

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000 - 23668

(P 2 0 0 0 - 2 3 6 6 8 A)

(43)公開日 平成12年 1 月25日 (2000.1.25)

(51) Int.Cl.⁷ 識別記号 F I テーマコード (参考)
C12N 15/00 C12N 15/00 Z

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全14頁)

(21)出願番号	特願平10 - 193244	(71)出願人	593059887 農林水産省水産庁養殖研究所長 三重県度会郡南勢町中津浜浦422 - 1
(22)出願日	平成10年 7 月 8 日(1998.7.8)	(72)発明者	大原 一郎 三重県度会郡南勢町五ヶ所浦190番地25号
		(72)発明者	小林 敬典 三重県度会郡玉城町佐田411番地 2 号
		(72)発明者	中山 一郎 三重県伊勢市古市町355番地10号
		(72)発明者	奥 宏海 三重県度会郡南勢町五ヶ所浦190番地25号
		(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAの精製方法

(57) 【要約】

【解決手段】 ムコ多糖類が混在するDNA溶液から、DNAとムコ多糖類の吸着性の差異を利用してDNAを精製する方法において、吸着性物質としてヒドロキシアパタイトを用いることを特徴とする、DNAの精製方法。

【効果】 本発明によれば、ムコ多糖類が混在するDNA溶液からムコ多糖類を除去して高純度のDNAを大量に、しかも複数検体から同時に精製する簡便な方法が提供される。本発明方法によれば、ムコ多糖類を含有する生物試料1g(湿重量)からサザンブロッティング等の遺伝子分析に供するに十分な量である10μg以上の精製DNAを得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ムコ多糖類が混在する DNA 溶液から、DNA とムコ多糖類の吸着性の差異を利用して DNA を精製する方法において、吸着性物質としてヒドロキシアパタイトを用いることを特徴とする、DNA の精製方法。

【請求項 2】 DNA 溶液が、生物試料を尿素を含有する緩衝液にて抽出したものであることを特徴とする、請求項 1 記載の DNA の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ムコ多糖類が混在する DNA 溶液から DNA を精製する方法に関する。特に、本発明は、アコヤガイ等の貝類や多くの藻類などムコ多糖類を大量に含有する生物試料から抽出した DNA 溶液に混在するムコ多糖類を除去し、高純度の DNA を大量に精製する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、水産生物の遺伝的系統や品種を調べたり、種苗の遺伝的多様性を検査して近交弱性の危険を予防するなど対象生物の遺伝的特性を評価する必要性が高まっている。DNA をかかる遺伝子解析に供するためには、対象生物の個体、器官、組織、または培養細胞からの DNA が、高分子量を維持したままで、しかも酵素反応の基質となりうる純度にまで精製されていなければならない。殊に、PCR やサザンブロッティングなどの高感度遺伝子検出法を用いる最近の研究では、その対象の DNA が高純度に精製されていることが前提となる。

【0003】これまで生物試料から DNA を精製するには、一般的には、細断した生物個体、器官、組織、あるいは培養細胞をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 等で溶解し、蛋白質分解酵素を加えてインキュベートして蛋白質を分解し、その後フェノール抽出またはヨウ化ナトリウム処理、または塩析法による蛋白質の沈殿除去を行なった後、エタノールまたはイソプロパノールを加えて DNA 画分を沈殿させることにより行われている。

【0004】ところが、貝類や藻類などのムコ多糖類を多量に含有する生物試料では、上記の手法にて DNA を精製してもムコ多糖類が除去されずに残ってしまう。ムコ多糖類が DNA 試料中に混在すると、制限酵素による DNA の切断反応や耐熱性 DNA ポリメラーゼ等の酵素反応が阻害され、その結果、PCR を利用した技術やサザンブロッティング、マイクロサテライト DNA フィンガープリント法等への応用が出来ないなど問題が生じる。

【0005】これまでムコ多糖類の DNA 溶液からの除去には、一般的にはセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 処理、ボロン修飾ビーズによる処理等がなされており、生物種によっては良好な結果を得ているが、貝類の一部や藻類など多量にムコ多糖類を含む生物試料からの DNA の精製には有効ではない場合が多

い。また、DNA 試料を精製する他の方法として、市販のスピンカラム等が用いられている。これは、DNA のリン酸基の負電荷を利用してシリカや DEAE 等の担体に DNA を一時吸着させ、不純物を緩衝液で洗い流し、その後 pH や塩強度を変えて DNA を担体から溶出させて得るのであるが、ムコ多糖類の多くは負電荷を持っているため DNA と同じ挙動を示し除去することはできない。

【0006】一方、ヒドロキシアパタイトを用いて DNA を精製することに関し、既にいくつかの報告があるが [Wu, R. Jay, E. and Roychoudhury, R. (1976), *Meth ods Cancer Res.* 12:87-176, Wilkie N.M. and Cortini R. (1976), *Journal of Virology* 20:211-221]、それらはアガロースゲル電気泳動で分離した DNA の精製を目的としたものであり、ゲル電気泳動やエレクトロエリユーションとの組合せで用いられていて、多検体の同時精製処理には適さない。したがって、かかる方法では、生物試料 1 g 当たりから 10 μg 以上の精製 DNA を複数検体から同時に得ることは至難である。

