

講座1 自分の遺伝子を調べてみよう・DNA解析実習

日時： 6月9日・10日・11日 14:30～17:00

場所： 柏陽高校生物実験室

講師： 外部講師なし。

内容：

2013年、遺伝子検査によってBRCA1遺伝子に変異があり乳がんになる可能性が高いと診断されたアンジェリーナ・ジョリーが予防的に両乳房を切除したことが大きな話題になりました(アンジーショック・アンジー効果)。

犯罪捜査ではDNA鑑定による個人識別が重要な証拠とされています。

これらの方法はDNA解析と呼ばれ、DNAに書き込まれている遺伝情報を読み取り比較しています。

遺伝情報はどのようにDNAに書き込まれているのでしょうか？

遺伝情報はどうやって読み取るのでしょうか？

本実習では自分自身の次の3種類の領域のDNAを制限酵素断片長多型と呼ばれる方法で調べました。

1. ALDH IIと呼ばれるアセトアルデヒドを分解するために必要な酵素の遺伝子。
2. ADHと呼ばれるアルコールをアセトアルデヒドに分解する酵素の遺伝子。
3. DIS80と呼ばれる個人により違いが大きいため個人識別に使われていた領域(遺伝子としての機能は持っていません)。

自分の遺伝情報を知ることにより自分自身にはどのようなメリットがあるのか、どのようなデメリットがあるのかを考えることが必要です。

遺伝情報を読み取ることが出来るようになることが社会にとってどのような影響をもたらすのか考える事も重要です。

DNAに書かれている情報は高度な個人情報と考えられます。そのため参加者には本人と保護者の同意書の提出をしてもらいました。同意できない場合はダミーのDNAを調べてもらうことにしています。

方法：

1. 自分のほおの粘膜細胞からDNAを抽出しました。
2. 3つのDNAの領域をPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)と呼ばれる方法で増やしました。
3. 電気泳動を行いDNAのサイズを決めました。DIS80はこれで結果が出ます。ALDH IIとADHはうまく増えているのかを確認しました。残念ながらADHはうまく増えていませんでした。
4. ALDH IIはPCRで増やしたDNAをさらに制限酵素で処理しました。
5. 制限酵素で処理したDNA断片の電気泳動を行いDNAのサイズを決め、DNAのサイズから遺伝子のタイプを決めました。

今回の実習ではADH遺伝子のDNAがうまく増えませんでした。DIS80とALDH IIはうまく増えました。

この週は面談週間で短縮授業なのでその時間を利用して実施しました。

3年の生物選択者26名の参加がありました。

希望者多数のため1年生は別の日程で行い10名の参加がありました。

ALDH II と ADH

アルコール(エタノール)は肝臓でADHと呼ばれる酵素でアセトアルデヒドに分解されさらにALDH IIと呼

ばれる酵素によって分解されます。

アセトアルデヒドは有毒な物質です。血中濃度が高くなると顔が赤くなり、さらに高くなると気持ちが悪くなり(二日酔い)、さらに高くなると命に関わる中毒を引き起こします(急性アルコール中毒)。日本人には酵素活性が無い変異がある ALDH II 遺伝子(飲めない遺伝子)を一つ持つ(ヘテロ接合体)人が 45%、二つ持つ人(ホモ接合体)が 5%いると考えられています。ヘテロの人はお酒に弱く、変異遺伝子がホモの人は全くお酒を飲みません。

また ADH の活性が低いとアルコールがなかなか分解されないため気持ちよく酔っ払った状態が続きます。ALDH II は飲酒量を決め、ADH は酔いやすさを決めていると考えられます。

D1S80 (MCT118)

ヒトの第一染色体の DNA には AGGACCACCG GAAAGG という 16 塩基の配列が繰り返されている D1S80 と呼ばれる領域があります(この部分の DNA は特に機能がありません)。この繰り返し回数が数回から 100 回程度まで人によって異なっています。この領域の長さを調べることで繰り返し回数を推定できます。このような領域を何カ所か調べることで個人を特定することができます。

