

タイトル	鮭白子由来二重らせんDNAの抽出・精製の新技术(1)
著者	相川, 雅之; 松永, 政司
引用	北海学園大学工学部研究報告, 32: 133-146
発行日	2005-02-21

鮭白子由来二重らせんDNAの抽出・精製の新技术⁽¹⁾

相川 雅之*・松永 政司**

A New Method of Extraction and Purification of Double Stranded DNA from Salmon Milt

Masayuki AIKAWA* and Masaji MATSUNAGA**

二重らせんDNAをダイオキシン類や発癌性物質等の除去に活用するため、二重らせんDNAを鮭白子より抽出・精製する新技术開発の研究を行った。乳化状白子液中からDNA分子より大きな夾雑物を十分に除去した後に、低分子量の蛋白質あるいは分解されたアミノ酸類等とDNA分子とを透析膜により分画することで、純度が高くかつ高分子量の二重らせんDNAナトリウム塩水溶液を得た。さらに、この水溶液を塩化カルシウム水溶液と反応させることでDNAの沈殿を発生させる新しい精製方法を見出した。これにより、DNAナトリウム塩とDNAカルシウム塩の新しい製造方法が確立された。この製造方法により得られた二重らせんDNAナトリウム塩の純度は95%、DNAカルシウム塩は75%、二重らせんの割合は67%、また分子の大きさはナトリウム塩で10キロ塩基対 (kbp; 平均分子量660万)、カルシウム塩では平均20kbpであった。この新しい製造方法は二重らせんDNAの大量生産を可能にし、かつ大幅なコストダウンをもたらすものと考えられる。

1. はじめに

二重らせんDNAはダイオキシン、ジベンゾフラン、コプラナーPCB、あるいはベンズピレンなどの平面構造をもつ外因性内分泌攪乱物質や発癌性物質とインターカレーションという特異な相互作用をすることが、近年明らかにされつつある⁽²⁾。この相互作用を応用し、これらの有害物質を環境中から除去するためには、高品質で低廉な二重らせんDNAが必要となる。しかし、従来から行われて来ている二重らせんDNAの製造方法では、高品質な二重らせんDNAを得ることはできるが、これを環境問題へ応用するにはコストの面から難しさがあった。⁽³⁾そのため新しい二重らせんDNAの抽出・精製技術の開発が強く望まれていた。そこで我々は、

* 北海学園大学工学部電子情報工学科。

Department of Electronics and Information Science, Faculty of Engineering, Hokkai-Gakuen University

** 日生バイオ株式会社. Nissei Bio Co., Ltd

研究目標として第一に、製品中に占めるDNAの割合が多いこと（DNA純度90%以上）、第二に、二重らせんの占める割合が多く、かつその分子サイズが十分に大きいこと（分子量として約660万程度、これは10万塩基対に相当する）、第三に、大量生産が可能でありかつ製品が低廉であること、を研究目標として掲げ、DNA抽出・精製の新技术開発を行った。

2. 実験

2-1. 二重らせんDNAの原料：二重らせんDNAの原料としては鮭白子が使われた。北海道では年間約4千トンの鮭白子が排出されているが、ごく一部を除いて、そのほとんどが廃棄されている。この未利用の白子中には最大約7%のDNAが含まれているので原料の確保は容易である。また、未利用の水産資源の有効活用という点からも大きな利点と考えられる。

2-2. 二重らせんDNAの抽出方法：鮭白子を解凍し、フードカッターでホモジナイズする。これに水を加えウォーターバス中で溶液を45℃に保ちながらゆっくりとパドル攪拌を行う。さらに蛋白質分解酵素（天野エンザイム(株)製、製品名プロテアーゼP「アマノ」3G、顆粒状、至適pH8.0、至適温度45℃、起源*Aspergillus melleus*）を加える。蛋白分解酵素を添加後6時間経過したら緩衝溶液を加え攪拌を停止し、溶液を冷却する。冷却した溶液を遠心濾過機で濾過し、まず大きな不溶解物質を除去する。ここでは、濾過速度を高めるため、遠心濾過機（(株)コクサン製、上部排出型遠心分離機H-130B）を採用したが、濾布から粗大な不溶解物が強制的に通過させられてしまうことを防ぐため、まず電圧変換器を用いて回転数を750~1000rpmに下げ、また濾布の目の細かいもの（通気量0.5cc/cm²）ものを採用した。次に、この濾液を濾紙（安積濾紙製、保留粒子径3μm）と濾過助剤（セルピュアS1000）を用いて濾過を行った。さらに、この濾液に活性炭（品川炭素製、エリート）を加えゆっくり攪拌した後、濾紙（安積濾紙製、保留粒子径3μm）と濾過助剤（セルピュアS65）を用いて濾過を行い、酵素および活性炭などを除去する。最後に濾液を透析膜に通し、高分子二重らせんDNAナトリウム塩と低分子量の蛋白質あるいはアミノ酸類など、濾過で除去されなかった物質を分画精製する。透析膜を通した二重らせんDNAナトリウム塩水溶液はこのまま凍結乾燥することでDNAナトリウム塩を得ることができる。また、二重らせんDNAナトリウム塩水溶液に希塩酸を加え、弱酸性に調整する。pH調整したDNAナトリウム塩水溶液を約40%の高濃度の塩化カルシウム水溶液中に分散し、DNAカルシウム塩の沈殿を発生させる。沈殿を凍結乾燥する。凍結乾燥後、過剰のカルシウムイオンを除去するために水洗いし二重らせんDNAカルシウム塩を得た。