【0007】また別の方法として、DNA をアガロースゲル電気泳動して、アガロースゲル電気泳動途中で DEAE メンブレンなどの陽電荷膜に吸着させることによりムコ多糖類を除く方法もあるが [Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6:24-27]、かかる方法もまた、15 キロベース以上の長い DNA では極めて収率が悪く、生物試料 1 g 当たりから 10 μg 以上の精製 DNA を複数検体から同時に得ることは至難である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の課題は、ムコ多糖類が混在する DNA 溶液からムコ多糖類を除去して高純度の DNA を大量に、しかも複数検体から同時に精製する簡便な方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ムコ多糖類を含有する生物試料から抽出した DNA 溶液をヒドロキシアパタイトを用いて精製することにより、高純度の DNA を大量に得ることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、ムコ多糖類が混在する DNA 溶液から、DNA とムコ多糖類の吸着性の差異を利用して DNA を精製する方法において、吸着性物質としてヒドロキシアパタイトを用いることを特徴とする、DNA の精製方法である。本発明はまた、生物試料を尿素を含有する緩衝液にて抽出することにより得られたムコ多糖類が混在する DNA 溶液から、DNA とムコ多糖類の吸着性の差異を利用して DNA を精製する方法において、吸着性物質としてヒドロキシアパタイトを用いることを特徴とする、DNA の精製方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】本発明のDNAの精製方法の対象となる生物試料としては、ムコ多糖類を含有する生物試料であれば特に限定はされないが、具体的にはムコ多糖類が多量に含まれるアコヤガイ・シロチョウガイ・クロチョウガイ・マルドブガイ・カラスガイ・イケチョウガイ・カワシンジュガイ等の海産および淡水産の貝類、またはカイガラアマノリ・アサクサノリ・スサビノリ・マクサ等の紅藻類、ヒトエグサ・アオサ・ウスバアオノリ等の緑藻類、コンブ・ワカメ・モズク等の褐藻類、珪藻類等から選ばれる藻類、あるいはシラカバ・マツタケ・イチゴ、サトイモ等の陸上植物が挙げられる。

【 0 0 1 1 】生物試料からのDNAの抽出は、上記に挙げた生物の個体、器官、組織または培養細胞に対して行えばよい。本発明において生物試料からのDNAの抽出は、DNAの抽出に常套的に用いられるトリス塩酸緩衝液に、SDSなど細胞を溶解するための界面活性剤、DNA分解を防ぐEDTAを添加した緩衝液にて行い、好適には尿素を含有させたものがよい。尿素を含有する抽出液としては、具体的には、後記実施例に記載する組成を有するTNES - UREA緩衝液が好適に使用される。

【 0 0 1 2 】DNAの抽出は、例えば上記生物試料の組織を細断または破碎したものを、その重量(g)の10~20倍量(ml)程度のTNES - UREA緩衝液中で70~80度で5分間インキュベートし、その後56度で8~24時間インキュベートすることにより行う。また、上記のDNAの抽出において56度に移行した後に、プロテナーゼKにて処理してタンパク質を消化し、続いて、試料由来のタンパク質の分解物および酵素類(プロテナーゼKなど)を変性除去する目的でフェノール処理を常套的な手段にて行う。

【 0 0 1 3 】次に、上記の抽出により得られたDNA溶液をヒドロキシアパタイト($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$)を用いて精製する。本発明で用いるヒドロキシアパタイト($\text{Ca}_5(\text{P O}_4)_3(\text{OH})$)は、通常のクロマトグラフィー用充填剤として市販されているものであれば特に限定はされず、例えばバイオゲルハイドロキシアパタイトDNAグレード・バイオゲルHPT(130-0520)(Biorad製)、ヒドロキシルアパタイト(Code 187-37)(Nakalai tesque製)等が例示される。

【 0 0 1 4 】ヒドロキシアパタイトを用いてDNA溶液を精製するには、具体的には、DNA溶液にヒドロキシアパタイトを添加し、インキュベートすることによりDNA溶液中のDNAを夾雑成分(ムコ多糖類、RNA等)とともにヒドロキシアパタイトに吸着させ、その後、ヒドロキシアパタイトに吸着した夾雑成分を各種の緩衝液にて逐次的に溶出させ、最後にヒドロキシアパタイトに吸着したDNAを高リン酸塩濃度の緩衝液にて溶出させる。

【 0 0 1 5 】具体的には、上記のフェノール抽出により

得られた上層(水層)を別の容器に移し、ヒドロキシアパタイトを添加し、穏やかに攪拌させて5分間放置し、ヒドロキシアパタイトを沈降させた後、吸引除去により上清を除去し、その後2.5 M NaCl-TE 緩衝液(pH 8.0)を加えて穏やかに攪拌し、5分間放置してヒドロキシアパタイト沈降させた後に上清を除去する。かかる操作により、DNAはヒドロキシアパタイトに非常に強く結合して吸着される一方、負電荷を持った殆どのムコ多糖類は、2.5 M NaClの塩濃度によりヒドロキシアパタイトへの吸着が弱まって洗い流される。

【 0 0 1 6 】その後、0.2mM EDTAを含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を用いて数回上記と同様にしてヒドロキシアパタイトを洗浄した後、0.2mM EDTAを含む200mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)による洗浄を数回繰り返すことによって、ヒドロキシアパタイトに結合して残っている可能性のあるリン酸基を有するムコ多糖類、さらにはRNAや一本鎖DNAもまた除去することができる。このようにRNAアーゼを用いずにRNAをDNAから除去できるということも、当該発明の副次的な長所の一つである。

【 0 0 1 7 】次に200 mMリン酸ナトリウム緩衝液を出来る限り吸引除去した後、0.2 M EDTAを含む0.9 Mのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を加え、チューブごと穏やかに攪拌することによってヒドロキシアパタイトに吸着したDNAを解離させ、1,000gで5~15分間遠心を行なってヒドロキシアパタイトを強固に沈殿させ、上清を別の容器に移す。最後に得られた上清中のDNAを常套的な手段にて脱塩・濃縮し、目的とするDNAを得る。上記操作は10検体以上の生物試料に対して同時に行うことができ、生物試料1 g(湿重量)から10 μ g以上の大量の精製DNAを得ることができる。

【 0 0 1 8 】

【実施例】以下の実施例により本発明をさらに説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

〔実施例1〕(アコヤガイ貝柱からのDNAの精製)

(1) DNAの抽出

アコヤガイの貝柱を採取し、-20度で凍結した。別途調製した表1に示す組成から成るTNES - 4M - UREA緩衝液を、50ml容量の使い捨て型遠心チューブ(以下、チューブという)に20ml加え、75度に加温した。

【 0 0 1 9 】

【表1】

TNES - 4M - UREA 緩衝液	
1M TrisHCl(pH8.0)	10ml
2M NaCl	60ml
0.5M EDTA(pH8.0)	20ml
20% SDS	25ml
尿素	240.24g