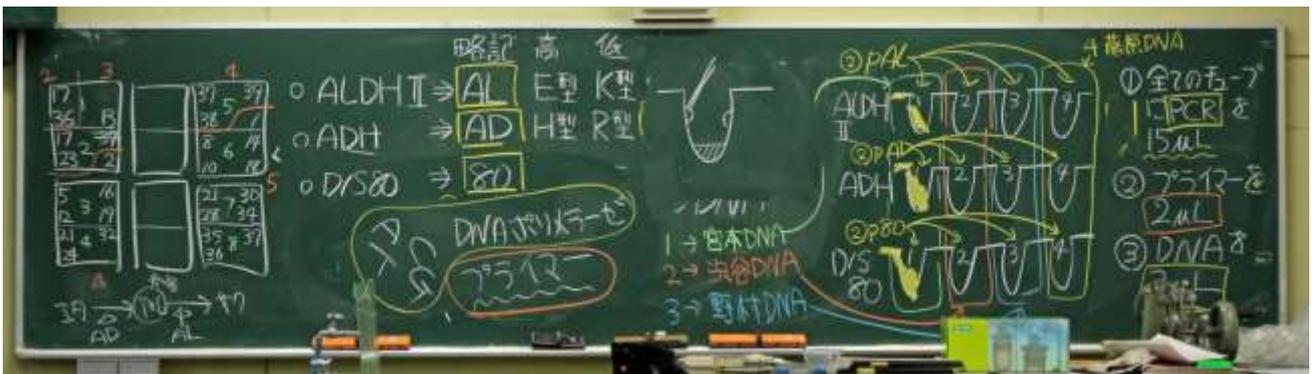


写真 1: 実験方法を書いた板書です。



写真 2: サーマルサイクラーと呼ばれる装置です。DNA の調べたい部分のコピーを大量に作る PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を自動的に行うことができます。



写真 3: 電気泳動装置(ミュピッド)と呼ばれる水平に入れた寒天の板(ゲル)に電圧をかける装置です。ゲルの端のくぼみ(ウェル)に DNA を入れているところです(DNA サンプルには青い色素を混ぜて見やすくしてあります)。DNA は-に帯電しているので電圧をかけるとゲルの中を+極に向かって移動します。この写真では右から左です。

サイズの小さい DNA ほど速く移動するので移動距離から DNA の大きさ(長さ)を決めることができます。

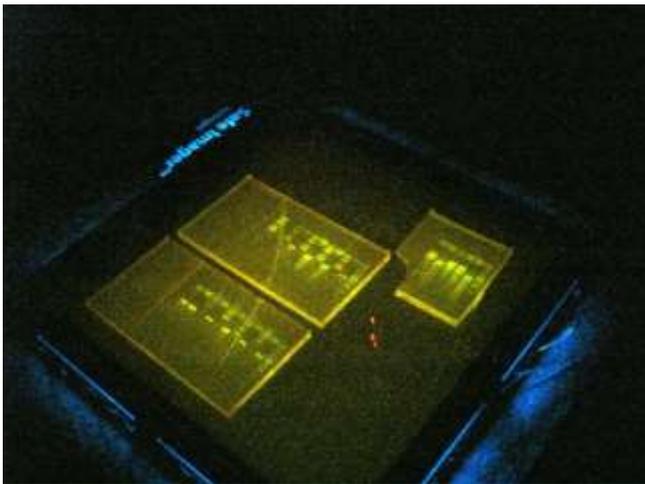


写真 4: 電気泳動が終わったゲルは DNA を蛍光色素で染色します。染色したゲルをトランスイルミネーターと呼ばれる装置にのせ、下から青色光を当て青色光を遮断するフィルターを通して見ると DNA が黄色に光ります。これをデジタルカメラで撮影します。

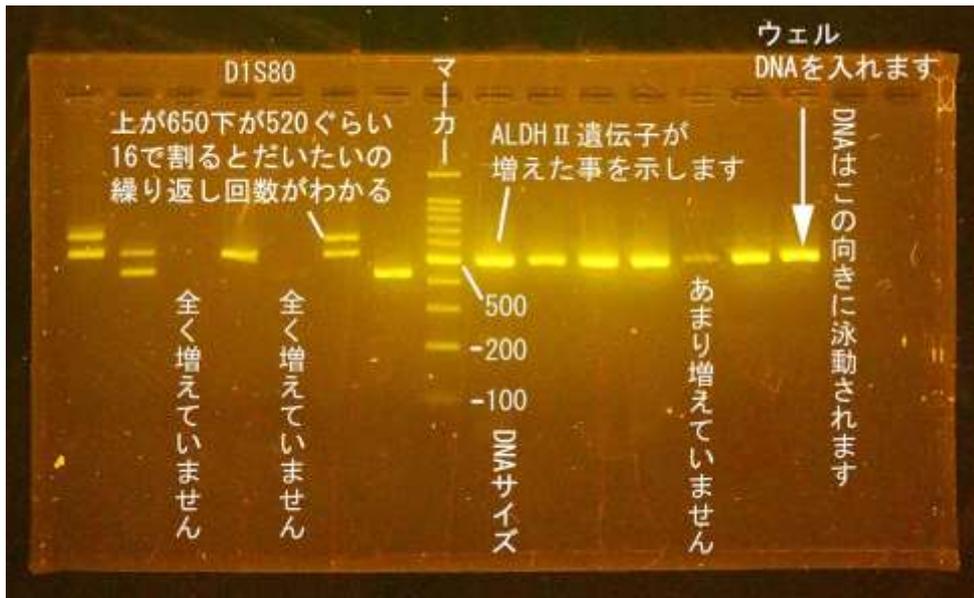


写真 5: ゲルの写真です。黄色く光っているところに DNA があり、これをバンドと呼びます。写真の上はじに DNA を入れたくぼみ(ウェル)が見えます。DNA はここから下に向かって移動します。この縦の列をレーンと呼び同じサンプルに入っていた DNA のバンドが見えます。