2-3. 透析膜処理（透析膜によるDNA-蛋白系の精製）：透析膜はペンシル型モジュール

(旭化成ACP - 0053, 透析膜材質ポリアクリロニトリル, ハウジング材質ポリスルホン, 膜内径1.4mm (太内径), 有効膜面積120cm², 分画分子量 (公称) 13,000, 長さ約10cm) およびこれを装着するペンシル型モジュール用小型実験装置 (PS - 2400) を使用した。このモジュールを用いた実験装置のフロー図を図1に示す。

2-3-1. 透析膜系によるDNA-蛋白質系の処理時間依存性; DNA溶液を透析膜装置で循環させ, 一定時間経過ごとに溶液を抜き取り, 凍結乾燥し固体試料を得た。この試料の一定量を水に溶解し, 吸収スペクトル中の260nm極大を測定することでDNA量を概算した。試料溶液を透析膜に通過させると時間の経過と共に溶液は徐々に濃縮され, 溶液量は減少した (図2. 参照)。

得られた二重らせんDNA試料中に含まれる蛋白質の構成成分分析 (アミノ酸分析機, JCL - 500. 北大) を行った。この分析結果の例を表1に示す。表1から, この蛋白質を構成する主要アミノ酸はグリシンであり, DNA溶液中に含まれるこの蛋白質は主にプロタミンであると推定される。また, 分析結果は, 芳香族分子をもつアミノ酸の割合は全アミノ酸に対して1.2%程度と小さく, 従って蛋白質の存在が吸収スペクトルの260nm付近の吸収帯に与える影響はほとんど考慮しなくても良いということも示している。精製されたプロタミン (和光純薬) をDNA溶液に加えたテストからも同様の結果が得られた。従って, DNA水溶液の吸収スペクトル中の260nmピーク強度を測定することでDNA量を概算することができる。

表1. 鮭白子由来二重らせんDNA試料中に含まれる蛋白質の構成アミノ酸成分表

蛋白質構成アミノ酸	各アミノ酸の割合 (%)	蛋白質構成アミノ酸	各アミノ酸の割合 (%)
アスパラギン酸	3.39	イソロイシン	0.88
トレオニン	1.37	ロイシン	1.20
セリン	2.72	チロシン	0.59
グルタミン酸	4.58	フェニルアラニン	0.61
グリシン	24.90	リシン	6.55
アラニン	1.94	ヒスチジン	0.84
シスチン	0.24	アルギニン	45.87
バリン	1.51	ヒドロキシプロリン	0.00
メチオニン	0.40	プロリン	2.42
		合計	100

2-3-2. 透析膜系におけるDNA精製のpH依存性; 透析膜精製時におけるDNA溶液のpH依存性を調べる目的からDNA溶液を水酸化ナトリウムで, pH9.0, pH9.5, pH10.0に調整し, そ

それぞれ透析膜装置に循環させた。各溶液から1時間後、2時間後、5時間後の溶液を抜き出して凍結乾燥し、試料固体を得た。この試料の一定量を水に溶解し吸収スペクトル中の260nmピーク強度からDNA量の全固体中に占める割合を概算した。

2-4. 分析・評価：本研究で採った抽出・精製方法により得られた二重らせんDNAについて、DNAの純度（製品中に占めるDNAの割合）、分子量、および二重らせんの割合を測定した。DNAの純度は、得られた固体試料を一定量とり水に溶解し吸収スペクトルの260nmピーク強度からDNA量を概算した。分子量はアガロースゲル電気泳動法（バイオラッド製、サブマリン電気泳動装置；サブセルGT PP300システム（15×25cm））によって測定した。また、分子量検出試薬（indicator）としてはエチジウムブロマイドを用いた。二重らせんの割合の測定は、二重らせんDNAの特異的定量試薬であるPico Green⁽⁴⁾（Molecular Probes製）を用い、蛍光光度法で測定した。二重らせんDNAのスタンダードとして λ DNA⁽⁵⁾を使用した。

2-5. DNA水溶液と多価金属イオンとの反応：製造コストの削減方法として、有機溶媒を使用せず二重らせんDNAの沈殿を発生させる方法を検討した。テストに用いた試薬は、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、水酸化カルシウム、塩化バリウム、塩化マグネシウムなどである。

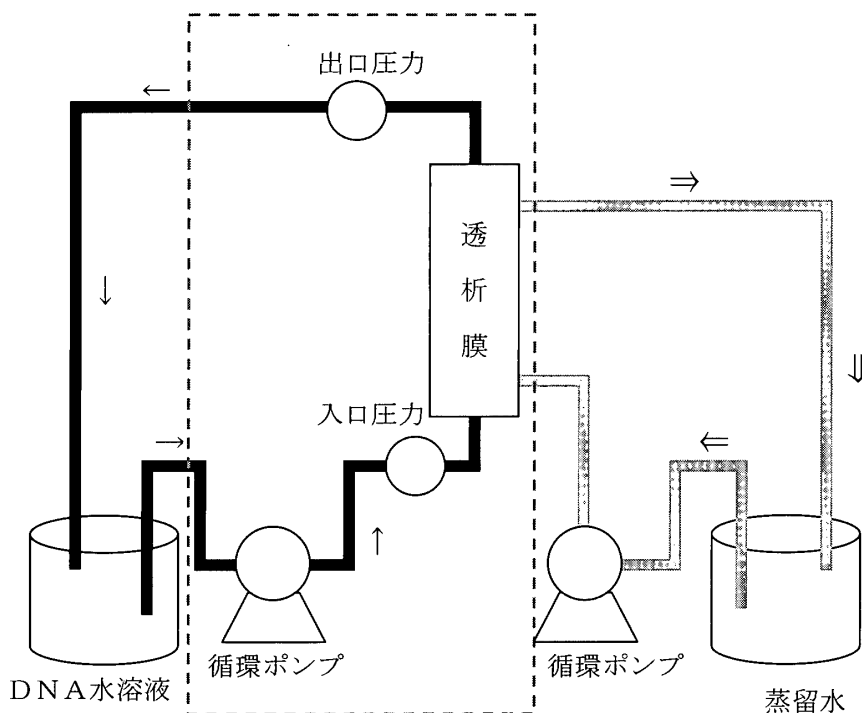


図1. 透析膜を用いた精製・濃縮システム。[] は透析膜小型実験装置内蔵部分を示す。DNA水溶液は中空糸膜の中を通過し、蒸留水は中空糸膜のまわり（外側）を通過する。本実験では蒸留水3Lを1時間毎に交換した（蒸留水のバッチ交換）。水道水を使用することも可能である（水道水のフロー）。