蒸留水を加えて1リットルにする。

【 0 0 2 0 】前記の凍結したアコヤガイ貝柱を、約2~3

5

mm角になるように氷上でハサミで切り、この貝柱の細片を直ちに75 に加温したTNES - 4M - UREA緩衝液入りチューブに加え、75 のままで5分間放置した。次いで該チューブを56 の振盪インキュベーターに移し、20分後に10 mg/mlのプロテナーゼK溶液を200 µlに加え、貝柱の組織の形が溶けて溶液が均一になるまで約80 rpmで振盪インキュベートし続けた。その後、室温(25)で20 mlのフェノールを加え、同温度で10分間ゆっくり攪拌し、1,000 g、15分間遠心した。上清を別の50 ml 容量のチューブに採取した。

【 0 0 2 1 】 (2) DNAの精製

前記上清を入れた50 ml容量のチューブにヒドロキシアパタイト〔バイオゲルハイドロキシアパタイトDNAグレード バイオゲルHPT(130-0520) (Bio-Rad製)〕2gを加え、約1分間穏かに攪拌した。TE(pH 8.0)をチューブ一杯(50ml)まで加えてさらに約1分間穏かに攪拌し、5分間チューブを立てて放置したところ、ヒドロキシアパタイトが沈降した。アスピレーターで上清約35 mlを取り除き、再びTEをチューブ一杯まで加えて約1分間攪拌し、5分間放置した。上清を取り除き、同じチューブに2.5M NaCl-TE緩衝液をチューブ一杯まで加えて約1分間攪拌した後、5分間放置した。アスピレーターで上清を取り除き、同じチューブに2.5M NaCl - TE緩衝液をチューブ一杯まで加えて約1分間攪拌した後、5分間放置した。次いでアスピレーターで上清約35 mlを取り除き、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) - 0.2mM EDTAをチューブ一杯まで加えて約1分間攪拌し、5分間放置し、上清35 mlを取り除く操作を3回繰り返して行なった。さらに、200mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) - 0.2mM EDTAをチューブ一杯まで加えて約1分間攪拌し、5分間放置し、上清35 mlを取り除く操作を2回繰り返して行なった。最後に、0.9 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) - 0.2mM EDTAをチューブに15ml加えて攪拌し、1000g で15分間遠心した。以上の操作は全て室温(25)にて行なった。

【 0 0 2 2 】 (3) 精製されたDNAの濃縮および脱塩
上記で遠心したチューブの上清約24 mlを新しいチューブにとり、蒸留水を加えて30 mlとし、3M酢酸カリウム(pH5.5)を15 ml 加え、Qiagen - tip500を用いてDNAを濃縮した。以上の操作はQIAGEN Plasmid Purification Handbook(January, 1997) のProtocol 9以降に従った。上記の操作により、19個体のアコヤガイの貝柱約1gからそれぞれ以下の表2に示す量のDNAが得られた。

【 0 0 2 3 】

【表2】

6

アコヤガイ各個体から抽出・精製されたDNA量

個体番号	精製DNA量(µg)
#1	140
#2	71
#3	144
#4	74
#5	59
#6	37
#7	31
#8	88
#9	112
#10	86
#11	69
#12	99
#13	42
#14	128
#15	51
#16	85
#17	41
#18	119
#19	108
平均	83.4(±35.2)
最高	144
最低	31

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】 図1に上記のアコヤガイの貝柱から精製されたDNAの吸収スペクトルの一例を示す。また、19個体のうちの8個体のアコヤガイ(#1~ #8)から精製されたDNAのアガロースゲル電気泳動パターンを図2に示す。図2に示す泳動パターンより、高分子量の位置(約2万bp)に、アコヤガイDNAのバンドが観察された。

【 0 0 2 5 】 さらに、別の2個体(#1および#3)から精製されたDNA(10 µg / 個体)を制限酵素AluIおよびHinfIで消化した。これに等量のプラスミドpUC118を加えて切断状況をモニターする指標とした。アガロースゲル電気泳動パターンを図3に示す。消化されたアコヤガイDNAのスミアバンドの上に乗っているpUC118の断片のパターンが、右端のレーンのプラスミド単独での完全消化パターンと一致していることから、アコヤガイのDNAも完全に消化されたものと判断した。

【 0 0 2 6 】 表2に記載のアコヤガイ19個体から精製されたDNAを各40ng用いて、PCRが正常に働くかどうかを調べた。既にCampbell, D.C., Hoekstra, K.J. and Carter, J.G. (1997) (in) Johnston, P.A. and Haggart, J.(Eds.), The Bivalvia :Half a Billion Years of Evolution-Essays in Honor of Norman D.Newell ;University of Calgary Press (1997)に記載されているメキシコアコヤガイの18SリボソームRNA遺伝子の配列などに基づいて設計したプライマー、18S - rRNA f (5' - AAGGCAGCAGGCRGCAAT - 3')および18S - rRNA r (5' - TACKCTAYTGRAGCTGGART - 3')を合成し、反応液にミネラルオイルを添加した後、以下の条件下でPCR反応を行なった。

PCR反応条件

容量:50 µl

Taqポリメラーゼ: TAKARA Taq (1ユニット)

プライマー量: 各20 pmol

dNTP: 各10 nmol

マグネシウム濃度: 2 mM

反応チューブ: 0.6 ml容量

96 で30秒、50 で1分、70 で2分を1サイクルとして

40サイクル

【 0 0 2 7 】得られたPCR産物のアガロースゲル電気泳動パターンを図 4 に示す。使用したDNAのいずれから、予想された長さ(185 bp)のPCR産物が得られた。この結果より、ムコ多糖類によるPCR反応の阻害は全く起きていないことが確認された。図 4 中のレーン1~19 は、それぞれ表 2 の個体番号 # 1 ~ 19 に対応している。またレーン20は大腸菌のDNAを用いた場合のPCR産物のアガロースゲル電気泳動パターンを示し、アコヤガイのアガロースゲル電気泳動パターンとは異なる位置に複数の非特異的と思われるバンドが観察された。