マーカーとはサイズがわかっている DNA を混ぜたものです。下から 100 200 300 400 500・・・文字の大きさの DNA のバンドです。マーカーのバンドとサンプル DNA のバンドを比較すれば DNA のサイズがわかります。

マーカーの右の ALDH II 遺伝子では 500 文字程度の DNA が増えているはずですが、右から 3 番目のレーンを除いてうまく増えていました。

マーカーの左の D1S80 は長さ(16 文字の繰り返しの回数)が違う DNA を両親からもらっているのでバンドが 2 本出来ます。左から 3 番目と 5 番目のレーン以外はうまく増えていきます。

右から 2 番目のレーンにはおよそ 650 と 520 文字の DNA のバンドが確認できます。650 と 520 を 16 で割ると 40 と 33 です。この人の D1S80 はおよそ 33 回とおよそ 40 回の繰り返しがあることがわかります。ただしこの実習で用いた電気泳動は精度が十分でないので正確な回数を決めることは出来ません。

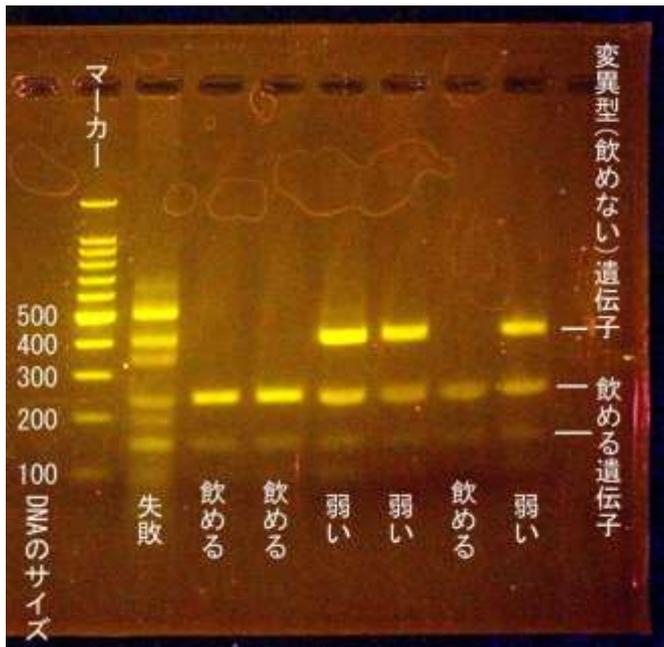


写真 6: PCR で増やした ALDH II 遺伝子の DNA (500 文字程度) を制限酵素で切断し電気泳動しました。マーカーのバンドと比べてそれぞれのバンドのサイズを決めます。

「飲めない遺伝子」は制限酵素でおよそ 400 文字と 100 文字に切断されます。

*100 文字のバンドはほとんど見えません

「飲める遺伝子」はおおよそ 250 文字と 150 文字と 100 文字に切断されます。

両方の遺伝子を持つヘテロの人 (弱い) は 400, 250, 150, 100 文字のバンドが見えるはずですが、

この中には「飲めない遺伝子」だけ持つ人 (飲めない) はいませんでした。

この方法は制限酵素断片長多型と呼ばれ比較的簡単な装置を使って DNA の違いを知ることが出来ます。実際に ALDH II 遺伝子の一塩基の違いが酵素の活性を決めています。

本講座は東邦大学理学部の佐藤浩之教授の技術的な支援を受けて実施しました。

講座2 磯の動物の系統分類実習 形態による分類 (臨海実習)

日時: 9月9日 9:00~16:00

場所: 東京大学大学院附属臨海実験所(三崎臨海実験所)

講師: 東京大学大学院理学系研究科 特任助教 大森紹仁先生

内容:

生物の分類は生物学の基本です。分類をするためには生物をじっくり観察しなくてはなりません。そうすることでいろいろなことがわかります。

生物の分類には「伝統的な形態から見た分類」と「DNAの塩基配列の違いによる分類」があります。本実習は「伝統的な形態から見た分類」実習です。

生物は門とよばれる大きなグループに分類されます。動物の場合30程度の門がありますが主要な門は10程度です。三崎の磯ではほとんどの主要な動物門の動物を採集することが可能です。そのため実際に採集した動物を使って門レベルの分類の実習が出来ます。

*主要な動物門 脊索動物門(ヒト 魚類 ホヤなど) 棘皮動物門(ウニ ヒトデ ナマコなど) 刺胞動物門(クラゲ イソギンチャクなど) 海綿動物門 扁形動物門(プラナリア ヒラムシなど) 線形動物門(センチュウ カイチユウなど) 環形動物門(ミミズ ゴカイなど) 軟体動物門(イカとタコ 貝など) 節足動物門(昆虫 クモとダニ エビとカニなど)

