

改訂  
第3版

# バイオ実験の進めかた

改訂第3版序  
初版序

1

## 章 遺伝子クローニングと入手方法

佐々木 博己

### A 通常の cDNA クローニングと 入手方法 18

#### A-1. cDNA ライブラリーから cDNA を 手に入れる 18

##### A-1 ① mRNA を調製する 18

① -1 ◆ 細胞質 RNA の調製 18

① -2 ◆ 総細胞 RNA の調製 18

■ AGPC 法 18

その他の方法 — 19

・ グアニジン/セシウム TFA 法,  
塩化リチウム/尿素法

① -3 ◆ mRNA の分離 19

■ オリゴ (dT) を付加させた担体を用いる 19

■ 細胞や組織の溶解, mRNA の分離が一括化された方法 19

##### A-1 ② cDNA ライブラリーの作製と スクリーニング 19

② -1 ◆ cDNA の合成 19

■ Gubler-Hoffman 法 19

■ リンカー/アダプタープライマー法 20

その他の方法 — 21

・ Okayama (岡山) -Berg 法

② -2 ◆ ファージとのライゲーション  
(コンカテマーの形成) 21

② -3 ◆ *in vitro* パッケージング 21

② -4 ◆ ライブラリーの購入 21

■ 既製 cDNA ライブラリーの購入 21

② -5 ◆ ファージのプレーティング 22

② -6 ◆ DNA の塩基配列の相同性を利用して  
選別する (スクリーニング) 22

② -7 ◆ 完全長 cDNA をもつクローンを  
選択する 23

■ 遺伝子の塩基配列がわかっている  
場合 23

■ 部分的な塩基配列しか情報がない場合  
や新しい遺伝子の場合 23

その他の方法 — 23

〔平均化ライブラリーの作製方法〕

・ PCR で増幅した cDNA からつくる方法

・ mRNA からつくる方法

・ 一本鎖プラスミド cDNA ライブラリーから  
つくる方法

#### A-2. PCR によって cDNA を手に入れる 24

■ RT-PCR 法 24

その他の方法 — 24

・ degenerate プライマーを用いた PCR 法

#### A-3. 公的保存施設からの譲渡, 市販の カタログショッピング 25

##### A-3 ① 公的遺伝子供給施設 25

■ ATCC 25

■ JCRB 遺伝子バンク 25

■ 理研バイオリソースセンター 25

■ 農林水産 DNA バンク 25

■ FANTOM project 25

##### A-3 ② 市販のカタログショッピング 25

■ MGC Full Length cDNA  
Collection 25

■ True Clone Collection 25

■ GeneStorm 発現用遺伝子リソース 25

■ Gene Copoeia ORF クローン 25

■ 遺伝子スクリーニング受託 25

#### A-4. 人からの供与 26

### B 遺伝子の発現量や機能をもとにした クローニング 27

#### B-1. 合成オリゴヌクレオチドによる cDNA ライブラリーのスクリーニング 27

#### B-2. mRNA の発現量の差をもとに cDNA を手に入れる 27

B-2 ① cDNA ディファレンシャル  
ハイブリダイゼーション法 28

B-2 ② cDNA サブトラクション法 28

■ cDNA-RDA 法 29

■ CCLS 法	30
■ 一本鎖 cDNA のハイドロキシ アパタイトカラムによる精製	30
その他の方法 — 31	
・ EDS 法	
・ ビオチン化ドライバ cDNA による テスター cDNA の吸収法	
<b>B-2</b> ③ mRNA フィンガープリント法	31
■ DD 法	31
■ RAP-PCR 法	32
■ FDD 法	32
<b>B-3. cDNA の発現クローニング</b>	32
<b>B-3</b> ① 抗体をプローブとする cDNA クローニング	33
■ ウェスタン法の応用	33
<b>B-3</b> ② 細胞に mRNA や cDNA を導入して 目的の cDNA のみを分離する	33
■ アフリカツメガエル卵母細胞を 用いた発現クローニング	33
■ COS 細胞を用いた 発現クローニング	34
■ 酵母を宿主とした動物細胞 cDNA の 相補クローニング	34
<b>B-3</b> ③ タンパク質-タンパク質相互作用を利用して cDNA を手に入れる	34
■ ウェストウエスタン法または ファーウエスタン法	34
■ 酵母 two-hybrid 法	35
<b>B-3</b> ④ DNA-タンパク質相互作用を利用して cDNA を手に入れる	37
■ サウスウエスタン法	37
■ COS 細胞を用いた 発現クローニング	37
 <b>C</b> 同定した cDNA の塩基配列の決定と ホモロジーサーチ	38
<b>C-1. 塩基配列の決定</b>	38
<b>C-1</b> ① キャピラリー電気泳動方式	40
■ ABI PRISM310	40
■ ABI PRISM3100	40
■ Beckman Coulter CEQ2000	40
その他の方法 — 40	
『大規模シーケンス解析装置』	
・ ABI PRISM3700	
・ Molecular Dynamics MegaBASE1000	
・ 島津 RISA-384	
<b>C-1</b> ② スラブゲル電気泳動方式	40
■ ABI377	41
■ Pharmacia ALF	41
■ 日立 SQ-5500	41
■ LI-Cor	41