【 0 0 2 8 】〔実施例 2 〕(スサビノリ糸状体からのD

各系統のスサビノリ糸状体から抽出・精製されたDNA量

系統名(湿重量)	精製DNA量(μg)
0 1 2 0 (1g)	2 5
0 1 3 0 (0.5g)	3 4

【 0 0 3 0 】上記のうち0120系から精製されたスサビノリDNAの吸収スペクトルを図 5 に示す。また、同DNAのアガロースゲル電気泳動パターンを図 6 に示す。図 6 に示す泳動パターンより、高分子量の位置(約 2 万 bp)にスサビノリDNAのバンドが観察された。また、両系統から精製されたスサビノリDNA(5 μg/個体)を制限酵素HaeIIIで消化した。これに等量のプラスミドpUC18 を加えて切断状況をモニターする指標とした。アガロースゲル電気泳動パターンを図 7 に示す。消化されたスサビノリDNAのスミアバンドの上に乗っているpUC18の断片のパターンが、右のレーンのプラスミド単独での完全消化パターンと一致していることから、スサビノリのDNAも完全に消化されたものと判断した。

【 0 0 3 1 】さらに表 3 に記載のスサビノリから精製されたDNAを各40 ng用いて、PCRが正常に働くかどうかを調べた。実施例 1 と同様の条件下でPCR を試みたところ、目的のPCR増幅産物が得られた。図 8 にそのアガロースゲル電気泳動パターンを示す。ここで使用した 2 つのプライマー、ITS-F(5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3')およびITS-R(5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')は、アマノリのリボソームRNA遺伝子の介在配列(ITS)を増やすように設計されたものである。アガロースゲル電気泳動の結果、約 1 kbのPCR産物が得られ、これはチシマクロノリで得られた長さとはほぼ一致していた。

【 0 0 3 2 〕〔実施例 3 〕(カイガラアマノリ葉状体からのDNAの精製)

C T A B法のみを用いてカイガラアマノリ葉状体(0.3 g)からDNAの抽出・精製を試みたところ、得られたDNAは制限酵素により切断されず、PCRが働かなかった。このDNAはTE(pH 8.0)に溶解していたので、引き続きTEを加えて10 mlとし、1gのヒドロキシアパタイト〔バイオゲルヒドロキシアパタイトDNAグレード

NAの精製)

試料として0120系および0130系のスサビノリ糸状体を使用した。使用した試料の重量は湿重量で0120系は1g、0130系は0.5gであり、これを液体窒素で凍結した後、零下に冷やした乳鉢内で粉碎した。これ以降は実施例 1 と同様にしてDNAを抽出・精製した。以上の操作により、0120系および0130系のスサビノリ糸状体それぞれから表 3 に示す量のDNAが得られた。

【 0 0 2 9 〕

10 【表 3 〕

・バイオゲルHPT(130-0520)(Bio-Rad 製)〕を添加してDNAを吸着させた。これ以降は実施例 1 のヒドロキシアパタイトを用いた精製法に従って行なった。以上の操作により、0.3gのカイガラアマノリ葉状体から5 μgのDNAが得られた。得られたカイガラアマノリDNAのアガロースゲル電気泳動パターンを図 9 に示す。図 9 に示す泳動パターンより、高分子量の位置(約 2 万bp)にカイガラアマノリDNAのバンドが観察された。

【 0 0 3 3 〕また、精製されたカイガラアマノリDNA 5 μg を、制限酵素HaeIIIで消化した。これに等量のプラスミドpUC18を加えて切断状況をモニターする指標とした。アガロースゲル電気泳動パターンを図 1 0 に示す。消化されたカイガラアマノリDNA(レーン2)のスミアバンドの上に乗っているpUC18の断片のパターンが、プラスミド単独での完全消化パターン(レーン3)と一致していることから、カイガラアマノリのDNAも完全に消化されたものと判断した。

【 0 0 3 4 〕さらに、カイガラアマノリから精製されたDNA 10 ngを用いて、PCRが正常に働くかどうかを調べた。実施例 2 と同様の条件下で実施例 2 で用いた 2 つのプライマーと同じプライマーセットを使用してPCRを試みたところ、目的とするPCR増幅産物が得られた。図 1 1にそのアガロースゲル電気泳動パターンを示す。約1kbのPCR産物が得られ、このバンドはチシマクロノリおよび実施例 2 のスサビノリで得られた長さとはほぼ一致していた。

【 0 0 3 5 〕

【発明の効果】本発明によれば、ムコ多糖類が混在するDNA溶液からムコ多糖類を除去して高純度のDNAを大量に、しかも複数検体から同時に精製する簡便な方法が提供される。本発明方法によれば、ムコ多糖類を含有する生物試料 1 g(湿重量)からサザンブロッティング等の遺伝子分析に供するに十分な量である10マイクログ

ラム以上の精製DNAを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法によりアコヤガイの貝柱から精製されたDNAの吸収スペクトルを示す。

【図2】本発明の方法によりアコヤガイ8個体（#1～#8）から精製されたDNAのアガロースゲル電気泳動写真である。図中のM（両端のレーン）は分子量マーカーを示す。

【図3】本発明の方法によりアコヤガイから精製されたDNA 10 μg を2種の制限酵素（AluI, HinfI）でそれぞれ消化し、プラスミドpUC118を加えてこれを切断状況のマーカーとした場合に生成したDNA断片のアガロースゲル電気泳動写真である。図中のM（左端のレーン）は分子量マーカーを示す。

【図4】本発明の方法によりアコヤガイ19個体（#1～#19）から精製されたDNA、および大腸菌のDNAについてPCRを行なった場合に得られたPCR産物のアガロースゲル電気泳動写真である。図中のM（両端のレーン）は分子量マーカーを示す。