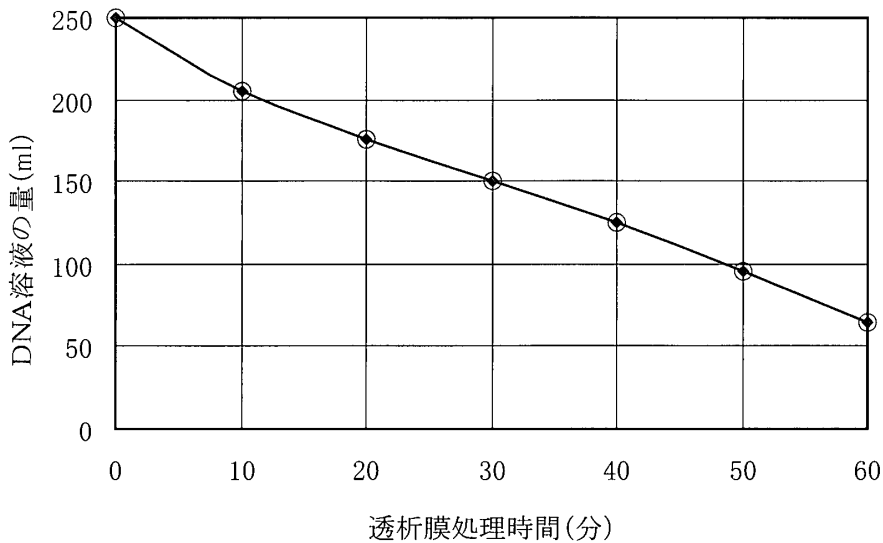


図2. 透析膜処理時間と溶液量の関係 (処理前の水溶液は250ml, 固形分濃度は0.8%)

3. 結果

本実験における各段階での数多くのテストとその組み合わせから、図3のスキームに示した抽出・精製方法がもっとも優れていると考えられる。以下に実験結果をまとめる。

3-1. 遠心濾過：回転数・濾布の改良により、酵素処理後の溶液から比較的大きな不溶解物質（筋、皮など）を除去する濾過の第一段階としては、非常に有効であることが明らかとなった。特に、大量生産ではこの過程は必要不可欠になると考えられる。

3-2. 活性炭濾過：活性炭をDNA溶液中に加えゆっくりと攪拌した後、濾過により活性炭を取り除く方法により、DNA溶液の色および臭いをほぼ除去することができた。

3-3. セライト濾過：適切な濾紙（保留粒子径3 μ m）とセライト（セルピュアS65,セルピュアS1000）の選択により、濾過速度は速くなり、かつ濾液の清澄度も向上する。濾過方法について、吸引濾過（差圧1 atm）の他に、加圧濾過機による濾過のテストも行った（安積濾紙製加圧濾過機使用）。加圧濾過でも吸引濾過と同様に清澄な濾液が得られ、濾過速度も10倍以上に改善された。これにより量産が可能になると考えられる。

3-4. 透析膜処理：透析膜を用いることにより、不純物が除去されDNAナトリウム塩の固形分中に占める割合を95%まで精製することができた。また、この透析膜システムでは精製と同時に濃縮効果もあるので、二重らせんDNAナトリウム塩水溶液の濃度を1.5%以上まで濃縮