<b>C-2. ホモロジー検索</b>	41
<b>C-2</b> ① 核酸、アミノ酸のデータベースと 検索プログラム	41
① -1 ◆ データベース	41
■ 核酸のデータベース	41
■ タンパク質のデータベース	41
■ 統合型データベース	41
① -2 ◆ 核酸、アミノ酸の双方向検索プログラム	42
■ blastn	42
■ blastp	42
■ tblast	42
■ blastx	42
■ tblastx	42
① -3 ◆ 機能、ドメインの予測プログラム	42
■ PSI-BLAST	42
■ CLUSTALW	42
<b>C-2</b> ② モチーフデータベース	42
■ PROSITE	43
■ BLOCKS	43
■ Pfam	43

## 2 章 抗体の入手, タンパク質の精製と アミノ酸配列決定

吉田 真太郎

<b>A</b> 抗体を入手する	46
<b>A-1. 抗体を購入する</b>	46
<b>A-2. 抗体を作製する</b>	46
<b>A-2</b> ① ポリクローナル抗体	47
<b>A-2</b> ② モノクローナル抗体	47
 <b>B</b> タンパク質の精製と アミノ酸配列決定	49
<b>B-1. 生体, 細胞からタンパク質を手に入れる</b>	49
<b>B-1</b> ① タンパク質を分画する	49
■ 分泌タンパク質の分画法	49
■ 細胞質タンパク質の分画法	49
■ 核内タンパク質の分画法	50
■ 膜タンパク質の分画法	50
■ ミトコンドリアの分画法	50
■ ミクロソームタンパク質の分画法	51
<b>B-1</b> ② タンパク質を分離・精製する	51

② -1 ◆ 沈降法	51
■ 硫酸沈殿	51
■ その他の方法	— 51
・有機溶媒によるタンパク質の沈殿	
② -2 ◆ 電気泳動法	51
■ ポリアクリルアミド (PAGE) 電気泳動法	51
■ 等電点電気泳動法	52
■ 二次元電気泳動法	52
② -3 ◆ カラムクロマトグラフィー	52
■ ゲル濾過クロマトグラフィー	52
■ イオン交換クロマトグラフィー	53
■ 疎水クロマトグラフィー	53
■ 逆相クロマトグラフィー	53
■ アフィニティークロマトグラフィー	53
② -4 ◆ その他	55
■ 限外濾過	55
■ 透析	55

## B-2. アミノ酸配列 (一次構造) の決定

B-2 ① アミノ酸配列分析用タンパク質の調製	55
① -1 ◆ ジスフィルド結合の切断と修飾	55
① -2 ◆ タンパク質の断片化	56
■ 酵素的な断片化	56
■ その他の方法	— 56
・化学的な断片化	
B-2 ② アミノ酸配列 (一次構造) 決定	56
② -1 ◆ Edman 分解法	56
② -2 ◆ 質量分析 (マススペクトロメーター)	57
■ TOF-MASS	57
■ MASS/MASS	58

# 3

## 章 遺伝子産物の生化学的解析

吉田 真太郎

## A タンパク質の酵素活性を解析する

A-1. タンパク質の入手	62
■ 大腸菌に生産させる	62
■ 真核細胞に生産させる (バキュロウイルス合成系など)	62
A-2. 酵素活性を測定する	62
A-2 ① キナーゼ活性測定	63
■ キナーゼ活性をもつ酵素タンパク質	63
■ 自己をリン酸化する酵素タンパク質	63