同じ門に属する動物は見た目が異なってもよく観察すると共通の体の構造を持っていることがわかります。これをボディプランと呼びます。例えば棘皮動物門にはウニ、ヒトデ、ウミユリ、ナマコ、クモヒトデが属しています。とても同じグループとは思えないほど見た目は異なります。しかし水管系と管足、五放射相称(五角形のからだ)という共通の構造を持っていることがわかります。つまり門とは共通したボディプランを持つ生物をまとめたものです。

5億年以上前に主要な動物門はすべて出現しています。その後それぞれのボディプランを変えないで進化してきたと考えられています。分類とはただグループ分けをしているのではなく生物が進化してきた歴史をたどる努力をすることでもあるのです。

三崎の臨海実験所は120年以上の歴史を持ち、ウッズホール(米)・ナポリ(伊)・プリマス(英)と共に世界で最も歴史のある臨海実験所です。日本の生物学が始まった場所でもあります。

ここでのフィールドワークから柏陽高校の生物の授業を始めたいと考えました。

5月の予定が台風の直撃で9月9日に延期しました。9日も台風が心配されたのですが無事実施出来ました。

大潮の干潮時に班ごとに磯のみや網などの採集道具とバケツやサンプルケースを持って磯に出ました。

膝ぐらいまで水に入って石をひっくり返したり海藻の裏側を丹念に探したりしました。

採集した動物は実習室に持ち帰り、門と呼ばれるグループに分類し水槽に入れました。

昼食後、大森先生の講義を聴き、班ごとに担当する門を決めスケッチと写真撮影、DNAの抽出を行いました。

3年の生物選択者29名が参加しました。

学校に帰ってから生物の授業の中で班ごとに担当した門を紹介するポスターを作り生物室前に掲示しました。



写真7: 実習を行った臨海実験所の記念館(旧本館)です。1Fの実習室を使いました。1936年完成のレンガ造りの歴史的建造物です。



写真8: 磯で採集した動物を門レベルに分けて水槽に入れています。



写真9: 棘皮動物門です左からウニの殻, イトマキヒトデ, クモヒトデです。



写真 10: 実物を見ながら大森先生の講義を受けました。門レベルの特徴について勉強しました。



写真 11: 板書です。門ごとの形態的な特徴を示しています。



写真 12: 班ごとに担当する門を決めてスケッチをしました。色鉛筆で色もつけました。その後 DNA の抽出をしました。

講座 3 磯の動物の分類実習 分子分類学実習

本講座は「DNA の塩基配列の違いによる分類」を体験する実習です。

生物の体の構造を元にした伝統的な分類とは別に DNA の塩基配列の違いを調べる事で生物を分類することが出来ます。DNA の塩基数(文字数)はヒトの場合 60 億文字あります。DNA の複製はきわめて正確に行われますがそれでも少しずつエラーが生じそれが代々蓄積されていきます。したがって違いが少なければ近い種であり違いが多ければ遠い種であると考えられます。

DNA の違いを正確に知るために講座 1 で行った PCR と制限酵素処理による方法(制限酵素断片長多型)ではなく、DNA シーケンサーと呼ばれる装置で塩基配列を直接読み取る必要があります。

このような分類を分子分類と呼び、伝統的な分類と同じ結論が得られる場合とそうでない場合があります。また分子分類でも DNA の異なる領域を比較すると異なる結論が得られる場合もあります。バイオテクノロジーによって生物の分類と進化についても新しい考え方が生まれ活発な議論が行われるようになっていきます。

日時: 10 月 1 日

場所: 柏陽高校生物実験室

講師: 東京大学大学院 大学院生 永井晶子先生

内容: 採集した動物から抽出した DNA のサンプルの一部(細胞内でタンパク質を作っているリボゾームと呼ばれる構造を決めている DNA の部分。進化によって少しずつ塩基配列に変異があります)を PCR と呼ばれる方法でふやしました。

さらに DNA サンプルを精製しサイクルシーケンスと呼ばれる処理を行いました (DNA の ATCG にそれぞれ異なる色の蛍光色素を結合させ DNA シーケンサーで読み取ることが出来るようにしました)。結構手数が多くて大変でした丸 1 日かかりました。1, 2, 3 年生 5 名が参加しました。

日時: 10 月 13 日 10:00~13:00

場所: 東京大学大学院附属臨海実験所

講師: 東京大学大学院 特任助教 大森紹仁先生 大学院生 永井晶子先生

内容: 臨海実験所の DNA シーケンサーで塩基配列を読み取りました。機械にかけてしまえば待っているだけなので実験所内の見学などさせてもらいました。この日も台風が接近していたので早めにかえりました。1 年生 2 名が参加しました。

日時: 11 月 19 日 3 年生物の授業時間

講師: 東京大学大学院 教授 近藤真理子先生 特任助教 大森紹仁先生
大学院生 永井晶子先生

内容: 塩基配列を MEGA と呼ばれるフリーソフトで解析し分子系統樹を作るデモを行いました。これは一瞬で終わりました。一部の配列を手作業で解析し、どのような原理で解析を行っているのかを学びました。授業なので 3 年生物選択者全員が参加しました。