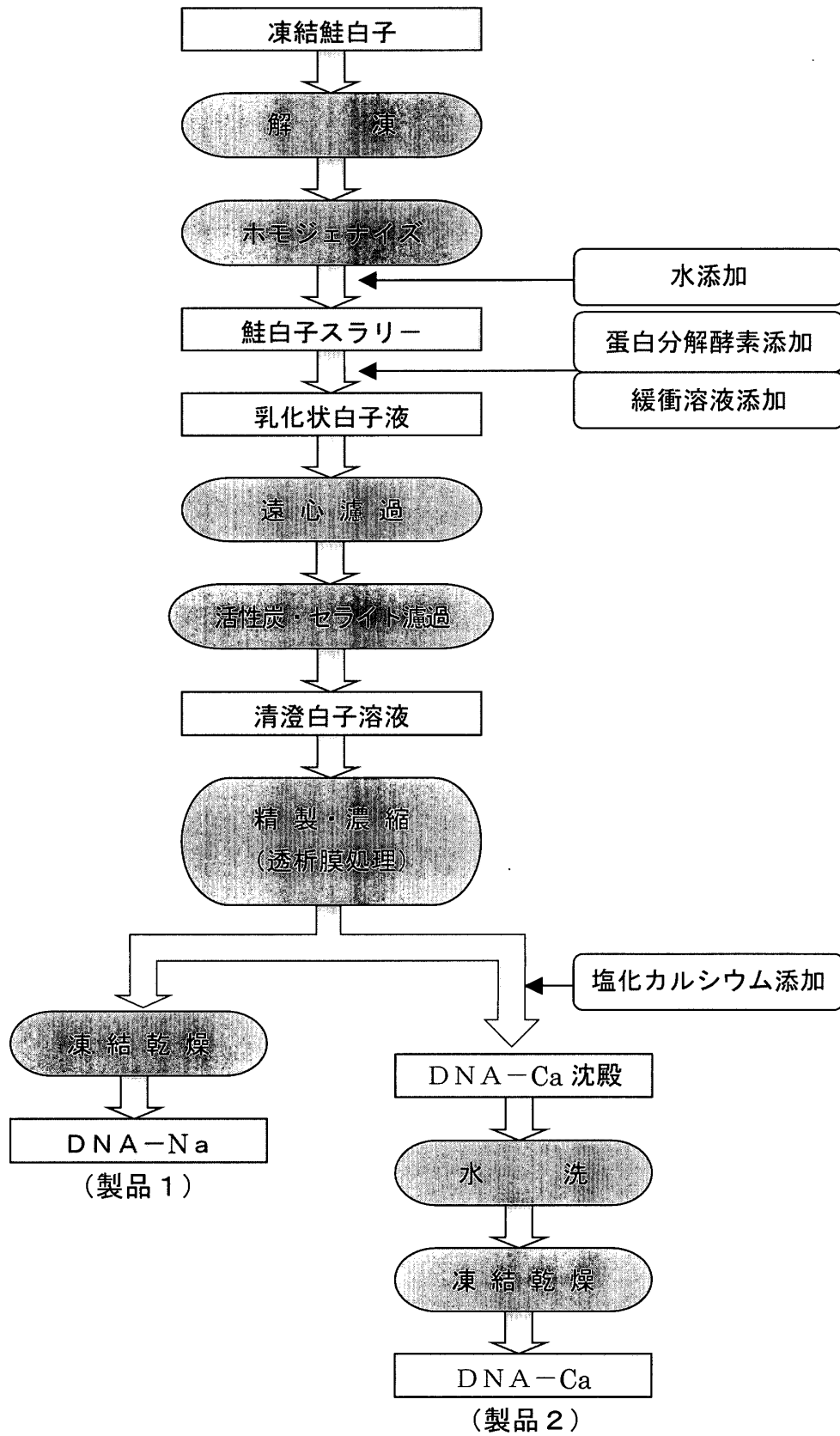


図3. 鮭白子由来二重らせんDNAの抽出・精製の新しい方法のスキーム

することができた。従って、この粘稠な水溶液をそのまま凍結乾燥することで二重らせんDNAナトリウム塩を得ることもできる。

3-4-1. 透析膜系によるDNA-蛋白系の処理時間依存性；以下の表とグラフに透析膜処理時間と溶液中の各成分との関係を示す。表2及び図4に見られるようにこの実験条件下ではDNA濃度は89.2%まで精製された。

表2. 溶液中成分の透析膜処理時間の依存性

測定項目	透析膜処理時間			
	処理前	1時間	2時間	5時間
見かけの溶液処理量*		12L	24L	60L
DNA量/固形分(%)	31.2	61.0	75.4	89.2
Na ⁺ 量/固形分(%)	3.0	1.6	1.1	0.79
K ⁺ 量/固形分(%)	1.6	0.78	0.57	0.30
その他(%)	64.2	36.6	22.9	9.7

*見かけの溶液処理量とは、流速を200ml/分として時間を掛けたものでおよそその処理量の目安となる。

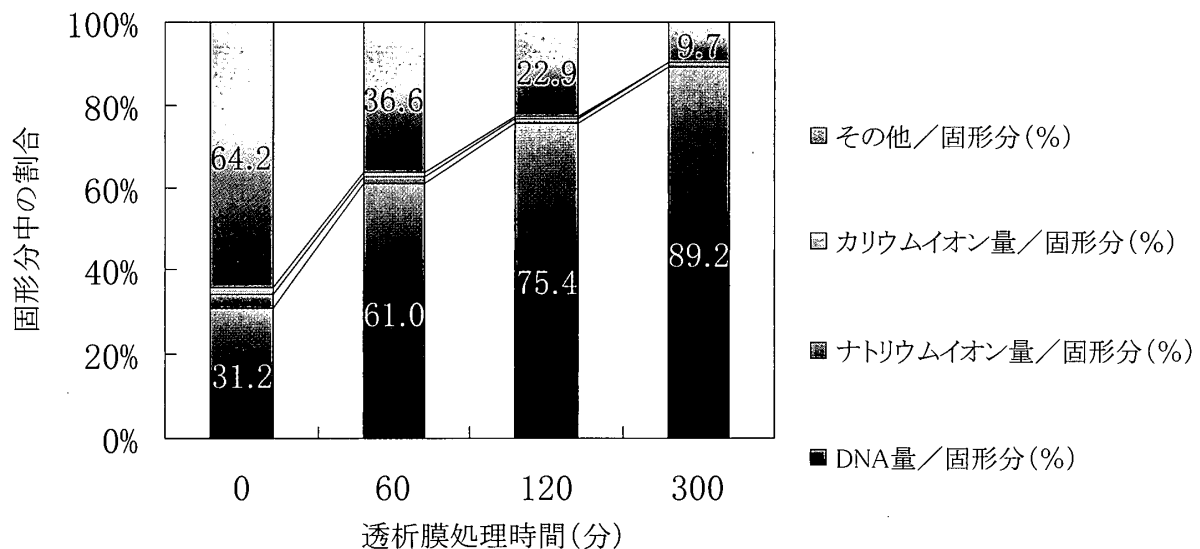


図4. 溶液中の各成分の透析膜処理時間依存性 (DNA水溶液はpH8.7)

3-4-2. 透析膜システムにおけるDNA精製のpH依存性；試料溶液を透析膜に通すとき、水酸化ナトリウムなどで溶液をアルカリ性にしておくと、蛋白とDNAとの結合が弱まり、分離・精製の速度が速くなるであろうと推定された。そこでDNA水溶液のpHと各成分の処理時間依存性を調べてみた。表3に示される結果より、いずれの液性においても処理時間の増加と