A-2 ② その他の活性測定	63
■ 脱リン酸化酵素	63
■ 補酵素を必要とする酵素タンパク質	63

## B タンパク質の局在性の検定を行う

B-1. 免疫染色法 (免疫組織化学染色法)	64
B-1 ① 免疫染色法の種類	64
■ 間接法	64
■ ABC 法	64
■ PAP 法	64
■ その他の方法	— 65
・直接法	
B-1 ② 標識物質	65
■ HRP	65
■ ALP	65
■ 蛍光物質	65
■ 重金属 (金粒子など) で標識した二次抗体	65
B-2. 免疫電顕法	65
■ 重金属標識法	65
■ ABC 法	65
■ 酵素標識法	66
■ プロテイン A 法	66
B-3. GFP を利用した局在性検定	66

## C タンパク質-タンパク質の相互作用を調べる

C-1. 融合タンパク質を用いて目的のタンパク質の検出を行う	67
C-1 ① 融合タンパク質の作製	67
① -1 ◆ 大腸菌を利用する	67
■ GST 融合タンパク質合成系	67
■ His-tag 融合タンパク質合成系	68
① -2 ◆ 真核細胞を利用する	68
■ <i>Saccharomyces</i> 合成系	68
■ バキュロウイルス合成系	68
C-1 ② 融合タンパク質の精製	68
■ ゲルタチオンアフィニティークロマトグラフィー	68
■ 金属キレートアフィニティークロマトグラフィー	68
C-2. 抗体を用いて目的のタンパク質の検出を行う	69
C-2 ① 合成ペプチドを利用した抗原の作製	69
■ 合成ペプチド	69
■ <i>Saccharomyces</i> 合成系	69
■ バキュロウイルス合成系	70

C-2 ② 目的タンパク質の検出	70
■免疫沈降法	70
■ウエスタンブロッティング	70
C-3. 表面プラズモン共鳴法	71
C-4. 蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 法	71
C-5. プロテオーム解析	72
■二次元電気泳動法	73
■LC-MS 法	73

## D DNA-タンパク質の相互作用を調べる 74

D-1. DNA 結合因子の解析	74
■ゲルシフト法 (EMSA)	74
■表面プラズモン共鳴法	74
その他の方法 — 75	
・ DNase I フットプリント法	
・ サウスウエスタン法	
D-2. DNA 非結合因子の解析	75
■two-hybrid 法	75
■ファウエスタン法	75
その他の方法 — 75	
・ UV クロスリンク法	

## D-3. クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法 76

## E タンパク質の修飾を解析する 77

E-1. リン酸化の解析	77
E-1 ① リン酸化タンパク質の検出	77
E-1 ② リン酸化アミノ酸の分析	77
E-2. タンパク質に付加した複合糖鎖の解析	78
E-2 ① 糖タンパク質の分離・精製	78
E-2 ② 糖鎖の切断	78
■酵素的処理	78
■化学的方法	78
E-2 ③ 糖鎖の同定	79
E-3. その他の翻訳後修飾の解析	79
■ユビキチンとユビキチン様タンパク質による修飾の解析	79
■アセチル化の解析	79
■メチル化の解析	79
■脂質修飾の解析	80

