相同検索 5 と 9 から、シーケンスした塩基配列は、タンパク質におけるアミノ酸配列のどこの部分なのか、を明らかにする。アミノ酸の置換が起きている場合は、その原因を考察する。

続いて、今回解析した遺伝子がどのような働きをもっているのかを調べる。

解析した遺伝子がタンパク質をコードしていた場合は、以下を行う。

11. データベース上から、シーケンスデータの遺伝子のコードする全アミノ酸配列を取得する。アクセッションナンバーをクリックできるはずなので、そこをクリックして、そのアミノ酸配列の情報を得る。部分配列が登録されていることも多いので、それらは排除し、全長アミノ酸領域を持つアクセッションを見つけ出す。全長アミノ酸配列をコピーし、新たなファイル名をつけて(遺伝子の名前が望ましい)、保存する。

12. 全長のアミノ酸配列(タンパク質の配列)をもう一度 protein blast にかけることで、全長における機能ドメインを調べることや、色々な生物における相同なタンパク質の有無などを調べることができる。

NCBI や Expasy プログラム (<http://www.expasy.ch/>) で更に解析を行う。

NCBI でサーチすれば、アクセッションの情報を表示しているページの右側に色々な解析ツールもあるので利用することが可能。

13. 解析した遺伝子はどんな働きをするのか、文献を用いて調べる。PubMed

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で関連文献を検索し、論文の要旨を読み、発表に備える。文献検索については、前期の基礎購読で行なっている。

プレゼンテーション

プレゼンテーションにおける課題（スライド内に以下を含めること）

1. 実験の目的と今回用いたダイターミネーター法の原理の説明を含める。図などを引用する際は、必ず引用元の表示を行うこと。

2. DNA 塩基配列について

- ・ 読めた塩基配列を示す。
- ・ 塩基配列内でタンパク質をコードしていると考えられる個所があれば、そのアミノ酸配列も示す。
- ・ タンパク質をコードしていない個所がある場合、そこが何か示す。
- ・ タンパク質をコードしているのであれば、Blast サーチの結果から、どのような遺伝子だったと考えられるのか、を示す。また、その遺伝子内のどこの配列を明らかにできたのか(方向含む)を示す。
- ・ Blast サーチによる結果より、100%マッチなのか、それとも塩基置換があるのか、を示すこと。塩基置換があれば、詳細を示すこと。

発表原稿は、各スライドのノートとして入れておくこと。ただし、発表時のスライド提示はスタッフの方で行うので、原稿はプリントするか、自分の PC で発表時見れるようにしておくこと。

(参考資料 1) DNA Sequence デオキシヌクレオチドの塩基配列決定 (DNA シーケンス)

DNAの塩基配列決定は、多くの種類の制限酵素の発見、マクサム・ギルバート法 (Maxam・Gilbert法、化学分解法)、サンガー法 (Sanger法、酵素法) の開発、電気泳動法の進歩などによって目覚ましい発展を遂げてきた。

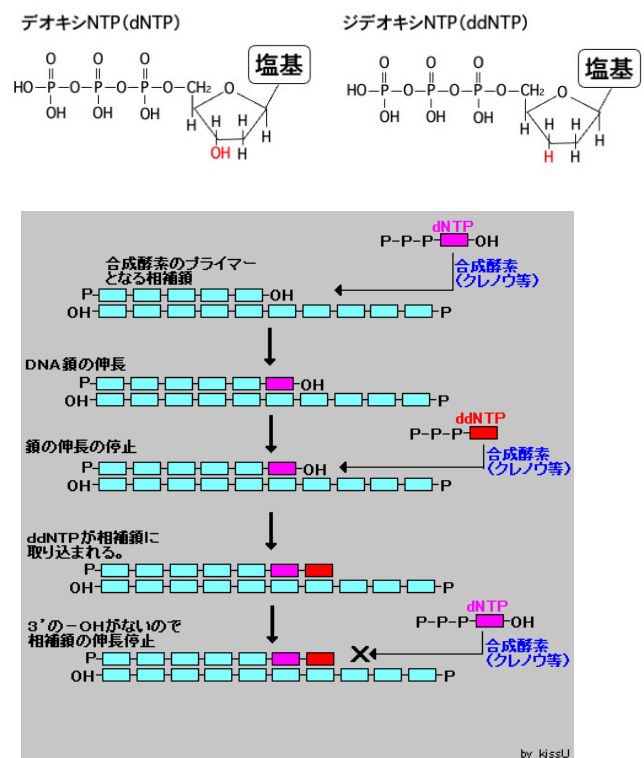
なお、これらの方法は配列決定の際にアイソトープを用いられてきたが、最近では蛍光色素で標識されたヌクレオチドを用いて、DNAシーケンサー及びそれと連動したコンピューター処理を併用することで自動的に配列決定を行うことが多くなっている。