【図5】本発明の方法によりスサビノリ（0120系）糸状体から精製したDNAの吸収スペクトルを示す。

【図6】本発明の方法によりスサビノリ（0120系）糸状体から精製したDNAのアガロースゲル電気泳動写真である。図中のM（両端のレーン）は分子量マーカーを示す。

す。

【図7】本発明の方法によりスサビノリ糸状体から精製したDNA 5 μg を制限酵素HaeIIIで消化し、プラスミドpUC118を加えてこれを切断状況のマーカーとした場合に生成したDNA断片のアガロースゲル電気泳動写真である。図中のM（両端のレーン）は分子量マーカーを示す。

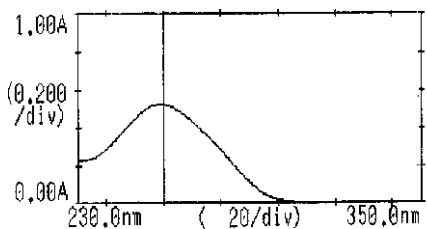
【図8】本発明の方法によりスサビノリ糸状体から精製したDNAをPCRにかけて得られたPCR産物のアガロースゲル電気泳動写真である。図中のM（両端のレーン）は分子量マーカーを示す。

【図9】本発明の方法によりカイガラアマノリ葉状体から精製したDNAのアガロースゲル電気泳動写真である。図中のM（左端のレーン）は分子量マーカーを示す。

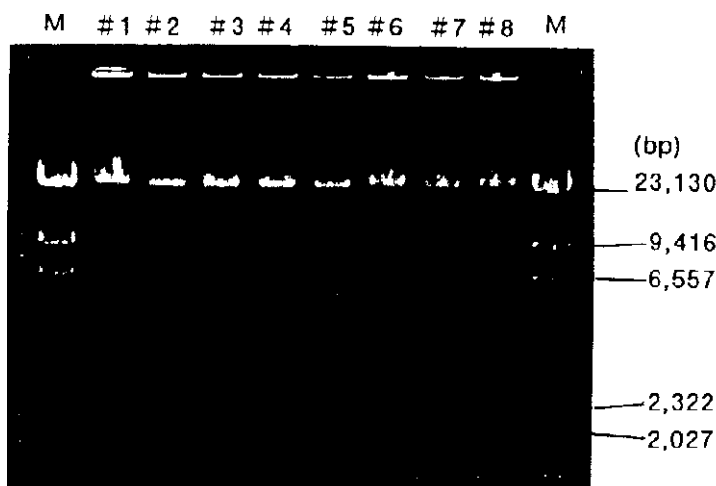
【図10】本発明の方法によりカイガラアマノリ葉状体から精製したDNA 5 μg を制限酵素HaeIIIで消化し、プラスミドpUC118を加えてこれを切断状況のマーカーとした場合のアガロースゲル電気泳動写真である。図中のM（両端のレーン）は分子量マーカーを示す。

【図11】本発明の方法によりカイガラアマノリ葉状体から精製したDNAをPCRにかけて得られたPCR産物のアガロースゲル電気泳動写真である。図中のM（左端のレーン）は分子量マーカーを示す。

