

2. PCR 法による DNA の増幅

現代の分子生物学において、その進歩に最も貢献した実験法の1つが PCR (Polymerase chain reaction) 法である。PCR 法は極めて微量の DNA サンプルから特定の DNA 断片を短時間に大量に増幅することができる方法であり、多大な時間と労力を要した遺伝子クローニングを過去のものとしてしまった。また、その操作の簡便さから、現在では基礎研究のみならず臨床遺伝子診断から食品衛生検査、犯罪捜査に至るまで社会の中でも幅広い分野に应用されている。

本実験は、プラスミド DNA をテンプレートに用いて実際に PCR 法による DNA の増幅を行い、PCR 法の基礎原理と応用について学ぶことを目的とする。

【PCR 法の原理】

対象とする DNA (テンプレート DNA)、2種のプライマー、耐熱性のポリメラーゼをヌクレオチドを含む緩衝液に溶かす。その溶液を3段階に温度を変化させながら反応させるというのが PCR 法である。温度変化は専用の装置 (サーマルサイクラー) で行うので、操作自体は簡単である。図1のように、95°Cでは DNA が熱変性して一本鎖になり、55°Cではプライマーが相補領域に結合し (アニーリング)、72°Cでは複製反応が起こる。これが1サイクルに当たり、DNA が2倍に増幅される。このサイクルを22回行くと、計算上は100万倍になる。実際には30サイクル程度行すが、100万倍から1000万倍にまで増幅される。

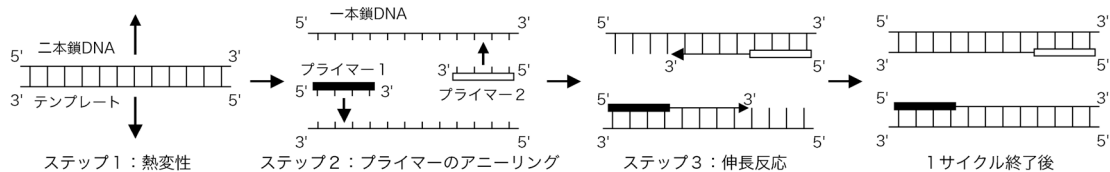


図1 PCR反応の1サイクル

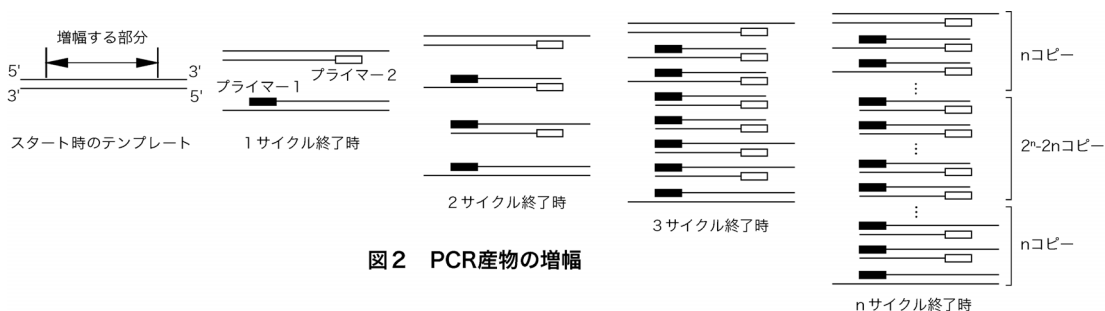


図2 PCR産物の増幅

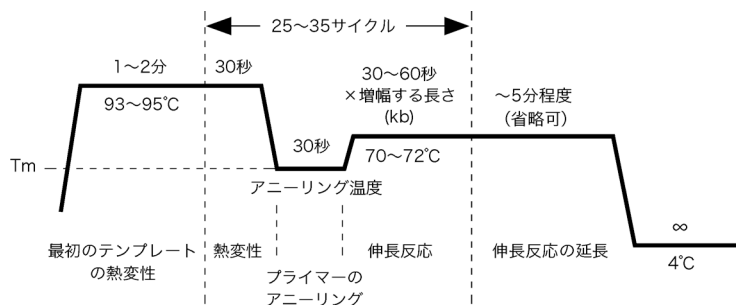


図3 一般的なサイクル

【PCR 実験の概略】

反応液の調製

テンプレート DNA、プライマー、Taq ポリメラーゼ、ヌクレオチド (dNTP) を緩衝液に混合する。

→ PCR 反応

サーマルサイクラーの設定 (各ステップの温度と時間、サイクル数) を行い、PCR 反応を開始する。

→ アガロースゲル電気泳動

PCR 反応後のサンプルをアガロースゲルで電気泳動し、増幅された DNA 断片を確認する。

【基本&重要事項】

- ① 反応液は、以下の溶液を混合することで調製する。(" "内はチューブのラベル名)