# 4 章 遺伝子の発現解析

落谷孝広

## A 目的の mRNA の発現している組織、細胞、量、それに時期、期間を知る 84

### A-1. cDNA セットの購入 84

### A-2. mRNA フィルター、ポリ A mRNA アレイの購入 85

### A-3. mRNA の抽出方法 85

■一般のノーザンハイブリダイゼーション法やドットプロット法で mRNA 定量を行う場合 85

■発現量が少ない、クロスハイブリダイゼーションが問題になる場合、また cDNA ライブラリー作製の際 85

■発現量の見当がつかない場合 85

### A-4. 発現情報解析の方法：核酸レベル 85

#### A-4 ① ノーザンハイブリダイゼーション法 85

その他の方法 — 86

- ・ エチジウムブロマイド法
- ・ ハイブリダイゼーション法
- ・ RNA ドットプロット法

#### A-4 ② RNase プロテクションアッセイ法 (リボプローブマッピング) 87

#### A-4 ③ RT-PCR 法 87

#### A-4 ④ リアルタイム PCR 法 87

#### A-4 ⑤ DNA チップ/マイクロアレイ法 87

### A-5. 発現情報解析の方法：細胞・組織レベル 88

#### A-5 ① *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法 88

##### ① -1 ◆ 組織切片の作製 89

■新鮮凍結切片 89

■パラフィン包埋標本 89

■灌流固定標本 89

##### ① -2 ◆ プローブの選択 89

■オリゴプローブ 89

■RNA プローブ 90

##### ① -3 ◆ プローブの標識法の選択 90

■アイソトープ標識 90

■非アイソトープ標識 90

#### A-5 ② *in situ* RT-PCR 法 91

#### A-5 ③ 核 run-on アッセイ法 91

#### A-5 ④ マイクロダイセクション法 92

#### A-5 ⑤ 組織アレイによる遺伝子発現解析法 92

## B 目的の mRNA の発現調節機構を調べる 93

### B-1. 発現はどのレベルで調節されているのかを知る 93

#### B-1 ① 転写レベルでの調節 93

##### ① -1 ◆ 転写調節領域を含む遺伝子断片のクローニング 94

■目的とする遺伝子の cDNA がすでにクローニングされている場合 94

■アミノ酸配列の N 末端が同定されている場合 94

##### ① -2 ◆ クローニングの方法の概要 94

■ゲノム DNA ライブラリーの準備 94

■ゲノム DNA ライブラリーのスクリーニング 94

#### B-1 ② 転写後の各段階で調節されている場合 95

### B-2. 発現調節領域の同定 95

#### B-2 ① プロモーター解析 95

##### ① -1 ◆ レポーター遺伝子発現アッセイ 95

■CAT (クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ) 96

■ルシフェラーゼ 96

■β-ガラクトシダーゼ 96

■GFP (緑色蛍光タンパク質) 96

その他の方法 — 97

・β-グルクロニダーゼ (GUS)