写真 13: 臨海実験所の DNA シーケンサーです。この装置で塩基配列を読み取りました。左から講師の大森先生、永井先生、柏陽の野村です。

2014/9/9 柏陽高校実習 DNA採取生物リスト

No.	種名	担当	日時
1	ベニボヤ		X X
2	アメフラシ		O O 27 X
3	ムカデメリベ		O X
4	ミノウミウシ		O X
5	コノハマドリガイ		X
6	クロスジアメフラシ		O O 6f x 6r o
7	アゴハゼ		O O 7f o 7r o
8	イソスジエビ		O O 8f o
9	バファンウニ		O O 9f x 9r x
10	テツイロナマコ		X
11	イワガニ		O O 11f x 11r x
12	ムラサキウニ		O O 12f o 12r x
13	ヤツデヒトデ		O X
14	イソスジエビ		O O 14f x 14r o
15	オウギガニ		X
16	フクロムシsp		O O 16f x 16r o
17	ホシゾラホンヤドカリ		O O 17f x 17r x
18	ベラsp		O O 18f y 18r y
19	イソクズガニ		O X
20	イソヨコバサミ		X
21	ヒザラガイ		O O 21f x 21r y
22	クジャクガイ		O O 22f y 22r y
23	アマオブネ		O O 23f x 23r x
24	ムラサキカイメン		X
25	魚sp		O O 25f x 25r y
26	ハネウミヒドラ		O X
27	オトヒメゴカイ		O O 27f o 27r x
28	タデジマヒモムシsp		O X
29	ウスヒラムシ		O O 29f x 29r y
30	ヨロイイソギンチャク		O O 30f x 30r y

写真 14: 今回採集し DNA を抽出した動物のリストです。○が DNA 抽出に成功 一番右端の○は DNA 塩基配列の読み取りまで成功したものです。30 種類の動物から DNA を抽出し最終的に配列が読めたのは 7 種にとどまりました。なかなか難しいものです。