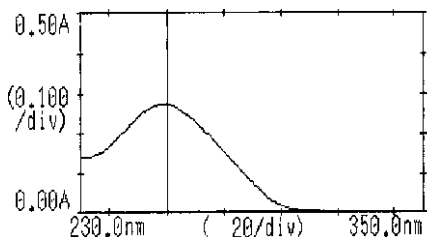
【図1】



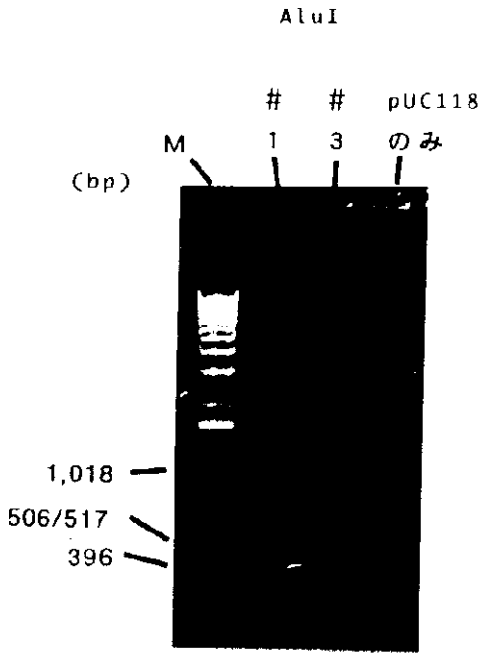
【図2】



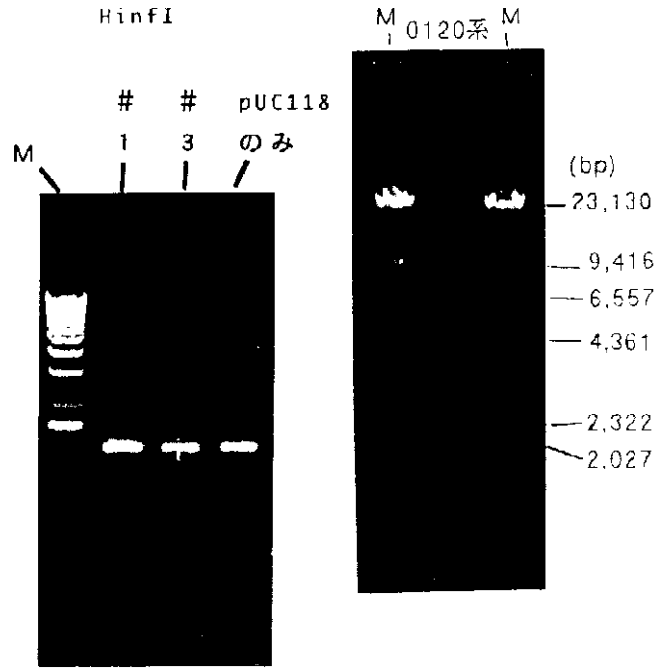
【図5】



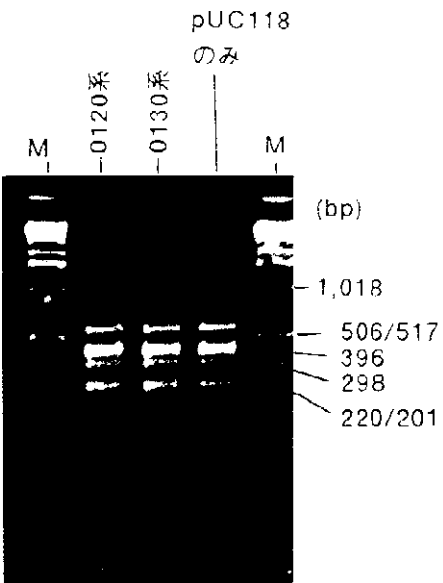
【図3】



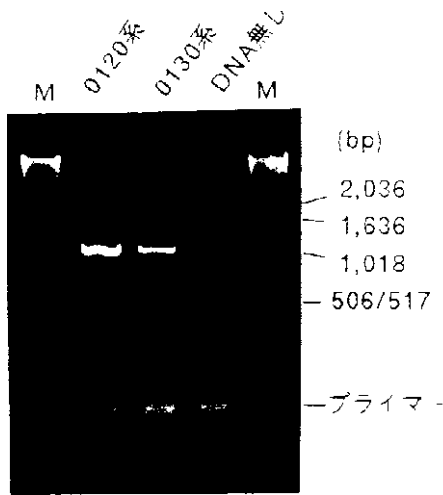
【図6】



【図7】



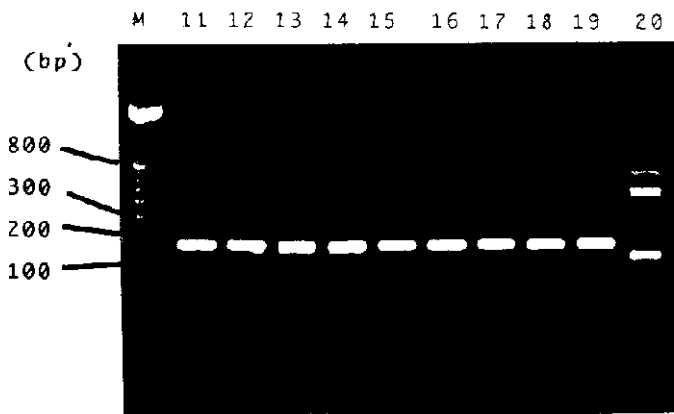
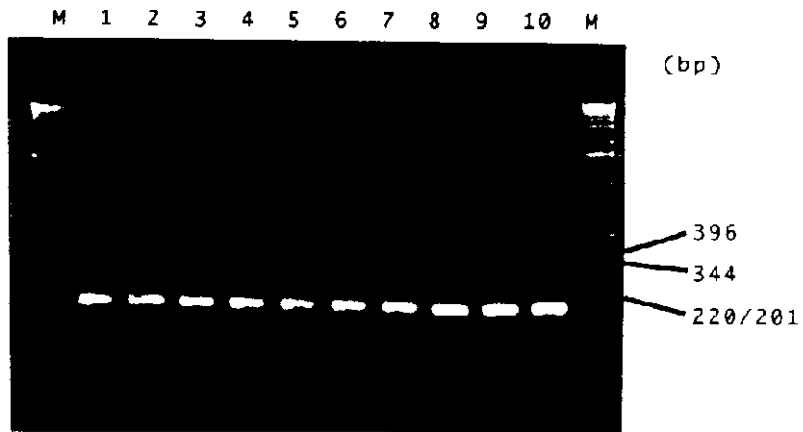
【図8】



【図9】



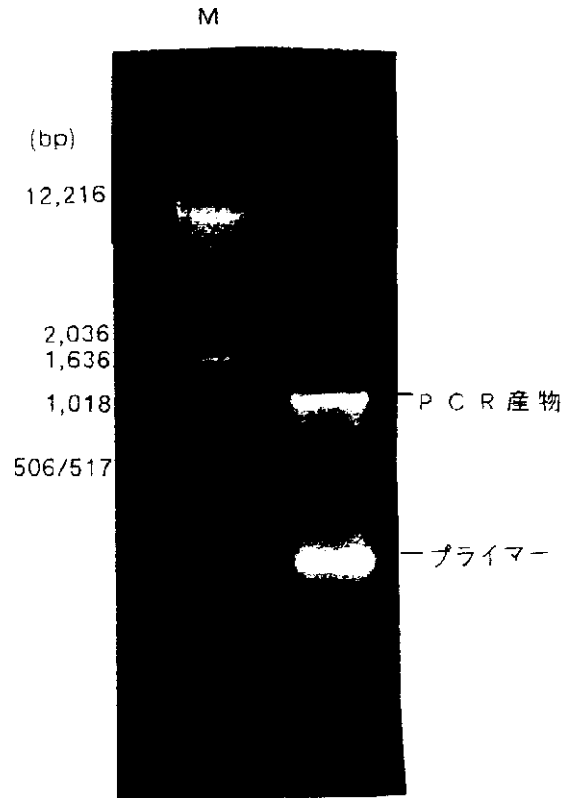
【図4】



【図 1 0】



【図 1 1】



【手続補正書】

【提出日】平成 1 0 年 7 月 2 8 日 (1 9 9 8 . 7 . 2 8)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】図面

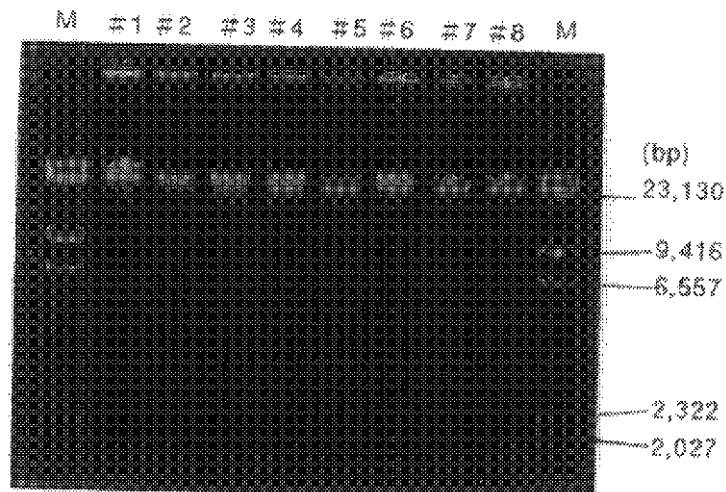
【補正対象項目名】図 2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 2】