一本あたりの量

Milli-Q 水 ("Milli-Q")	12 μ l	
反応バッファ (5 倍濃度) ("5xBuf")	4 μ l	
dNTP (10 倍濃度) ("dNTP") *注1	2 μ l	
プライマー 1 (20 μ M) *注2	0.5 μ l	
プライマー 2 (20 μ M) *注2	0.5 μ l	
Taq ポリメラーゼ ("Taq")	0.1 μ l	
テンプレート DNA (1 ng/ μ l) *注2	1 μ l	(トータル 20 μ l)

*注1 : dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 各 2 mM の混合液。ポリメラーゼの基質 (DNA の材料) になる。

*注2 : 用いるプライマーやテンプレート DNA は実験によって異なるので、よく確認すること。

*注3 : 複数の反応液が必要な場合には、共通する溶液を必要本数分予め混合したもの (プレミックス) をつくり、それを分注して用いる。分注前にピペッティング (ピペットで吸ったり出したりすること) により十分に混合すること。

- ② サンプルの混同を防ぐため、適宜マジックで PCR チューブにラベルを書くこと。
- ③ 溶液のコンタミ (特に原液へのコンタミ) が起こらないよう、常に細心の注意を払うこと。ピペットチップは、使うたびに新しいものに交換するのが原則。ただし同じ溶液を分注する時などは同じチップで構わない。
- ④ PCR 反応は、アニーリング温度 : 55°C、伸長反応時間 : 30 秒 (実験 1) または 2 分 (実験 2) の設定で行う。2 つの班が同時に同じ装置で行う。
- ⑤ 電気泳動は 2 つの班で別々に行う。反応後の溶液を 10 μ l ずつと DNA マーカー 2 μ l を 1%アガロースゲルにアプライし、100V で 30 分間泳動する。泳動後、729 号室のトランスイルミネータで写真撮影をする。
- ⑥ 電気泳動のゲルやバッファには発ガン性のある物質 (臭化エチジウム) が含まれている。かならず手袋を着用して扱うこと。
- ⑦ 《レポート課題》に挙げてある事項は、レポートに書くべき最低限のポイントである。それ以外の事項 (例えば《関連事項》の項目) についても積極的に調べること。

【実験1】 PCR 反応サイクル数と DNA 生成量の関係

内容：適当なプラスミド DNA をテンプレートにし、PCR を 5, 10, 15, 20, 25 サイクル行う。それぞれの反応液をアガロースゲルで電気泳動して DNA 断片の生成量を測り、PCR 反応で DNA が増幅する過程について考察する。

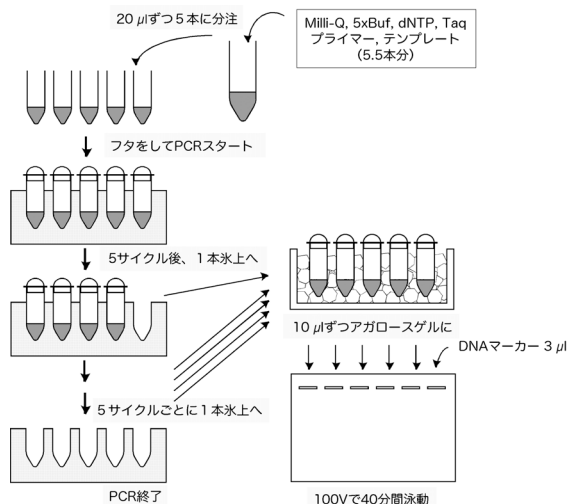
方針：5本の同じ反応液で PCR を始め、5 サイクルごとに1本ずつ取り出し反応を停止する。

手順：

- 1) 上記【基本&重要事項】の通り、5.5 本分の反応液を 0.5-ml サンプルチューブ中で混合する。
プライマーセット： "M13_F" と "M13_R"
テンプレート DNA： "Venus"
- 2) ピペティングにてよく混合した後、5本の PCR チューブに 20 μl ずつ分注する。
- 3) サーマルサイクラーにセットし、「exp1-1」の設定を使って反応をスタートする。
- 4) 終了後、1本とりだし氷上に保存する。
- 5) 続けて「exp1-2」の設定を使って再スタートする。
- 6) 終了後、1本とりだし氷上に保存する。
- 7) 以後、最後の1本まで5)と6)を繰り返す。
- 8) 反応液を電気泳動する。DNA マーカーには"100bp"を用いる。
- 9) 画像解析ソフトを用いて、泳動したゲルのデジタル写真から PCR 産物の量を比較する。

