

別紙 7 組換えギンドロにおける供与遺伝子の存在状態およびさし木による栄養繁殖個体間の安定性

サザンハイブリダイゼーション (図 1) ; 幼葉 約 20-25mg から抽出したゲノム DNA 5 μ g を制限酵素 *Hind*III で完全切断し、0.8% アガロースで電気泳動した。*AaXEG2* cDNA 全長を PCR-DIG ラベルしたプローブを調製し、化学発光により検出した。その結果、さし木を 2 回繰り返した個体においても移入された *AaXEG2* 遺伝子がゲノム上に安定して存在していることが確認された。

ウエスタンブロッティング (図 2) ; 幼葉 100-200 μ g から抽出した総タンパク質 3 μ g に 2 \times SDS サンプルバッファーを等量加えて 95 $^{\circ}$ C、5 min 反応させることによって直鎖状に変成させ、SDS-PAGE で分離し、エレクトロブロッティングにより PVDF 膜に転写した後、*AaXEG2* 抗体と共にインキュベートし、ECL Western Blotting analysis system (Amersham Pharmacia Biotech 社)により発光検出した。その結果、*AaXEG2* と予想される 28kDa の特異的なバンドが検出され、さし木を 2 回繰り返した個体においても安定して *AaXEG2* タンパク質が産生していることが確認された。

PCR 分析 (図 3) ; キシログルカナーゼ遺伝子に特異的なプライマー (CGGTGACTTCACCCTGTACAACG、GGCCGCGAATTCAGTAGTATTCTCC)を用い、PCR によって導入遺伝子から推測されるサイズのバンドを特異的に検出した。

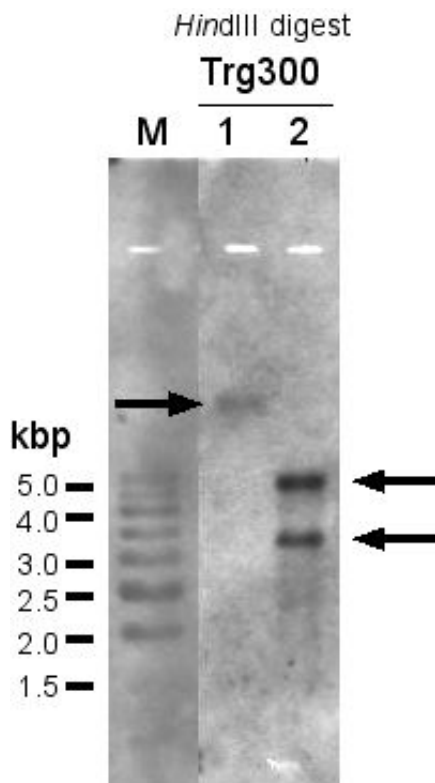


図 1 サザンハイブリダイゼーション

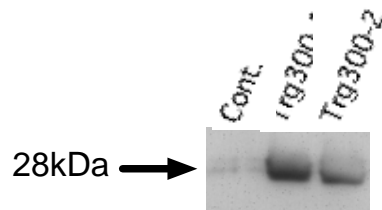


図 2 ウエスタンブロッティング

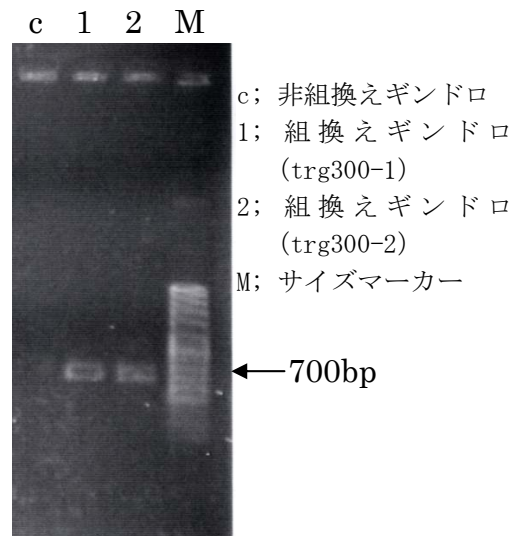


図 3 PCR 分析

別紙 8 特定網室における組換えギンドロの生育評価

図 1 樹高・直径の推移

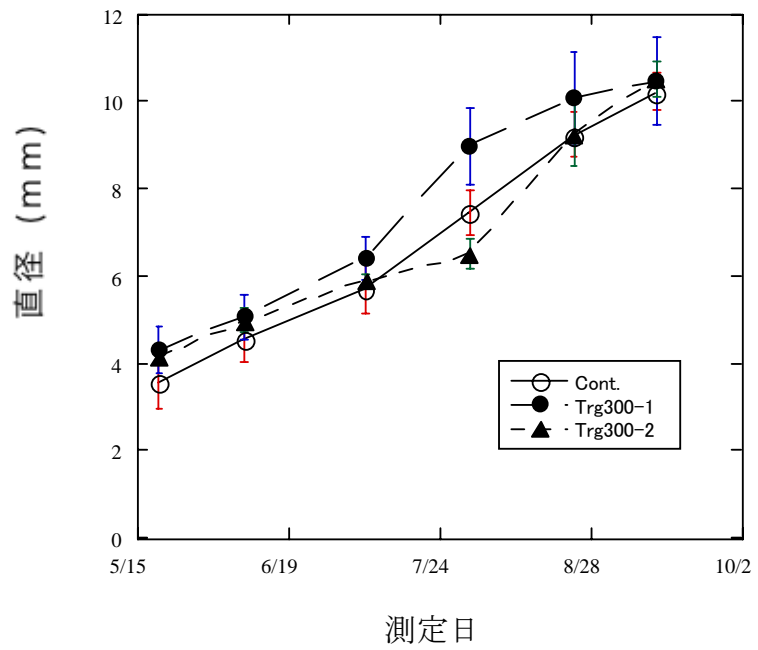
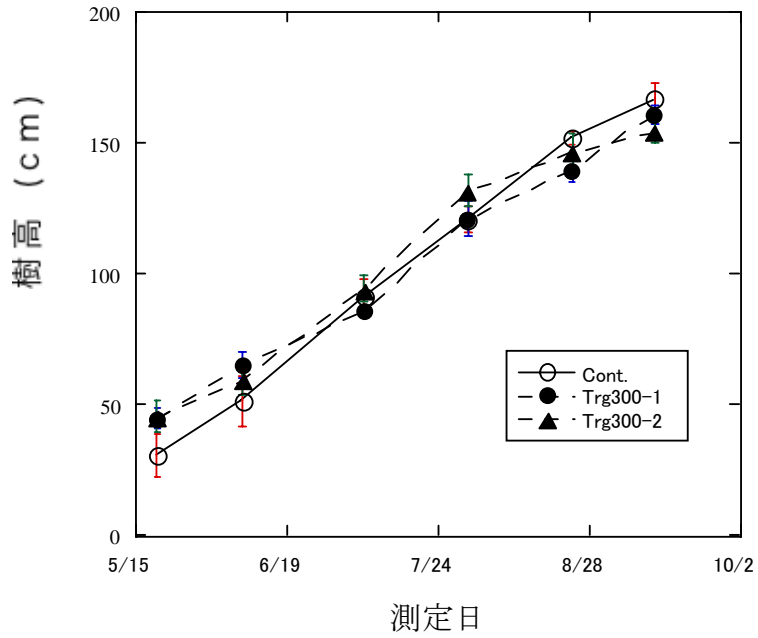


図2 特定網室に移して3ヶ月経過後の様子
図中で *trg300-1* 及び *trg300-2* は組換えギンドロ、WT は非組換えギンドロを示す。

