

# 103-115

## 問題文

あるDNAの塩基配列をジデオキシ法により解析し、図のような実験結果を得た。また、表(制限酵素一覧)を参照して、その配列中の制限酵素部位の同定を行った。

【ジデオキシ法の原理】

DNAポリメラーゼによる相補鎖DNA合成の際に、その基質である4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP：NはA、G、C又はT)に加え、4種類のジデオキシリボヌクレオチド三リン酸(ddNTP：NはA、G、C又はT)のうち、それぞれ1種類だけを用いて特異的にDNA合成を停止させる。

その結果、A、G、C又はTで特異的に終わる様々な長さのDNA断片が合成され、これら断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離することで、DNAの塩基配列を解読できる。

【実験方法】

鋳型DNA鎖にプライマーDNA断片を結合させ、dATP、dGTP及びdTTPと放射性同位体元素で標識したdCTPを加えた。この反応溶液にddATP、ddGTP、ddCTP又はddTTPを別々に加えて、標識相補鎖DNAを合成した。

次にこれら4種類の反応溶液をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供じた。泳動後、乾燥したゲルをX線フィルムに密着させ、-80℃で一晩放置した。

【実験結果】

DNA断片は放射標識されていることから、X線フィルム上ではしご階段状の泳動像(オートラジオグラフィー)として検出された(図)。

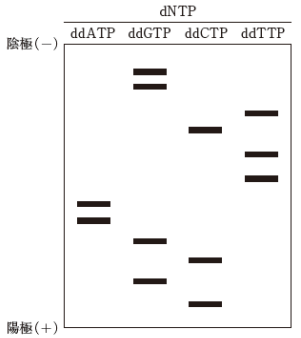


図 DNA断片のオートラジオグラフィー

表 制限酵素一覧

制限酵素	認識配列
<i>Eco</i> R I	5'-G <sup>↑</sup> AATT C-3' 3'-C TTAA G-5'
<i>Kpn</i> I	5'-G GTAC <sup>↑</sup> C-3' 3'-C CATG G-5'

\*：制限酵素による切断部位

X線フィルム上で解読したDNA配列及び実験方法に関する記述のうち、正しいのはどれか。2つ選べ。

1. DNA伸長反応を停止させるddNTPには、3'の位置にヒドロキシン(OH)基が存在しない。
2. 5'末端から5番目の塩基はチミン(T)である。
3. 3'末端から4番目の塩基はグアニン(G)である。
4. *Eco* R Iにより認識・切断される配列が存在する。
5. *Kpn* IIにより認識・切断される配列が存在する。

## 解答

1, 4

## 解説

ジデオキシ法のイメージは以下のようになります。

【用意するもの】

5'—3'プライマ

3'— ATCGATCG — 5' 鋳型

「dATP,dGTP,dCTP,dTTP」 (A,G,C,Tで表現)と

「ddATP,ddGTP,ddCTP,ddTTP」 (A',G',C',T'と表現)。

【実験の結果】

5'—3'プライマ T'

3'— ATCGATCG — 5' 鋳型

5'—3'プライマ T A'

3'— ATCGATCG — 5' 鋳型

5'—3'プライマ TA G'

3'— ATCGATCG — 5' 鋳型

...

といったように、**A',G',C',T'**が挿入された部分で合成が停止した、様々な長さの**DNA断片**が合成されます。「短い」塩基ほど電気泳動によって、「陽極側」に、より流されます。

以上より、鋳型にくっつく塩基の順番は CGCGAATTCTGG とわかります。(実験結果の図を 陽極側からどのレーンにあるかを読んでいった ということです。)そして、鋳型であったDNAの配列は、3' 側から GCGCTTAAGACC とわかります。これらをふまえ、各選択肢を検討します。

選択肢 1 は、正しい記述です。

選択肢 2,3 ですが

5' 末端から 5 番目の塩基は A です。Tではありません。3' 末端から 4 番目の塩基は C です。Gではありません。よって、選択肢 2,3 は誤りです。

選択肢 4 は、正しい記述です。

AATT

TTAA という配列が存在します。

選択肢 5 ですが

GTAC

CATG という配列はありません。よって、選択肢 5 は誤りです。

以上より、正解は 1,4 です。