

702 蛍光色素を用いた DNA sequencing の原理と応用

林日科機・銭場俊彦

1. はじめに

DNA sequencing は、バイオテクノロジーや分子生物学において、中心的な技法のひとつである。従来の Sanger 法による酵素法^{1,2}、Maxam-Gilbert による化学法³は、共に末端に放射標識した DNA セグメントをゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラフィにて位置を同定する。またいずれも4種の反応産物を一組として、異なるレーンで泳動し ladder の順を追うことにより塩基配列を知ることができる。一方、1985年、Smith 法は合成オリゴヌクレオチドの5'末端に4種の異なる蛍光色素を共有結合させ、これをプライマーとして Sanger 法の dideoxy 法と合わせた新しい DNA sequencing 法を発表した⁴。さらに、泳動から塩基配列の解読までを自動化し、高速かつ高精度な DNA sequencer を実現した⁵。

2. 装置の概要

1) 試料の調製: dideoxy sequencing 反応は、ファージ M13 DNA に対する4種類の蛍光標識プライマーを用いて行なう。2) ゲル電気泳動: sequencer は電気泳動に必要な設備をすべて内蔵している。sequencing 反応を終えた試料4種類を合わせ、ひとつのレーンで泳動する。泳動に伴うパラメーターは、sequencer のマイクロプロセッサーにより制御される。3) DNA セグメントの検出: 各セグメントの5'末端に結合している蛍光色素を、レーザー光で励起し、emission spectra の差異により、4種類を識別する。光学系によりゲルをスキャンしてセグメントを検出する。4) データの解析: 各色素の emission spectra は重なる部分がある。また、DNA セグメントに結合した色素の移動度への影響が異なるため、コンピューター処理による適正な補正が必要である。

3. 特徴と適用

本法は、主として次の点でこれまでの sequencing と異なっている。1) sequencing 反応に4種類のプライマー(標識色素が異なる)を用い、放射性同位体を必要としない。このことにより、実験上の多くの制約が解除され、経費も節減される。2) 4種類の標識 DNA を同一のレーンで泳動する。分離したセグメントの位置は、ゲルから直接検出し、塩基配列として表示する。得られた情報はディスクに保存することができる。したがって、客観的かつ精度の高いデータが得られ、sequencing はきわめて迅速になされる。この方法は、特に大きな遺伝子構造の解析に有利である。また、ここでは酵素法に基づく方法を紹介したが、化学法の応用も現在検討されている。

1. Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467 (1977)
2. Smith, A.J.H., Meth. Enzym., 65, 560-580 (1980)
3. Maxam, A.M. & Gilbert, W., Meth. Enzym., 65, 499-559 (1980)
4. Smith, L.M. et al., Nucleic Acids Res., 13, 2399-2412 (1985)
5. Smith, L.M. et al., Nature, 321, 674-679 (1986)