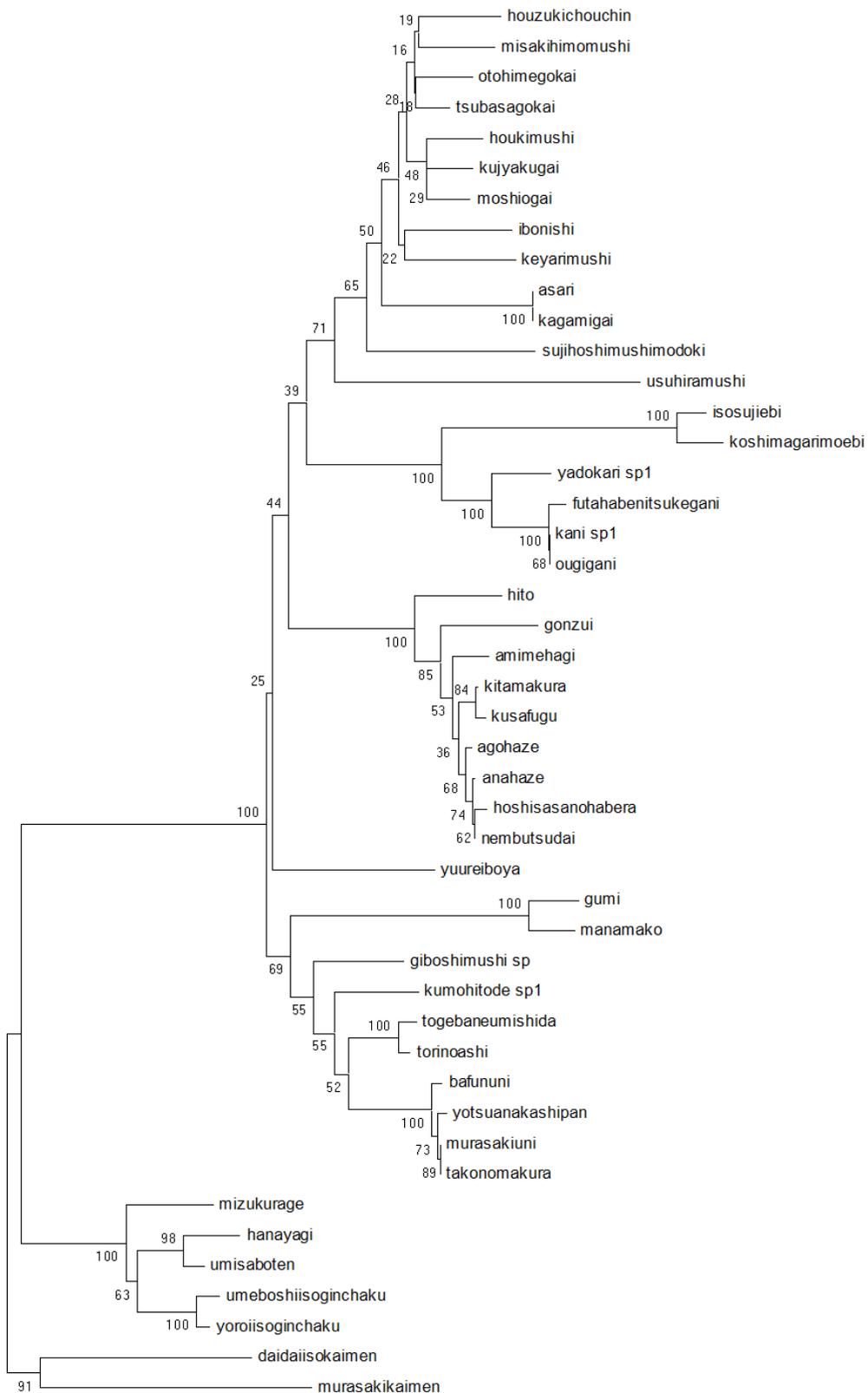


図 16: コンピュータソフトを使って作成した系統樹です。配列が読めなかったサンプルはインターネット上に公開されているデータを使いました(同じ種類がない場合は近い種類)。動物名はローマ字です(アメリカのソフトで漢字が出ないので)。このような系統樹を分子系統樹と呼びます。

講座4 メダカを使った遺伝学実習・メンデルから分子遺伝学

日時： 7月27日 31日 8月1日 9:30~17:00

講師： 外部講師なし。

内容：

メンデルの法則によるとエンドウ豆のF₂の表現型は丸：しわ=3：1に分離するはずですが。

丸の遺伝子をA、しわの遺伝子をaとすると、遺伝子型がAAとAaの表現型は丸、優性形質になり、aaの表現型がしわ、劣性形質になるはずですが。

本当でしょうか？確かめてみましょう。

本実習はメダカを使ってメンデルが行ったように表現型を数える実験とバイオテクノロジーによって遺伝子型を直接決める実験を同じ個体で行いメンデルの法則が正しいことを確認する実験です。

メダカにはわかりやすい体色に関する突然変異体が多く存在し、メダカゲノム計画によりDNAの塩基配列が読まれておりDNA解析が容易です。育てやすく交配が簡単で、受精後数日で表現型がわかります。

そのためこのような実験に適しています。見た目がかわいいことも重要です。

黒色素胞と白色素胞を持つ「純系のクロメダカ」と黒色素胞と白色素胞を持たない「純系のヒメダカの種類」をかけ合わせ得られたF₁を育て、交配可能な状態にしてあります。黒色素胞も白色素胞も有りが優性で無しが劣性です。F₁は見た目はクロメダカです。

1日目：

1. F₁メダカどうしを自然交配し交尾産卵を観察し受精卵を得ました。
2. メダカを解剖して卵巣と精巣を取り出し、人工受精を行い受精と初期発生の観察を行いました。

2日目：

1. F₂胚を顕微鏡で観察し表現型を数えメンデルの法則が正しいことを確認しました(3:1 9:3:3:1)。
2. 表現型を調べた一部のF₂胚からDNAを抽出し、黒色素胞の有無を決めている遺伝子と白色素胞の有無を決めている遺伝子のDNAをPCRと呼ばれる方法でふやしました。

3日目：

PCRでふやしたDNAを使って黒色素胞の有無を決めている遺伝子と白色素胞の有無を決めている遺伝子のタイプを調べ遺伝子型を決めました。

1. PCRで増やしたDNAを制限酵素と呼ばれる酵素で切断しました。
制限酵素で切断すると「黒色素胞遺伝子」は切断され、「黒色素胞無し遺伝子」は切断されません。
また「白色素胞遺伝子」は切断されず、「白色素胞無し遺伝子」は切断されます。
2. 電気泳動と呼ばれる方法でDNA断片の長さを調べ、DNAが切断されたかどうかを調べました。

本実習は自然科学研究機構基礎生物学研究所 准教授 成瀬清先生 博士研究員 笹土隆雄先生
日本女子大学理学部 准教授 深町昌司先生 の技術的支援を受けて実施しました。

1,2,3年生計8名の参加がありました。



写真 17: 交尾産卵を観察しています。前日から♀を分けておき, 観察するときと同じ水槽に入れます。部屋を暗くして水槽にだけ照明を当てて静かに観察していると 10~30 分以内に交尾産卵をします。



写真 18: 受精後数日の F2 胚です。黒色素胞と白色素胞 (オレンジ色に見えます) の両方が確認できます。黒色素胞も白色素胞も有りが無しに対して優性です。



写真 19: 黒色素胞と白色素胞の両方がありません。

講座5 大腸菌を使った遺伝子組換え実習

日時： 9月20日21日 9:00～13:00

場所： 柏陽高校生物実験室

講師： 外部講師無し。

内容：

納豆などの大豆を原料とする食品には「遺伝子組換え大豆を不使用」と書かれています。遺伝子組換えに問題があるのでしょうか。一方 iPS 細胞は遺伝子組換え技術によって作られました。インスリンなどの医薬品にも遺伝子組換えによって作られている物があります。遺伝子組換えとはどのような技術なのでしょうか？