1) Sanger-dideoxy 法

サンガーらが1975年にその原理を発表して以来、様々な改良が加えられてきた。DNAポリメラーゼによる修復合成を利用することから「酵素法」とも呼ばれ、現在では未知のDNA断片の塩基配列を決定するのにはもっぱらこの方法が用いられている。

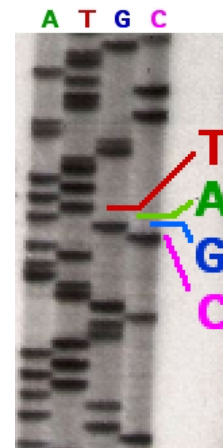
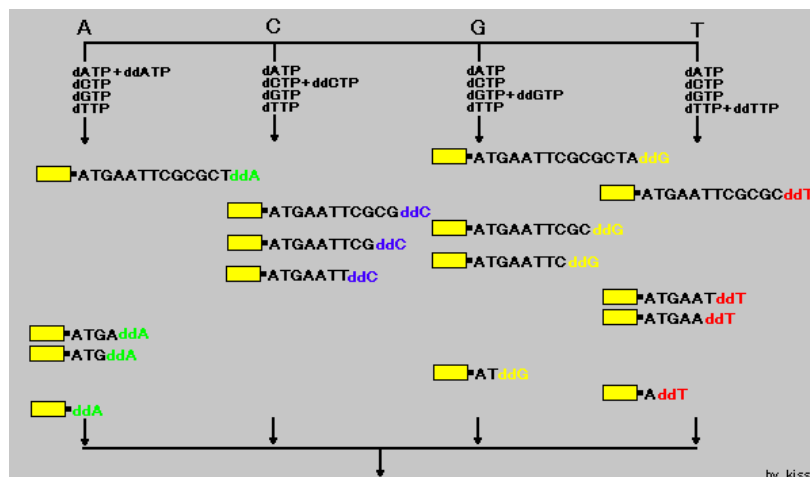
この方法の原法は鋳型となる一本鎖のDNAを得るために手間のかかる方法であったが、メッシングがM13ファージをベクターに用いたことでより簡略化された。現在ではプラスミドDNA pUC18等を用い、これをNaOH等で変性させて一本鎖DNAを得て鋳型のDNAとしている事が多い。得られた鋳型のDNA、Klenow (クレノウ) 酵素を用いて5' から3' 方向にポリメラーゼ反応を行い相補鎖を合成させる。ジデオキシ法は次のような性質を利用して行われる。

- 1) 一本鎖DNAを鋳型としてその相補鎖を合成
- 2) 3' 末端に-OH基のついたプライマー (15塩基以上) が必要
- 3) デオキシヌクレオチド (dNTP) とジデオキシヌクレオチド (ddNTP) の両方を取り込む。ただし後者の取り込み効率は低い。
- 4) ddNTPは3' 末端に-OH基を持たないので、dNTPの代わりにddNTPが取り込まれるとそこで鎖の伸長が停止する。



実際の反応では4種類のdNTPと1種類のddNTPに組み合わせた混合液を4種類 (ddNTPにはddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTPの4種類があるから) 作り、1つの鋳型DNAに対してそれぞれの反応を行う。例えばddATPの反応の場合、A (ジデオキシアデノシン三リン酸) を取り込む際に基質としてddATPもしくはdATPのいずれかが取り込まれ、前者の場合はそこで伸長反応は停止する。後者の場合でもdCTP, dGTP, dTTP等を取り込みながら鎖を伸長してゆくが、次のAのところで同じ選択に直面する。このようにして3ddCTP, ddGTP, ddTTPの4種類があるから) 作り、1つの鋳型DNAに対してそれぞれの反応を行う。例えばddATPの反応の場合、A (ジデオキシアデノシン三リン酸) を取り込む際に基質としてddATPの時、プライマーの5' 末端を蛍光標識しておく。得られたそれぞれの反応液を薄層ポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動を行うと、短いDNA断片から次々に流れてきて、ある高さに設置されたレーザー光に当たり蛍光標識が発色する。その発色を読み取り、配列を決定してゆく。

一般的には一回の配列解析で400塩基対程度から600塩基対を超える配列を読み取る。1000塩基対を超える配列を読むことも可能で、このような長距離の塩基配列を1度の操作で読み取することをメガベースシーケンスなどと呼ぶ。



Dye - terminator 法

最近では、プライマーを蛍光標識したものを用いる方法よりも、dideoxy - terminator を蛍光標識した Dye - terminator 法が良く使われるようになってきている。本実習ではこの方法を用いる。