図面代用写真



【手続補正 2】

【補正対象書類名】図面

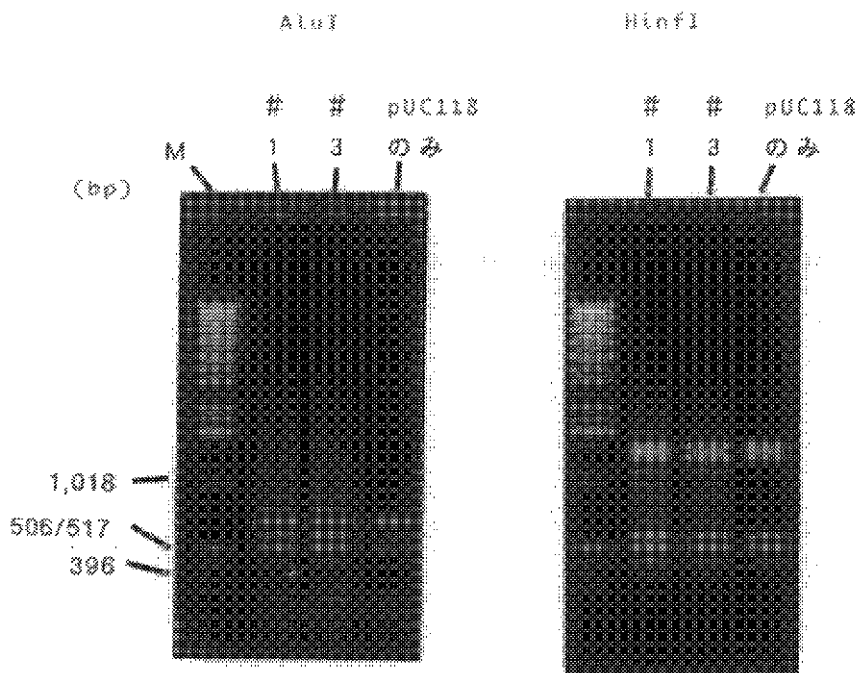
【補正対象項目名】図 3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】

図面代用写真



【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

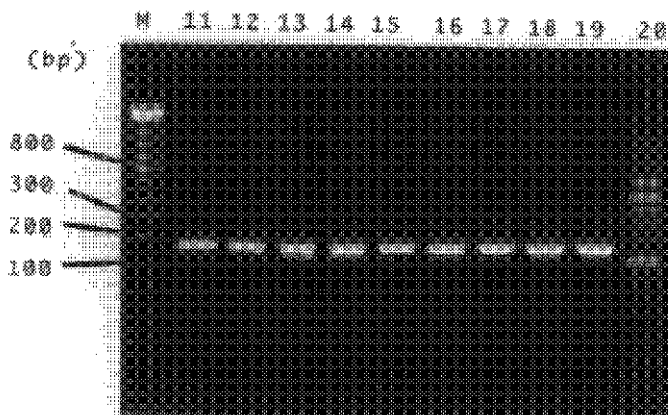
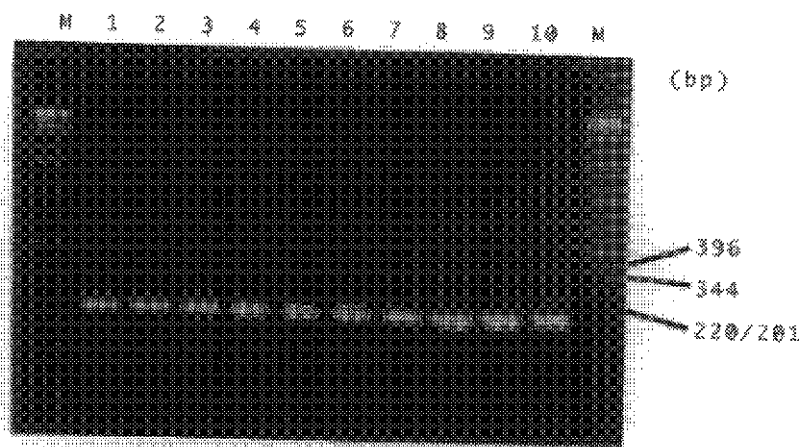
【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正内容】

