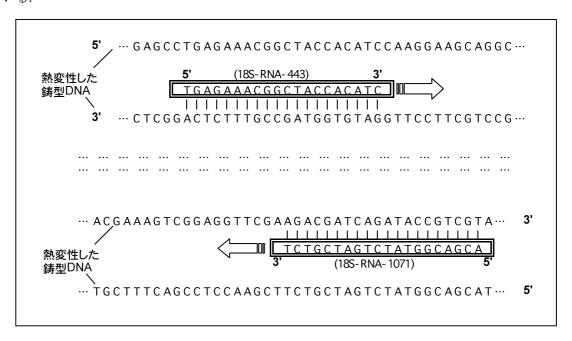
第2節 PCR法によるDNA解析

2.1 PCR 法の実習

【実習の概要】 一般的なPCR法は、微量のDNA (鋳型DNA, template DNA) からそこに含まれる目的 DNA断片を polymerase chain reaction (PCR)によって*in vitro*で増幅する手法であって、核酸溶液と耐熱性ポリメラーゼを含む試薬類を混合した溶液 (PCR反応液)を用意し、これを「熱変性 (denaturation)」-「アニーリング (primer annealing)」-「DNA鎖の伸長 (extension)」の3ステップで構成される温度変化のサイクルが~30回繰り返される中でインキュベートすることで行う. 温度変化の操作は機械任せで行うので、実際の操作は、PCR反応液の調製のみとなる. この操作の簡便さ、さらに、得られる増幅DNA断片の特異性の高さから、PCR法は、農学・生物学研究の数多くの場面で用いられる応用範囲の広い手法となっている. 本実習では、以後の実習で行う「ゲノムDNAのサザンブロット分析」(第3節)に用いる"DIG標識プローブ"をPCR法によって作製する (2.2). また、通常のPCR (非標識)によるプローブ領域DNA断片の増幅を行い (2.3)、増幅DNAの電気泳動による確認を実習する (2.4).

2.2 サザンブロット解析用DIG標識DNA断片の作製

【概 略】 イネ(Oryza sativa L.)の18SRNA遺伝子の一部領域をPCR増幅する. PCR溶液中では、温度変化の各サイクル中に、鋳型DNA (二本鎖DNA) の熱変性に引き続き、熱変性した一本鎖鋳型DNAとそれに相補的な配列のオリゴヌクレオチド(プライマー)の二本鎖が形成される(アニーリング)(下図). その後、DNAポリメラーゼの作用で、鋳型DNAと相補鎖を形成したプライマーの3'末端から鋳型DNAとの相補鎖が形成される. したがって、反応溶液の調整は、DNA合成の材料となるdNTPs、耐熱性DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマー2種および反応環境を整える試薬類を混合すればよい. ここでは、dNTPsに加えてDIG-11-dUTPを反応液に混合し、DIG (Digoxigenin) で標識された増幅DNA断片を得る.「ゲノムDNAのサザンブロット分析」(第3節)では、これを"プローブ"として用いる.



- 【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^M High Fidelity, 酵素, $35U/\mu$ 1; 20mM Tris-HC1[pH7. 5]; 100mM KC1, 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]), $10\times PCR$ -DIG合成ミックス (2mM dATP, dCTP, dGTP; 1.3mM dTTP; 0.7mM DIG-11-dUTP, [pH7. 0]), $10\times PCR$ バッファー (15mM MgCl $_2$ を含む), $10\times dUTP$ 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, 卓上小型遠心幾, 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、卓上小型遠心幾で軽くスピンダウンする. 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 了
58°C	30 秒 🔓 2 サイクル
72°C	30 秒
94°C	30 秒 了
60°C	30 秒 🔓 30 サイクル
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,その長さと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,Tm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.

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

Tm (°C) = 2 (AとTの塩基数) + 4 (GとCの塩基数), (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Tm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($47\sim67^\circ$ 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/μ1; 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), MgCl₂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 (20μM)	2.25	μl
プライマー:18S-RNA-1071 (20μM)	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 $10\mu 1$ 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 了	
47~67℃(8 段階を設定)*	2分 }	30 サイクル
72°C	2.5 分 丿	
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℃ 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 $10\,\mu\,1$ 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.