ともに固形分中に占めるDNAの割合は増加することがわかる。しかし、DNA水溶液のpHを変化させることによる顕著な相違は認められない。(強いて言えばpH9.5あたりに最適な状態が存在するようである)。透析膜にDNA水溶液を5時間通した後の固形分中に占めるDNAの割合は80~96%に分布している。しかし、DNA水溶液とポリスルホンあるいはポリアクリロニトリルとの親和性に与えるpH依存性についてはさらに詳細な実験データが今後必要になるだろう。

表3. 透析膜システムでの処理時間とpHのDNA精製に与える効果

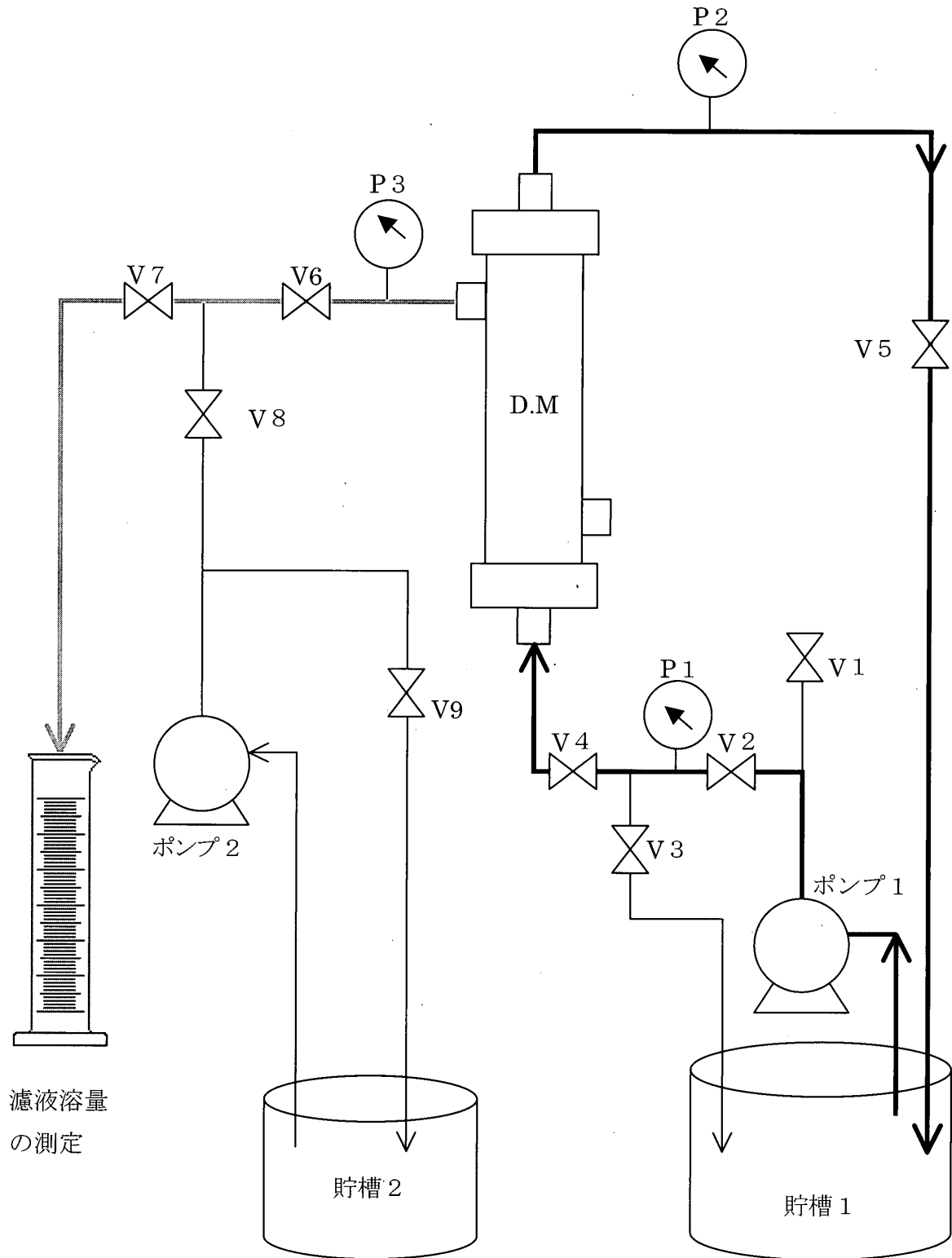
測定項目	DNA水溶液 のpH	透析膜処理時間		
		1時間	2時間	5時間
DNA量/固形分 処理前31.2%	pH8.7*	61.0%	75.4%	89.2%
	pH9.0	53.0%	76.1%	80.2%
	pH9.5	48.2%	78.9%	95.9%
	pH10.0	49.5%	76.5%	82.9%

※pH8.7は水酸化ナトリウムを加えていないDNA水溶液であり、3-4-1のデータを記載した。

参考のため、シグマ社のDNAナトリウム塩について260nmの吸収スペクトルを測定しDNA量を概算した。固形分中に占めるDNAの割合は97.5%であった。ナトリウムイオンの量は1.48%、カリウムイオンの量は0%であった。(固形分中の水分量は13.2%であった。水分量の割合が予想以上に多かったため、凍結乾燥し水分を除いた試料についてDNA量など成分を調べた。従って、水分を含む固形分に対する各成分は異なる値を示すことになる。)

3-4-3. 透析膜システムの二重らせんDNA大量生産への応用；以上の基礎実験の結果から透析膜を用いたシステムにより、二重らせんDNAの分離・精製・濃縮を行うことが原理的には可能であることが明らかとなった。従って、この方法をスケールアップして二重らせんDNAの量産を可能にする場合の基礎データを得る目的から、以下のようなシステムを作成した。システムのフロー図を図5に、実際に作成したDNA生産の実験システムの写真を図6に示す。透析膜はマイクロザUFラボモジュール(旭化成ACP-1050, 透析膜材質ポリアクリロニトリル, ハウジング材質ポリスルホン, 膜内径1.4mm, 有効膜面積0.1m², 分画分子量(公称)13,000, 長さ約35cmの透析膜)を使用した。