##### ① -2 ◆ 欠失変異体による発現調節領域の解析 97

##### ① -3 ◆ DNase I 感受性テスト 97

##### ① -4 ◆ S1 マッピング 97

##### ① -5 ◆ リボプローブマッピング (RNase プロテクションアッセイ) 98

##### ① -6 ◆ プライマー伸長法 98

#### B-2 ② エンハンサーの同定 99

#### B-2 ③ *in vitro* 転写系 99

##### ③ -1 ◆ *in vitro* 転写活性を有する細胞抽出液の調製 100

■全細胞抽出液 100

■核抽出液 100

##### ③ -2 ◆ *in vitro* 転写反応 100

■run-off 転写法 100

■G-free カセット法 101

### B-3. 転写後の調節機構を知る 101

#### B-3 ① microRNA による発現調節を知る 101

##### ① -1 ◆ 未知の miRNA を探索する場合 101

##### ① -2 ◆ 既知の miRNA の発現プロファイルを解析する場合 101

### B-4. エピジェネティクスによる遺伝子発現調節 102

■PCR 法によってメチル化の有無を検出する方法 102

## C 転写制御因子を解析する 103

### C-1. 転写因子の解析 103

■ゲルシフト法 103

■DNase I フットプリント法 103

■メチル化フットプリント法 103

■UV クロスリンク法 103

### C-2. 転写因子の精製 104

■DNA アフィニティー クロマトグラフィー法 104

■DNA アフィニティーラテックス粒子法 (バッチ法による) 104

■ビオチン-ストレプトアビジンを用いる精製システム 104

その他の方法 — 104

・バッチ法

### C-3. 目的遺伝子と転写因子の相互作用 105

#### C-3 ① チロシンリン酸化抗体による解析方法 105

#### C-3 ② In-gel タンパク質リン酸化アッセイ法 105

#### C-3 ③ レポーターアッセイシステム (キット) 105

## 5 章 細胞・生体レベルの遺伝子機能解析

落谷孝広

## A 培養細胞への遺伝子導入と発現 108

### A-1. 人工変異の導入方法 108

#### A-1 ① 合成オリゴヌクレオチドによる位置指定変異導入法 108

■PCR 法 108

その他の方法 — 109

・ギャップ DNA 法, ウラシル DNA 法

#### A-1 ② 領域指定変異導入法 109

■古典的なエキソヌクレアーゼによる欠失法 109

■亜硝酸による領域指定変異導入法 110

### A-2. 発現ベクターのデザイン 110

#### A-2 ① プロモーター・エンハンサーの選択 110

##### ① -1 ◆ 幅広い細胞種を標的にする場合のプロモーター・エンハンサー 111

■サイトメガロウイルス (CMV) のプロモーター 111

■チミジンキナーゼ (TK) プロモーター	111
■ニワトリ $\beta$ -アクチンの プロモーター	111
■SV40 初期遺伝子プロモーター	111
■CAG プロモーター	111
① -2 ◆ 細胞・組織特異的プロモーター・エンハンサー	111
<b>A-2 ② 発現調節用ベクターの選択</b>	111
■大腸菌のテトラサイクリン耐性オペロンを利用した系	111
■Cre-loxP システム	112
■FLP/FRT システム	113
<b>A-3. 培養細胞への遺伝子導入の方法論</b>	113
<b>A-3 ① 生物学的的方法</b>	113
① -1 ◆ ウイルスベクター	113
① -2 ◆ 特異的受容体を利用する方法	114
① -3 ◆ 細胞融合法	114
■HVJ (センダイウイルス)	114
■ポリエチレングリコール (PEG)	114
■電気的細胞融合法	115
<b>A-3 ② 物理的方法</b>	115
■マイクロインジェクション法	115
■エレクトロポレーション法	115
■ジーンパーティクル (gene gun)	115
その他の方法 — 116	
・ pH, 磁気, 超音波	
<b>A-3 ③ 化学的方法</b>	116
■リン酸カルシウム沈殿法	116
■リボソーム法	116
■DEAE デキストラン法	117
■プロトプラスト法	117
■赤血球ゴースト法, 赤血球膜ゴースト法	117
■マイクロカプセル法	117
<b>A-4. 遺伝子組み込み細胞株の樹立</b>	117
<b>A-4 ① 選択マーカー遺伝子の選択</b>	118
■neo (ネオマイシン) 耐性遺伝子	118
■pSV2neo や pRSVneo 遺伝子	118
■ハイグロマイシン耐性遺伝子 (ハイグロマイシントランスフェラーゼ遺伝子)	118
<b>A-4 ② 薬剤耐性細胞株の樹立</b>	118
<b>A-4 ③ 遺伝子発現細胞株のスクリーニング</b>	119
■DNA の調製	119
■RNA の調製	119
■タンパク質の調製	119
■セルソーターによる選別法	119
■細胞染色法	119
■ELISA	119
■フォーカスフォーミングアッセイ	120

■細胞の浸潤能や運動能の測定	120
■マウスなどの動物への細胞の移植	120
<b>A-5. レポーター遺伝子導入と発現アッセイ法</b>	120
<b>B オリゴヌクレオチドの導入による遺伝子の機能解析</b>	121
<b>B-1. アンチセンスオリゴヌクレオチドのデザインと全体のプロトコール</b>	121
<b>B-1 ① ターゲット部位デザイン</b>	121
<b>B-1 ② プロトコール</b>	121
② -1 ◆ オリゴヌクレオチドの精製	121
② -2 ◆ オリゴヌクレオチドの修飾	122
■S-化修飾	122
■アンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド (AMO)	122
その他の方法 — 122	
・メチル化修飾, アクリジン修飾, アセチレン炭化水素修飾	
② -3 ◆ 実験系の確立	122
<b>B-2. 培養細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入</b>	123
■カチオン性リボソームによる遺伝子導入方法の応用	123
■アンチセンス配列を発現ベクターに組み込む	123
■Antennapedia ペプチド法	123
<b>B-3. RNAi 法のデザイン</b>	123
<b>B-3 ① 標的遺伝子に対する siRNA の配列設計</b>	124
<b>B-3 ② siRNA 配列の特異性の確認</b>	125
<b>B-3 ③ 合成 siRNA か, ベクター型 siRNA かの選択</b>	125
■合成 siRNA の場合	125
■siRNA 発現プラスミドベクター (shRNA) の場合	126
■siRNA 発現ウイルスベクターの場合	126
<b>B-3 ④ 細胞, 動物への導入</b>	127
<b>C 動物個体への遺伝子導入</b>	128
<b>C-1. トランスジェニック</b>	128
<b>C-1 ① トランスジェニック動物作製</b>	128
■マイクロインジェクション法	129
■レトロウイルス感染法	129
その他の方法 — 129	
・アデノウイルス感染法	
■胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いる方法	129

