

1B1a

酸およびスぺルミジン存在下における 単一 DNA 分子の電気泳動挙動の *in situ* 顕微蛍光測定

(広島大院理)

○井下 翔平, 塚原 聡, 岡本 泰明, 藤原 照文

【緒言】 DNA は多価の陰イオンであるために、正極方向に電気泳動現象を示し、その泳動速度の差から分離が行われている。また DNA の水和状態の違いによって、その形態の変化、すなわちランダムコイル-グロブユール転移が起こる事も知られている。本研究では、DNA 分子の形態の変化と電気泳動速度の関係を調べるため、酸およびスぺルミジン存在下における単一 DNA 分子の泳動挙動を蛍光顕微鏡により *in situ* (その場) 測定した。

【実験】 Fig.1 に、今回用いた泳動セルの模式図と顕微蛍光画像の例を示す。伝導性を保つために TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) の 10 倍希釈液、または TAE 緩衝液 (10 mM 酢酸, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) により 2 %アガロースゲルを調製し、これを用いて泳動セルを作製した。電極間のアガロースゲルに深さ 1 mm (大きさ 9×9 mm) の溝を作って泳動部としている。また、白金線(φ0.5 mm)を電極とした。泳動部に DNA 溶液を入れた後、カバーガラスにより密閉した。測定対象には T4GT7DNA(165.6 kbp ; bp : 塩基対)を選び、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) により蛍光ラベル化した。60 倍の水浸対物レンズ(UPlanApo, 開口数 1.2, Olympus)と水銀ランプを備えた正立顕微鏡 (BX-51WI, Olympus) のステージ上に泳動セルをセットして直流電圧を印加し、単一 DNA 分子の形態変化を観測しつつ泳動速度を測定した。顕微画像は CCD カメラを介してビデオで録画し、得られた画像をパーソナルコンピュータで解析した。

【結果と考察】 今回作製した泳動セルと上記の顕微蛍光装置により、単一 DNA 分子の泳動挙動の測定が可能になった。まず、pH を 2~8 の間で変化させると、pH に応じて単一 DNA 分子の形態が変化し、泳動速度は凝縮する程小さくなる事がわかった(Fig.2)。また pH を 7 で一定にして、三価の陽イオンであるスぺルミジン($\text{H}_2\text{NC}_4\text{H}_8\text{NHC}_3\text{H}_6\text{NH}_2 \cdot 3\text{H}^+$)を 0.4~1.1 mM 添加した系では、添加量を増やすと単一 DNA 分子が凝縮し、泳動速度が小さくなるという結果を得た。本実験により、酸およびスぺルミジンによる DNA 分子の電荷の中和が、DNA 分子の形態変化と泳動速度に同時に影響を及ぼしている事が示された。

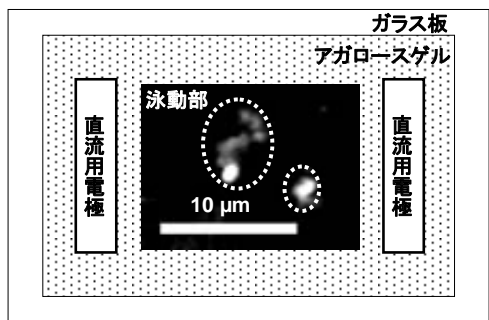


Fig.1 泳動セルの模式図と顕微蛍光画像
(図中点線内の像が単一 DNA 分子)

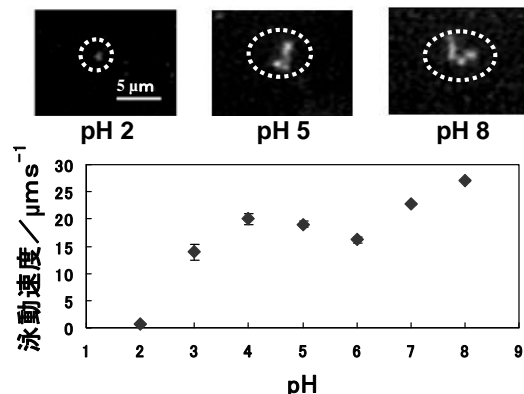


Fig.2 DNA 分子の泳動速度、形態の pH 依存性