3-5. DNA沈殿の生成：高濃度の塩化カルシウム水溶液にDNA水溶液を加えるとDNAカルシウム塩の沈殿が生成する(沈殿は比重の関係で溶液の表面へ浮遊する)。沈殿発生条件



V ; 制御弁 P ; 圧力計 D. M ; 透析膜

図5. 透析膜を用いたDNA溶液の精製・濃縮システムのフロー図

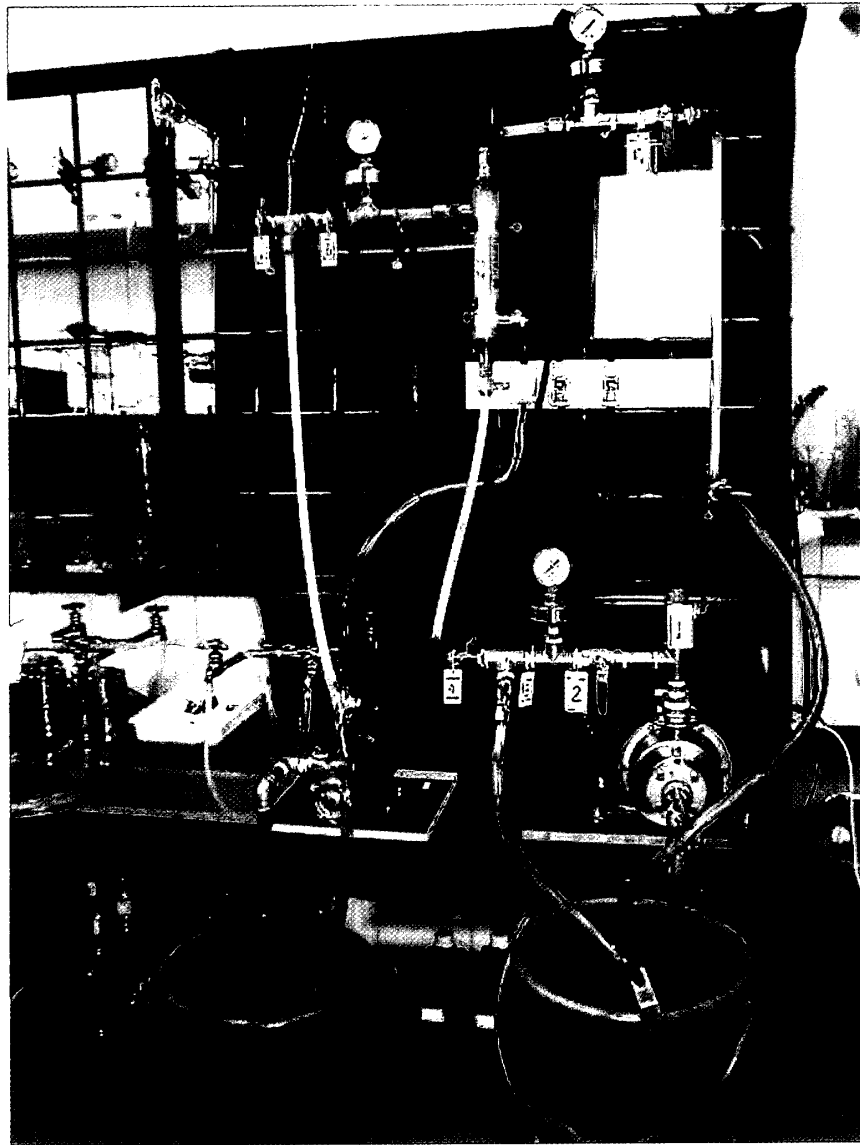


図6. 透析膜システムの全体図

は、DNA水溶液中のDNA濃度が0.5%以上でかつ塩化カルシウム水溶液中の塩化カルシウム濃度が20%以上のとき沈殿が生成した。沈殿は比重の関係で溶液の表面へ浮遊すること、ならびに、塩化カルシウム水溶液中にDNA水溶液を少量づつ分散することでカルシウム塩が効率良く生成するであろうことを考慮し、図7に示すような沈殿発生装置を作成した。

この方法は、有機溶媒を使わずにDNAを高分子状態のまま、水溶液からDNAを沈殿させることができるので画期的であるとともに製品の低廉化につながる。炭酸カルシウム、塩化バリウムでも同様のテストを試みたが、沈殿の発生は認められなかった。また、DNA水溶液(0.5%)を塩酸でpH5.3に調整し、飽和水酸化カルシウム水溶液(0.1%)へ加えたが沈殿の生成は認められなかった。水酸化カルシウムは水に難溶性であり、溶解度は25℃では約0.1%である。恐らく、カルシウムイオンの濃度が低すぎるのが沈殿の発生しない理由であろう。