C-1 ② 各種トランスジェニック動物	129
② -1 ◆ トランスジェニックマウス	130
② -2 ◆ トランスジェニックラット	130
② -3 ◆ その他	131
<b>C-2. ノックアウト</b>	131
C-2 ① ノックアウトマウス作製	131
① -1 ◆ ES 細胞による ノックアウトマウス作製	131
■ ターゲティングベクターの構築	132
■ ES 細胞への導入	133
① -2 ◆ saturation mutagenesis による 変異マウス作製	133
C-2 ② その他のノックアウト動物	133
C-2 ③ その他の個体レベルでの遺伝子機能の 抑制方法：RNAi 法	133
<b>C-3. 生体への全身あるいは         局所的遺伝子導入法</b>	134
■ 直接遺伝子導入法	134
■ カチオン性リポソームによる方法	134
■ HVJ-リポソーム法	134
■ ウイルスベクター	135
■ <i>in vivo</i> エレクトロポレーション法	135
■ ミセル化ナノ粒子法	135
■ バイオマテリアルによる 遺伝子導入法	135
<b>C-4. 個体レベルでのイメージング解析</b>	135
■ バイオフィトニクス	136
■ その他の方法	— 136
・ イメージング機器	

<b>D 動物個体の大量変異株のバンク状況と         取得のための利用法</b>	137
■ ジャクソン研究所のホームページ	137
■ Lexicon genetics 社のホームページ	137
■ Federation of International Mouse Resources のホームページ	137

## 6 章 幹細胞 (ES細胞, 間葉系幹細胞) を用いた実験法

落谷孝広

<b>A ES 細胞の樹立と培養, 保存などの         基礎技術</b>	140
<b>A-1. ES 細胞の取り扱い</b>	141
A-1 ① ES 細胞の入手	141
A-1 ② ES 細胞の培養	142

A-1 ③ ES 細胞の保存	142
A-1 ④ フィーダー細胞の取り扱い	142
■ EMFI	142
■ STO	142

<b>A-2. ES 細胞への遺伝子導入</b>	143
A-2 ① ES 細胞に導入可能な遺伝子ベクター	143
A-2 ② 遺伝子導入の方法	143
<b>A-3. ヒト ES 細胞の入手などについての情報</b>	144

## B ES 細胞の分化誘導系を用いた         遺伝子機能解析 145

<b>B-1. ES 細胞を用いた遺伝子機能解析の戦略</b>	145
<b>B-2. ES 細胞の <i>in vitro</i> 分化誘導</b>	145
B-2 ① 培養シャーレ上での分化誘導	146
■ LIF なしフィーダー細胞なしでの 分化誘導	146
■ 特殊物質 (マトリックス) による 分化誘導	146
■ 特殊フィーダー細胞による 分化誘導	146
B-2 ② 胚様体を介した <i>in vitro</i> 分化誘導	148
<b>B-3. ES 細胞の <i>in vivo</i> 分化誘導</b>	148

## C 間葉系幹細胞 150

<b>C-1. 間葉系幹細胞の入手</b>	151
<b>C-2. 間葉系幹細胞の培養</b>	151
<b>C-3. 間葉系幹細胞の分化</b>	151

## 7 章 ポストゲノムとしての         網羅的遺伝子研究

佐々木 博己

### A 癌を含む疾患原因遺伝子の         分離・同定 154

<b>A-1. ポジショナルクローニングによる         遺伝性疾患の原因遺伝子の同定</b>	154
A-1 ① 古典的な多型マーカーを用いた 連鎖解析による原因遺伝子座の決定	155
① -1 ◆ 多型性の検定法	155
■ RFLP (制限断片長多型) を利用	155
■ VNTR を利用	155
■ CA リピートを利用	155