遺伝子組換えとは別の生物が持つ遺伝子を他の生物に組み込んで働かせることです。

大腸菌に他の生物の遺伝子を組み込んで働かせることは容易に出来ます。

どのような方法で遺伝子を組み込むのでしょうか？

組み込んだ遺伝子が働くと言うことは、遺伝子に書き込まれている遺伝情報を記録したり読み取る仕組みは生物の種が異なっても同じであることを示しています。

大腸菌で遺伝子が働く仕組みは他の生物と同じです。そのため研究が容易な大腸菌を使って遺伝子に関する研究が進められてきました。

遺伝子組換えの技術はどのようなことに使われているのでしょうか？ 問題はないのでしょうか？ そのようなことを考えることも大切です。

本実習では GFP(緑色蛍光タンパク質)と呼ばれるオワンクラゲ由来の発光タンパク質の遺伝子が組み込まれた大腸菌から GFP の遺伝子を含むプラスミド(pGL0)と呼ばれる DNA の断片を取り出して別の大腸菌に組み込みました。うまく遺伝子が働けば大腸菌は GFP を作り緑色に光るはずですが。

1年の生物基礎の授業では GFP 遺伝子を組み込む実習を行っています。この実習はその発展です。

1日目：

GFPを組み込まれている緑色に光る大腸菌(組換え体)からDNAを抽出しその中からプラスミドと呼ばれる GFP 遺伝子を含む DNA 断片を精製しました。

抽出したプラスミドをヒートショックと呼ばれる方法で普通の大腸菌(非組換え体)に組み込みました。

大腸菌を条件を変えた何種類かの培地に植え付け、次の日まで培養しました。

2日目：

培養した大腸菌に紫外線を当てると緑色の蛍光を発しました。GFP 遺伝子が組み込まれたことがわかりました。条件が異なる培地での結果の違いから様々な考察を行いました。

プラスミド(pGL0)と呼ばれる DNA 断片には GFP 遺伝子のほかにアンピシリン amp 耐性遺伝子とアラビノース ara(糖の一種)があるときにだけ GFP 遺伝子を働かせる調節遺伝子が組み込まれています。

遺伝子組換えに成功した大腸菌はアンピシリンを含む培地で増殖します。組換えに失敗した大腸菌は生育できないので組換え体だけを選び取ることが出来ます。

組換えに成功した大腸菌はアラビノースがあれば GFP を作るので緑色に光ります。

1, 2, 3年生計9名が参加しました。



写真 22: 大腸菌を培地にまいています。手と実験台を消毒した後、アルコールランプが作る上昇気流中で操作を行い雑菌が入らないようにしています(簡易的な無菌操作)。

シャーレにまいた大腸菌は増殖するとコロニーと呼ばれるつぶつぶを作ります。一つのコロニーは 1 個の大腸菌が増殖したものです。コロニーの数を数えることで培地にまいた大腸菌のうち生育できた大腸菌の数を数えることができます。



写真 23: 培養が終わったシャーレのコロニー数を数えています。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LB/-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
LB/amp/-	2	0	0	0	0	0	0	0	0
LB/amp/+	3	100	100	100	100	100	100	100	100
LB/amp/ara/+	4	100	100	100	100	100	100	100	100
LB/ara/+	5	100	100	100	100	100	100	100	100
LB/amp/ara/+	6	100	100	100	100	100	100	100	100

写真 24: 結果です。一番上の 1 が培地にまいた大腸菌数を推定したものです。上から 3, 4, 6 が遺伝子組換えに成功した大腸菌数です。3, 4 が市販されているプラスミド(GFP 遺伝子)を組み込んだもの。6 は自分たちで抽出したプラスミド(GFP 遺伝子)を組み込んだものです。すべてうまくできたことがわかります。

講座 6 プラスミドの制限酵素地図の作成実習

日時: 10 月 11 日 9:00~17:00

講師: 外部講師無し。

内容:

1970 年代に DNA を自由に切断できる魔法のハサミと DNA をつなぐことが出来る魔法ののりを手に入れたことにより DNA を切ったりつないだりすることが可能になりました。これがバイオテクノロジーの始まりです。

魔法のハサミは制限酵素と呼ばれる酵素で DNA の特定の配列を認識し切断することが出来ます。現在では異なる配列を認識する数百種類の制限酵素が知られています。

同じ種類の制限酵素で切断した断片どうしは DNA リガーゼと呼ばれる酵素でつなぐことが出来ます。これが魔法ののりです。

本実習は講座 5 で大腸菌に組み込んだプラスミドを取り出し、各種の制限酵素で切断する実験です。生じた DNA の断片の大きさを電気泳動によって決めることでプラスミドのどこにそれぞれの制限酵素で切断できる部分があるのかを推定することが出来ます。

