

【材 料】 鋳型DNA溶液 (イネのゲノムDNA), プライマー溶液 (18S-RNA-443: 5'-TGAGAAACGGCTACCAC ATC-3', 18S-RNA-1071: 5'-ACGACGGTATCTGATCGTCT-3', 上図参照)

【試 薬】 酵素ミックス (Expand™ High Fidelity, 酵素, 35U/μl; 20mM Tris-HCl [pH7.5]; 100mM KCl, 1mM ジオスレイトール(DDT); 0.1mM EDTA; 0.5% Tween 20 [v/v], 0.5% Nonidet P40 [v/v], 50% グリセロール[v/v]), 10×PCR-DIG合成ミックス (2mM dATP, dCTP, dGTP; 1.3mM dTTP; 0.7mM DIG-11-dUTP, [pH7.0]), 10×PCRバッファー (15mM MgCl₂を含む), 10×dUTPストック (2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, [pH7.0]), 滅菌蒸留水, ミネラルオイル

【器 具】 マイクロピペット (P20とP200), イエローチップ, 0.5mlマイクロチューブ, チューブ立て, 卓上小型遠心機, PCR装置

【PCR反応液の調製】 以下の通り, 0.5mlマイクロチューブに各溶液を混合する.

滅菌蒸留水	36.25	μl
10×PCR バッファー	5	μl
10×PCR-DIG 合成ミックス*	5	μl
プライマー:18S-RNA-443 (20μM)	1	μl
プライマー:18S-RNA-1071 (20μM)	1	μl
鋳型 DNA (10 ng/μl)	1	μl
酵素ミックス	0.75	μl
計	50	μl

*: 対照として, “10×PCR-DIG 合成ミックス”を“10×dUTP ストック” に置き換えて非標識の PCR 反応液も作る.

PCR反応液にミネラルオイル2, 3滴加え, 卓上小型遠心機で軽くスピンドアウンする. 反応液がミネラルオイルで完全にシールされていることを確認する.

【PCR】 PCR装置にセットし, 以下の条件でPCRを行う.

94°C	30 秒	} 2 サイクル
58°C	30 秒	
72°C	30 秒	
94°C	30 秒	} 30 サイクル
60°C	30 秒	
72°C	30 秒	

2.3 プローブ領域DNA断片の増幅

【概 略】 通常のPCR反応系を構築する際, 反応液のバッファー類の組成は, ポリメラーゼを供給するメーカーが適条件を提示している場合が多く, 実験者は, プライマーの設計・発注とそれに応じたアニーリング温度の設定を行うだけでことが足りる場合が多い.

各プライマーは、その長さや配列によって二本鎖を維持できる温度が異なる。この温度、‘DNAの二本鎖が熱変性して一本鎖になる温度’は、 T_m 値 (melting temperature) と呼ばれ、これを推定する種々の計算式が提唱されている。例えば、Molecular Cloning 3rd ed. では、以下の2式が紹介されている。

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6(\log_{10}[\text{K}^+]) + 0.41(\% \text{G+C}) - (675/[\text{塩基数}])$$

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (\text{AとTの塩基数}) + 4 (\text{GとCの塩基数}), (\text{20塩基程度より短い場合})$$

PCRによって目的とするDNA断片を特異的に増幅するためには、用いるプライマーの T_m 値に応じて、PCRサイクル中のアニーリング温度を設定することが重要となる。ここでは、2.2と同じ鋳型DNAおよびプライマーを用いて、種々のアニーリング温度 (47~67°C) でPCRを行い、それらの間の違いを確認する。

【材料】 2.2と同じ。

【試薬】 Taqポリメラーゼ溶液 (5U/ μl ; 20mM Tris-HCl, pH8.0; 100mM KCl, 1mM DTT; 0.1mM EDTA; 0.5% Tween 20 [v/v], 0.5% Nonidet P-40 [v/v], 50% グリセロール[v/v]), 10×PCRバッファー (100mM Tris-HCl, pH8.3; 500mM KCl), MgCl_2 溶液 (25mM), DMSO, dNTP溶液 (各2mM), 滅菌蒸留水

【器具】 マイクロピペット (P20とP200), イエローチップ, 0.5mlマイクロチューブ, 0.2ml-8連マイクロチューブ, チューブ立て, PCR装置

【PCR反応液の調製】 以下の通り, 0.5mlマイクロチューブに各溶液を混合する。

滅菌蒸留水	46.08	μl
10×PCR バッファー	9	μl
MgCl_2 (25mM)	9	μl
dNTPs (各 2mM)	5.4	μl
DMSO	4.5	μl
プライマー:18S-RNA-443 (20 μM)	2.25	μl
プライマー:18S-RNA-1071 (20 μM)	2.25	μl
鋳型 DNA (10 ng/ μl)	10.8	μl
Taq ポリメラーゼ	0.72	μl
計	90	μl

混合されたPCR反応液を0.2ml-8連マイクロチューブに10 μl ずつ分注する。

【PCR】 PCR装置にセットし、以下の条件でPCRを行う。

94°C	2分	1 サイクル
94°C	1分	} 30 サイクル
47~67°C (8段階を設定) *	2分	
72°C	2.5分	
72°C	7分	1 サイクル

*: 47.1°C, 48.8°C, 51.5°C, 55.0°C, 59.0°C, 63.9°C, 65.1°C,

67.0°C の 8 段階を設定する.

2.4 増幅DNAの電気泳動による確認

【概 略】 2.2で得られたPCR後のPCR反応液各10 μ lを1%アガロースゲルにて電気泳動し、DIGでラベルしたDNA断片が非標識のDNA断片に比べて電気泳動の移動速度が小さくなっていること等を確認する。また、2.3で得られたPCR後のPCR反応液を同様に電気泳動して、アニーリング温度による増幅DNA断片の違いをみる。なお、電気泳動の具体的な手順は本書の第3部第1章第4節‘電気泳動’を参照のこと。