<b>A-1</b> ② SNPs を利用した疾患関連遺伝子の同定 ... 156	
■ dbSNP	156
■ HGVBbase	156
■ ALFRED	156
■ CGAP SNP index	156
■ JSNP	157
■ SNP Database Network in Japan	157
■ JG-SNP	157
■ International HapMap Project	157
■ TSC	157
② - 1 ◆ SNPs を利用した疾患関連遺伝子の同定法 ... 158	
■ アソシエーション法	158
■ 罹患同胞対法	158
■ 伝達不平衡解析法	158
<b>A-2. ポジショナルクローニングによる非遺伝性の癌の原因遺伝子の同定</b> ... 158	
<b>A-2</b> ① 染色体の構造異常の同定 ... 158	
① - 1 ◆ LOH の解析 ... 159	
① - 2 ◆ CGH 法 ... 159	
① - 3 ◆ アレイ CGH 法 ... 160	
① - 4 ◆ ゲノムフィンガープリント法 ... 160	
■ RLGS 法	160
■ AP-PCR 法	161
① - 5 ◆ ゲノムサブトラクション法 ... 162	
■ RDA 法	162
その他の方法 — 162	
・ In-gel renaturation 法	
・ IGCR 法	
・ SIA 法	
<b>A-2</b> ② 染色体の転座・逆位部位の同定 ... 163	
■ 染色体の観察 (カリオタイピング)	163
■ two color FISH 法	163
■ multiple color FISH 法	164
■ 細胞分裂前期染色体での FISH 法	164
■ DNA ファイバー FISH 法	164
<b>A-2</b> ③ メチル化異常の同定 ... 164	
<b>A-3. 候補遺伝子の同定</b> ... 164	
<b>A-3</b> ① データベースを利用する方法 ... 165	
■ NCBI や UCSC のゲノムデータベースを利用する方法	165
■ データベースを利用した <i>in silico</i> 遺伝子同定法	165
<b>A-3</b> ② 実験的に未知遺伝子を分離する方法 ... 165	
■ exon amplification / exon trapping 法	165
■ cDNA セレクション法	166
その他の方法 — 167	
・ BAC, P1 クローンを直接にプローブとする方法	
・ SPM 法	

<b>A-4. 遺伝子変異の同定</b> ... 167	
<b>A-4</b> ① 大きな変化を検索する方法 ... 167	
■ サザンハイブリダイゼーション法	167
■ ノーザンハイブリダイゼーション法	168
<b>A-4</b> ② 点突然変異を含む微細な変化を検索する方法 ... 168	
■ 塩基配列の決定	168
■ DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法	168
■ SSCP 法	169
■ WAVE® 核酸フラグメント解析システムを用いた全自動フラグメント解析	169
その他の方法 — 170	
・ RPA 法	
・ オリゴヌクレオチドアレイによる方法	

## **B** ゲノム網羅的遺伝子機能解析 171

<b>B-1. トランスクリプトーム関連技術</b> ... 171	
■ SAGE 法	172
■ iAFLP/ATAC-PCR 法	174
■ 網羅的な遺伝子発現解析のためのマイクロアレイ法	174
■ ゲノムタイリングアレイによる新規遺伝子のハンティング法	176
■ ChIP on chip によるタンパク質-DNA 複合体の解析法	177
■ mi (micro) RNA の網羅的発現解析法	177

<b>B-2. プロテオーム関連技術</b> ... 178	
--------------------------------	--

<b>付録 効率的なバイオ実験の進めかた</b> ... (佐々木 博己) 179	
その 1 ◆ 試薬と機器をうまく揃える方法 / その 2 ◆ 経験のない実験法を素早く導入する方法 / その 3 ◆ バイオ実験がうまくいく方法 / その 4 ◆ 足りない実験データを早く補充する方法 / その 5 ◆ 実験時間をうまく管理する方法 / その 6 ◆ 実験技術を引き継ぐための効率のよい研究室システム / 【特別編】 その 7 ◆ バイオ研究者への道	

<b>索引</b> ... 196	
-------------------	--

### column — コラム

ゲノム新時代の包括的遺伝子発現解析方法 ... 92	
シグナル伝達研究の成功の鍵 ... 105	
RNAi が基礎研究から創薬・治療までをリードする ... 126	
トランスジェニック動物誕生の「歴史的背景」 ... 138	
幹細胞研究の明と暗 ... 143	
non-coding RNA と smallRNA の台頭 ... 178	