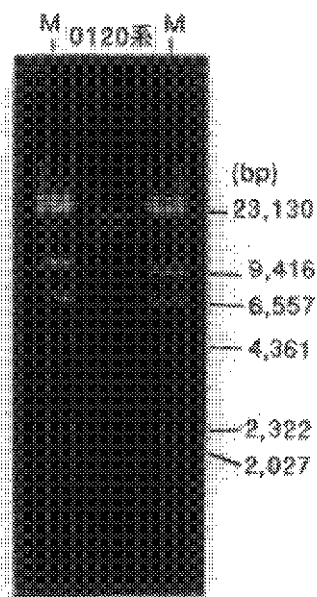
【図4】

図面代用写真



- 【手續補正 4】
- 【補正対象書類名】図面
- 【補正対象項目名】図 6
- 【補正方法】変更
- 【補正内容】
- 【図 6】

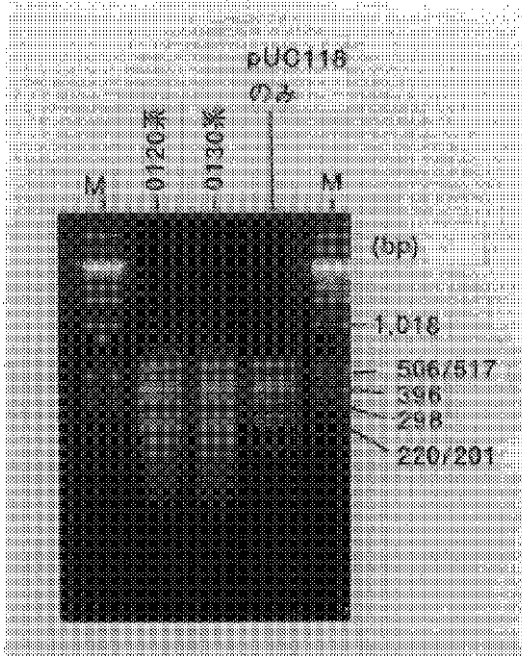
図面代用写真



- 【手續補正 5】
- 【補正対象書類名】図面

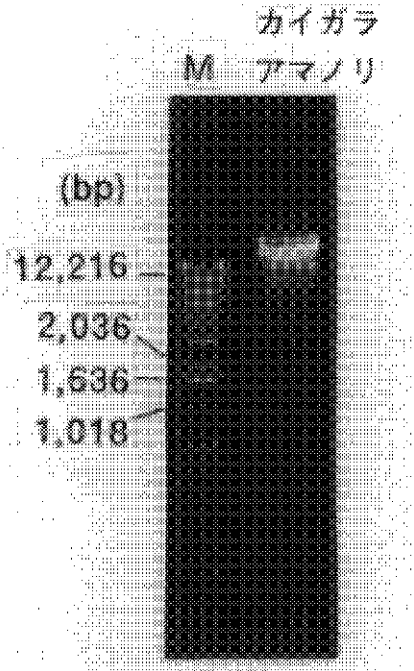
【補正対象項目名】図 7
 【補正方法】変更
 【補正内容】
 【図 7】

図面代用写真



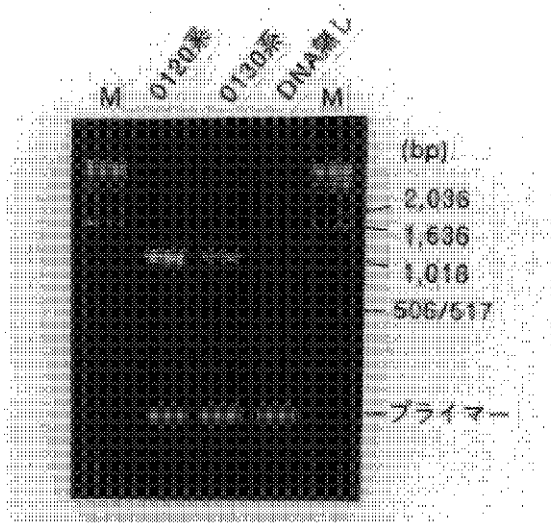
【補正方法】変更
 【補正内容】
 【図 9】

図面代用写真



【手続補正 6】
 【補正対象書類名】図面
 【補正対象項目名】図 8
 【補正方法】変更
 【補正内容】
 【図 8】

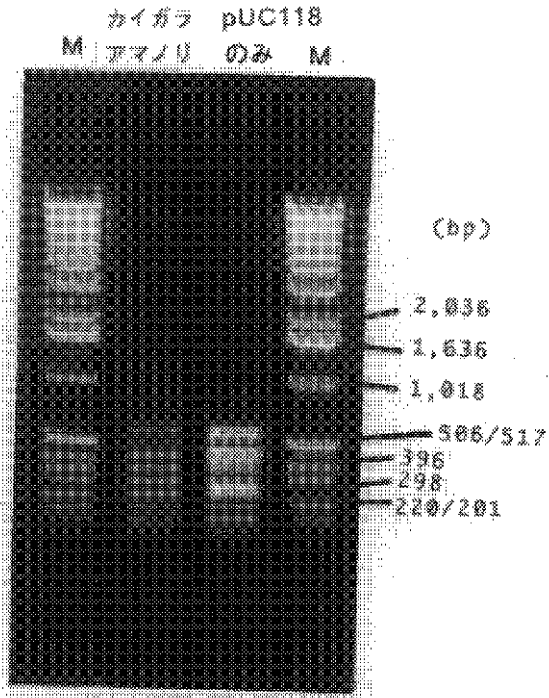
図面代用写真



【手続補正 8】
 【補正対象書類名】図面
 【補正対象項目名】図 10
 【補正方法】変更
 【補正内容】
 【図 10】

【手続補正 7】
 【補正対象書類名】図面
 【補正対象項目名】図 9

図面代用写真



【手続補正9】

【補正対象書類名】図面

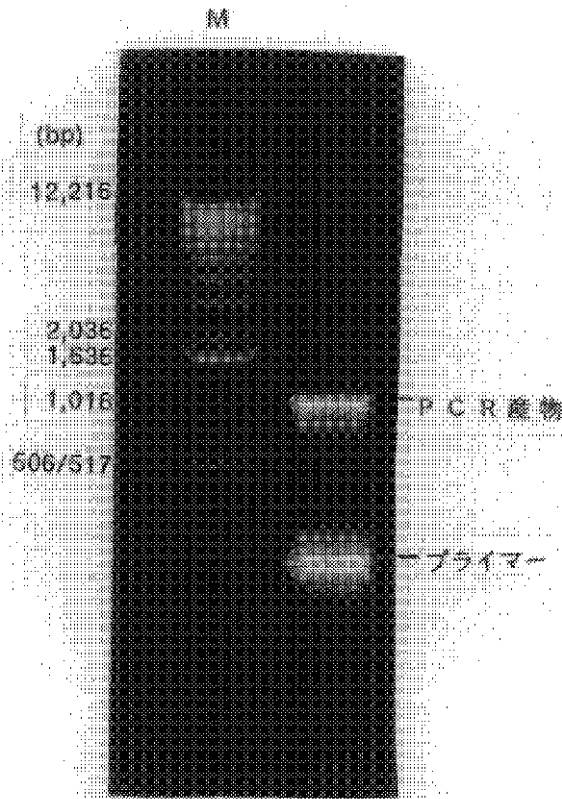
【補正対象項目名】図11

【補正方法】変更

【補正内容】

【図11】

図面代用写真



フロントページの続き

(72)発明者 岡内 正典
三重県度会郡玉城町佐田411番地2号