1. 9 月 20 日の実習でプラスミドを組み込んだ大腸菌 (組換え体) からプラスミドを抽出しました。
2. 得られたプラスミドを精製し、数種類の制限酵素で切断しました。
3. 切断された DNA 断片のサイズを電気泳動により決定しました。
4. DNA 断片のサイズからプラスミドのどの部分に制限酵素で切断できる部分があったのかを推定し、その位置を示す図 (制限酵素地図) を作成しました。

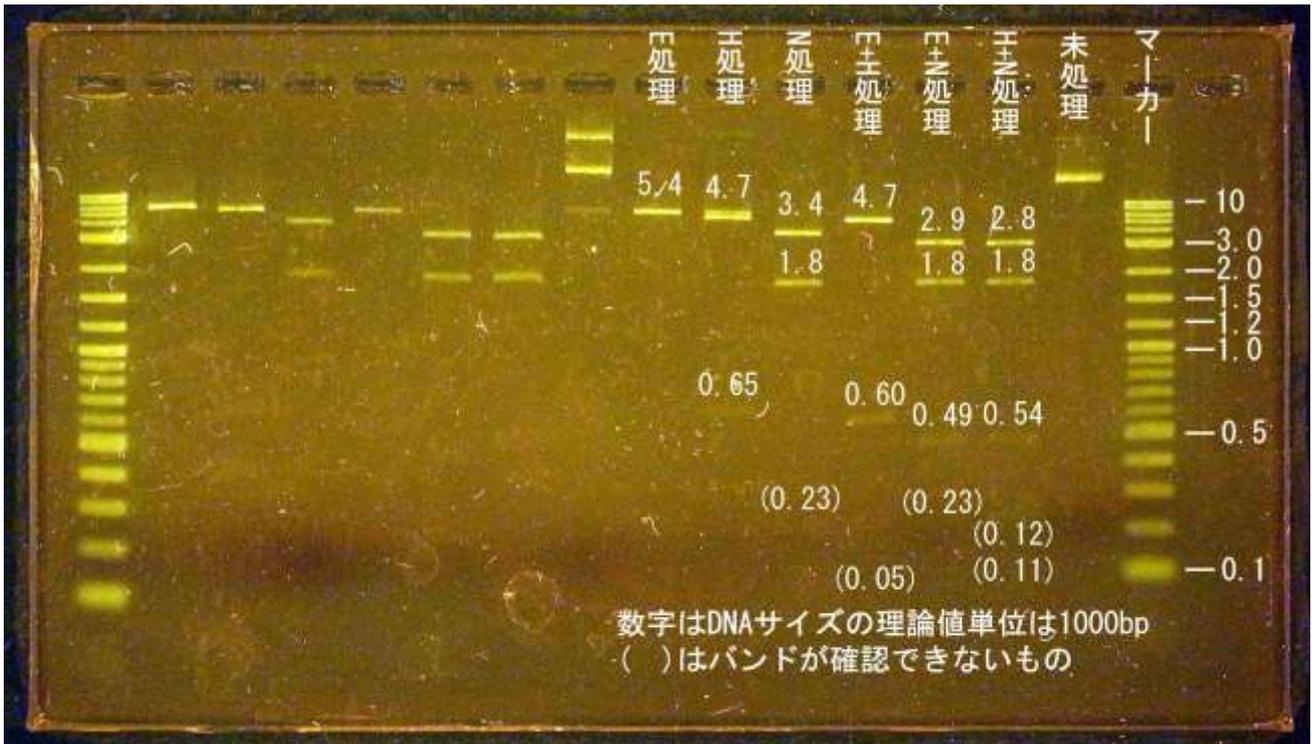


写真 25: プラスミド(pGL0)はおよそ 5,400 文字の DNA がリング状になっているものです。その中に GFP の遺伝子が含まれています。

制限酵素 EcoR I (E)は GAATTC という配列を認識し G と A の間を切断します。

制限酵素 HindIII (H)は AAGCTT という配列を認識し A と A の間を切断します。

制限酵素 Nde I (N)は CATATG という配列を認識し左の A と T の間を切断します。

プラスミドを一種類ないし二種類の制限酵素で切断し生じた断片の大きさを電気泳動によって推定しました。

写真の DNA のサイズは理論値です。マーカーを使ってそれぞれのバンドの DNA サイズの見当をつけるとおおむねうまくできていることがわかります。

未処理のプラスミドはリング状であるため正しくサイズを推定できません。一カ所切断されると線状になるため正しいサイズを推定できます。

この断片のサイズからプラスミドのどの部分にそれぞれの制限酵素で切断できる塩基配列があるのかをパズルのようにして推定することが出来ます。こうして作ったものを制限酵素地図と呼びます。

この電気泳動の方法では 200 文字以下の大きさの DNA のバンドは確認できません。正確な染色体地図を作るためにはそのデータも必要なので理論値を使って考えました。