

図 2-1. WKS82/130-9-1 のサザン解析

宿主(WKS82)及び組換え体 (WKS82/130-9-1)の染色体 DNA 20 μ g を制限酵素 *Nco*I で消化し、パンジー-F3' 5' H 遺伝子 (本遺伝子の *Nco*I 切断部位下流から 3' 末端手前まで) をブ

ローブとしてサザン解析を行った。

※WKS82/130-4-1 は本申請には含まれない。

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

**20ug NcoI-digested
pSPB130 Transgenic
and non-Transgenic
Rose DNA**

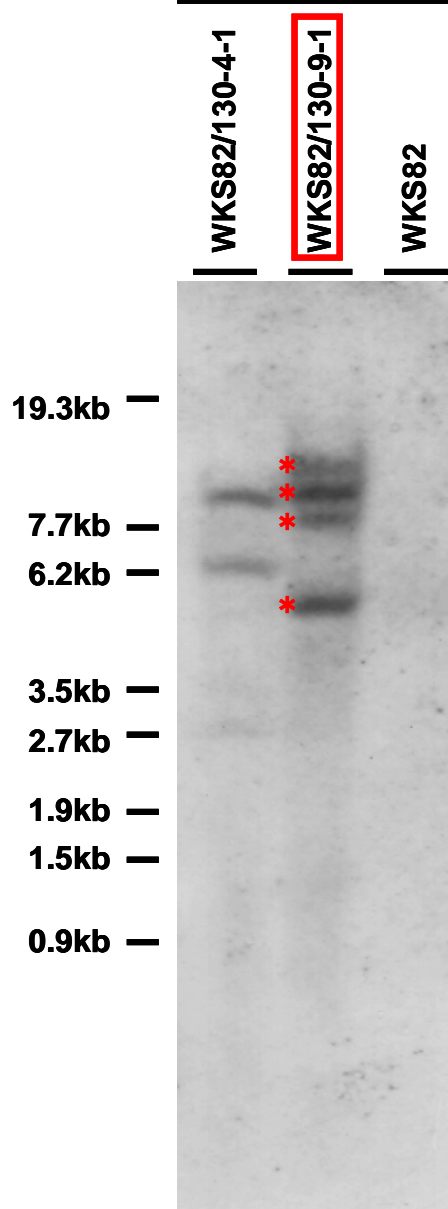


図 2-2. WKS82/130-9-1 のサザン解析

宿主(WKS82) 及び組換え体 (WKS82/130-9-1)の染色体 DNA 20 μ g を制限酵素 *Nco*I で消化し、トレニア 5AT 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った。

※WKS82/130-4-1 は本申請には含まれない。

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

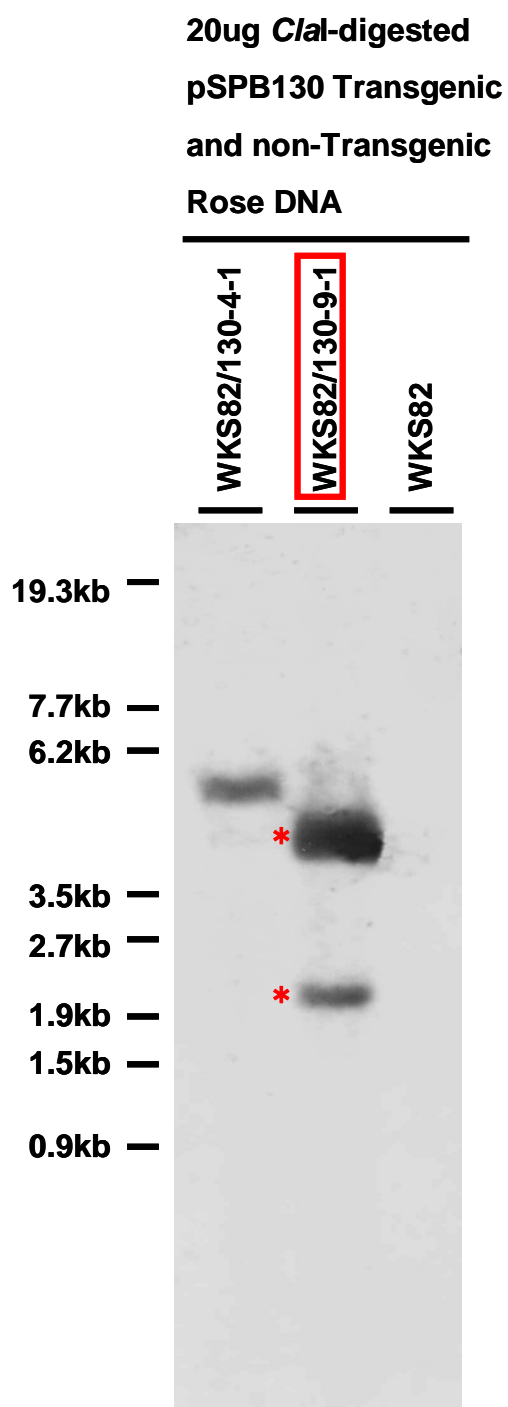


図 2-3. WKS82/130-9-1 のサザン解析

宿主(WKS82) 及び組換え体 (WKS82/130-9-1) の染色体 DNA 20 μ g を制限酵素 *Cla*I で消化し、選択マーカーとして用いたカナマイシン耐性遺伝子、NPT II 遺伝子をプローブとしてサ

ザン解析を行った。

※WKS82/130-4-1 は本申請には含まれない。

(注:本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

3. 当該核酸による形質発現の安定性

3-1. 花卉における当該遺伝子による形質発現の安定性

本組換え体の花卉における導入遺伝子の発現についてノザンプロット法によって解析した。

[実験方法]

宿主及び組換え体の花卉より RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。total RNA 20 μ g を 1.2%ホルムアミド含有アガロースゲルにて電気泳動後、ナイロン膜に転写した。DIG Northern Starter Kit (Roche) に従い、導入遺伝子であるパンジー-F3' 5' H 遺伝子、トレニア 5AT 遺伝子及び大腸菌 NPT II 遺伝子の RNA プローブを作製し、これらを用いて 68°C、16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜を 0.1% SDS を含む 2xSSC を用いて室温、5 分で 2 回洗浄後、0.1% SDS を含む 0.1xSSC を用いて 68°C、30 分で 2 回洗浄し、当該キット製造業者推奨の方法にてハイブリダイズしたシグナルの検出を行った。

[結果と結論]

図 3 に結果を示した。ノザン解析の結果、T-DNA 上の遺伝子のいずれをプローブとした場合でも、組換え体でのみ特異的なシグナルが検出された。よって、組換え体において、ゲノム内に挿入された遺伝子が安定して発現していることが明らかとなった。