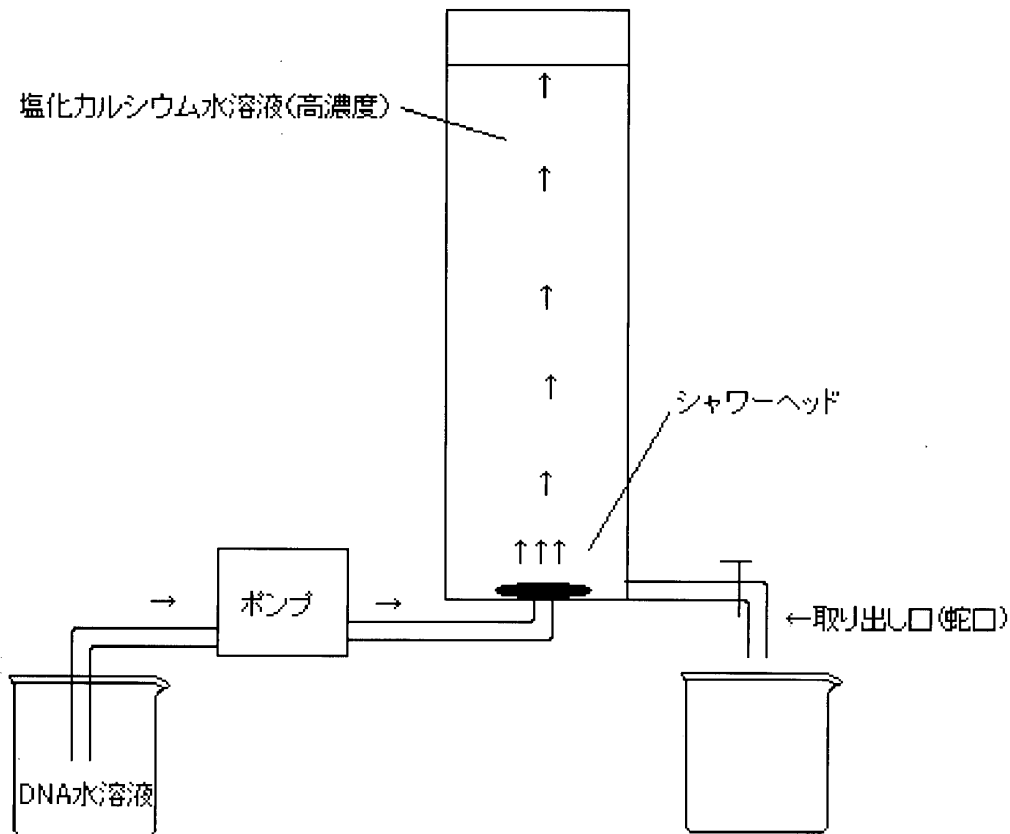


図7. DNAカルシウム塩の沈殿の発生装置

3-6. 二重らせんDNAの収率：原材料（白子）の組成について調べた結果を表4に示す。また、以上に述べた各過程における試料中の組成および収率を表5にまとめて示す。

表4. 鮭白子の組成

	原材料（白子）
水分	74.9% ^{**}
DNA	6.8%
固形分（蛋白質，夾雑物など）	18.3%
鮭白子スラリーのpH	pH6.8

白子を105℃恒量で水分量を測定すると74.9%であった。（白子300gの乾燥重は300g×25.1%=75.3g。）凍結乾燥では73.5%であるがこの差は誤差の範囲内と考えられる

3-7. 分析・評価：DNAナトリウム塩の固形分中占める割合は95%である。DNAカルシウム塩のそれは75%程度であった。分子量は、DNAカルシウム塩の平均分子量は20kbp, DNAナトリウム塩の平均分子量は10kbpである。二重らせんの割合は、DNAナトリウム塩66.8%である。

表5. 各過程での組成および収率

測定項目		プロセス				
		プロテアーゼ処理後遠心濾過液	活性炭濾過セライト濾過液	透析膜処理後溶液	DNA-Ca水洗い前	DNA-Ca水洗い後
溶液の容量		4500ml	6210ml	4610ml		
溶液のpH		pH8.7	pH8.9	pH8.5		
DNA量	A (g)	20.9	14.6	12.2	13.9	7.0
	B (%)	100	69.8	58.3	66.5	33.5
固形分	C (g)	76.5*	51.7	37.8	126.8	13.0
	D (%)	100	67.6	49.4	165.8	17.0
固形分量 (C) ／白子300g (%)		25.5	17.2	12.6	42.3	4.33
DNA量 (A) ／白子300g (%)		6.96	4.86	4.06	4.63	2.33
DNA量 (A) ／固形分 (C) (%)		27.3	28.6	32.3	11.0	53.9 (75.1) ***
Na ⁺ 量／固形分	(%)	1.26	1.59	1.25		
	(g)	0.96	0.81	0.47		
K ⁺ 量／固形分	(%)	0.58	0.71	0.61		
	(g)	0.44	0.36	0.23		
Ca ²⁺ 量／固形分	(10 ⁻³ %)	1.8	7.4	8.0		
	(10 ⁻³ g)	1.4	3.8	3.0		
その他		70.9%	69.1%	65.9%		

A：DNA水溶液の260nmの吸収スペクトルを測定することによりDNA量を概算した。

B：20.9gを100%としたときのDNAの変化量。C：溶液またはDNA-Ca塩の沈殿を凍結乾燥し固形分量を測定した。D：76.5gを100%としたときの固形分量の変化を示す。

※この重量を白子300g中の全固形分とする。

***塩化カルシウム中で発生させたDNAのカルシウム塩を透析チューブに入れ40時間透析を行ったものについてDNA量を測定すると75.1%であった。

3-8. DNAナトリウム塩およびDNAカルシウム塩製品製造に係るコスト：本研究において考案された製造プロセスを採用した場合、DNAナトリウム塩およびDNAカルシウム塩それぞれ1kgを製造するのに係る費用を概算した。なお、この計算には人件費および水・光熱費などは含まれていない。このプロセスでは、凍結乾燥の前段階迄の過程で二重らせんDNAナトリ

ウム塩水溶液の濃度をどの程度まで濃縮するかが費用を大きく左右する。ここでは、使用した透析膜の濃縮効果をできるだけ大きくした場合で考えた。

概算は、当初考えていたよりDNAナトリウム塩 (52,700円/Kg)、およびDNAカルシウム塩 (51,700円/Kg) の両製品とも製造費ではそれほど相違ない結果となった。DNAナトリウム塩のコスト低減化は、透析膜の能力が思いの外優れていたことによる。またDNAカルシウム塩の場合は、製造上で二段階の過程が精製・濃縮後に加わることになるので、実際には見かけとは異なり低廉な商品とは必ずしもならない。

4. 結論

本研究の目標は「二重らせんDNAの製造」であり、課題としては二重らせんDNAの製品中に占める割合を90%以上とし、かつ蛋白質の含有量は2%以下、食塩は1%以下にすること、これとあわせて濾過効率を上げることも掲げた。さらに、製品の原価を10万円/kg以下にするような新しい方法を開発することも設定した。

この課題に対して、透析膜を用いることで、高分子二重らせんDNAナトリウム塩と低分子量の蛋白質あるいはアミノ酸類など、濾過で除去されなかった物質を分画精製することにより、不純物を除去し、二重らせんDNAナトリウム塩の固形分中に占める割合を95%まで精製することができた。フリーなナトリウムイオンの量は1.1%であった。二重らせんDNAカルシウム塩の固形分中に占める割合は75%程度であったが、これは水洗することにより、より精製された製品が得られると考えられる。カルシウムイオンの量については正確には測定できていない。透析膜システムは精製と同時に濃縮の効果もあるので、水溶液中の二重らせんDNAナトリウム塩の濃度を3%近くまで濃縮することができた。従ってこの粘稠な水溶液をそのまま凍結乾燥することで二重らせんDNAナトリウム塩を得ることもできた。

濾過速度を上げるため、遠心濾過機を採用し、低速回転と濾布の選択で第一段階の濾過を行った。さらに、第二段階の濾過として適切な濾紙と濾過助剤を用い、濾過を行いながら徐々に助剤を足していくという濾過技術を採用することで、濾過速度は数倍以上速くなり、かつ濾液の清澄度も向上した。濾過方法については、加圧濾過機による濾過テストも行った。加圧濾過でも吸引濾過と同様に清澄な濾液が得られ、濾過速度も10倍以上に改善されたので、これにより量産が可能であることが確認された。

製造費については、二重らせんDNAナトリウム塩およびカルシウム塩ともに5万円強（人件費等を除く）と当初設定した課題は十分達成された。

以上のことから、この研究によって確立された方法によって鮭白子から高品質、低廉な二重らせんDNAを製造することができる。これにより二重らせんDNAをダイオキシン類や発癌性

物質等の除去に活用できることが明らかとなった。

5. 謝辞

本研究は中小企業庁・中小企業総合事業団の平成14年度および平成15年度「課題対応新技術研究開発事業」の計画もとに進められた。助成に対してここに謝意を表す。相川は2004年度北海学園学術研究助成（共同研究）の援助を受けて本研究の一部を進めることができた。ここに謝意を表す。

6. 参考文献および注

- (1) 本研究の多くの部分は特許申請中である。特許出願「魚類白子からの二本鎖DNAの抽出・精製方法」。出願番号；特願2004-64055。発明者；相川雅之，佐藤雅美，松永政司。出願年月日2004年3月8日
- (2) (a) M.Yamada, A.watanabe, S.Satoh, K.Kato, M.Nomizu, K.Ohkawa, H.Yamamoto and N.Nishi, "Salmon Sperm DNA as a Functional Polymer to Remove Endocrine Distruptors," *Proceeding of The Second International Workshop on Green Polymers*, 134-140, 2001.
(b) M.Yamada, S.Satoh, M.Nomizu, K.Ohkawa, H.Yamamoto and N.Nishi, "Characterization and Formation Mechanism of Water-Insoluble DNA Matrix Induced by UV Irradiation," *Nucleic Acids Research Supplement*, 1, 205-206, 2001.
(c) M.Yamada, K.Kato, M.Nomizu, K.Ohkawa, H.Yamamoto and N.Nishi, "UV-irradiated DNA Matrixes Selectively Bind Endocrine Disruptors with a Planar Structure," *Environ. Sci. & Technol.* 36. 949-954, 2002.
(d) X.D.Liu, Y.Maruyama, M.Yamada, M.Nomizu, M.Matsunaga and N.Nishi, "DNA aqueous solution used for dialytical removal and enrichment of dioxin derivatives," *International Journal of Biological Macromolecules*, 32, 121-127, 2003.
- (3) 従来からのDNAの分離精製に関する方法は以下の文献に記述されている。山岸秀夫他著“生化学講座2 核酸の化学I 4. DNAの分離精製”，日本生化学会編東京化学同人，東京，1987。また，使用目的は異なるものの次のような報告もある。梅原泰男，“DNAの単離技術—新機能材料としてのDNA大量分離精製技術の開発—”，*高分子*，52巻3月号，130-133,2003.
- (4) Pico Greenの正式化学名称は，2-[2-(4-hydroxyphenyl)-6-benzimidazole]-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazole trihydrochlorideである。この試薬は水溶液中では蛍光を発しないが2本鎖DNAが存在すると強い蛍光を発する。蛍光強度と2本鎖DNAの「量」とには比例関係が成り立つので二重らせんDNAの定量試薬として使われるようになってきた。R.Ragao, J.Mitchen and G.Wilding, *Anal. Biochem.*, 31, 191, 1990.
- (5) λDNAの鎖長（分子量）は正確に48,502bpの二本鎖（二重らせん）であり，またその塩基配列も完全に明らかにされている。起源は“Bacteriophage λI857 Sam 7”である。GenBankへの登録；Entry Name：LAMBDA, Accession No.：V00636, J01459, M17233, X00906. A.R.Goldberg and M.Howe, *Viology* 38, 200-202, 1969. F.Sanger, A. R. Coulson, G. F. Hong, D. F. Hill and G. B. Petersen, *J. Mol Biol.* 162, 729-773, 1982