実験1プレミックス調製用チェックシート

	$\mu\text{l}/\text{本}$	5.5 本分	
Milli-Q	12	_____ μl	<input type="checkbox"/>
5xBuf	4	_____ μl	<input type="checkbox"/>
dNTP	2	_____ μl	<input type="checkbox"/>
M13_F	0.5	_____ μl	<input type="checkbox"/>
M13_R	0.5	_____ μl	<input type="checkbox"/>
Taq	0.1	_____ μl	<input type="checkbox"/>
Venus	1	_____ μl	<input type="checkbox"/>



《レポート課題》

- ① 実験結果をグラフにする。(PCR 産物量 vs 反応サイクル数)
- ② PCR 反応の原理をふまえ、①のグラフの形状について説明する。
- ③ テンプレート DNA の濃度が変わったら、①のグラフはどう変わると予想されるか。
- ④ PCR による増幅過程は以下の式で表される。

$$N_1 = N_0(1+Y)^n \quad N_0: \text{ある時点での産物量}, N_1: n \text{ サイクル後の産物量}, Y: \text{増幅効率}$$

この式に基づき、①のグラフから Y を求めよ。増幅効率 Y は最大 1 で、その場合 1 サイクルでちょうど 2 倍になるが、実際の反応では Y は 1 未満であることが分かるであろう。

《関連事項》

反応サイクルと産物量の関係をより細かく正確に測定するための方法。またそのような測定法の応用。

【実験2】 PCR による遺伝子構造の判別

内容：異なる遺伝子構造をもつ DNA サンプルをテンプレートに用いる。ただしどのサンプルがどれかは分からない。適当なプライマーを用いて PCR を行い、生成物の有無や長さから、それぞれのテンプレートに用いた DNA サンプルの遺伝子構造を判別する。

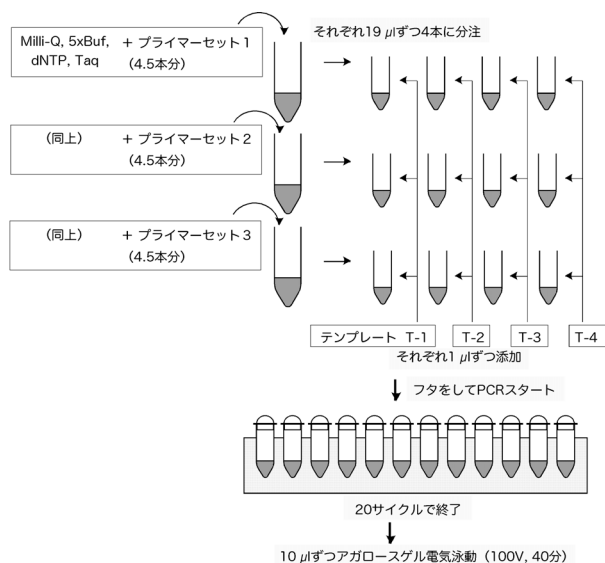
方針：4種類のテンプレート DNA に対して3通りのプライマーセットを使って PCR を行う。

手順：

- 上記【基本事項】のとおり、以下の3通りのプライマーの組み合わせでそれぞれ4.5本分の反応液（ただしテンプレート DNA を除く）を0.5-ml サンプルチューブの中で混合する。
 - プライマーセット1：“M13_F” と “M13_R”
 - プライマーセット2：“M13_F” と “Zeta_R”
 - プライマーセット3：“M13_F” と “Zeta_F”
- ピペティングにてよく混合した後、それぞれ4本のPCRチューブに19 μ l ずつ分注する。
- それぞれに4種類のテンプレート DNA (“T-1”, “T-2”, “T-3”, “T-4”) を1 μ l ずつ加え、チップでよく攪拌する。
- サーマルサイクラーにセットし、「exp2」の設定を使って反応をスタートする。
- 反応終了後、反応液を電気泳動し、PCR 産物を確認する。DNA マーカーには“1kb”を用いる。

実験2プレミックス調製用チェックシート

	μ l/本	4.5 本分			
Milli-Q	12	_____ μ l	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5xBuf	4	_____ μ l	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
dNTP	2	_____ μ l	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
M13_F	0.5	_____ μ l	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
M13_R	0.5	_____ μ l	<input type="checkbox"/>		
or Zeta_R				<input type="checkbox"/>	
or Zeta_F					<input type="checkbox"/>
Taq	0.1	_____ μ l	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



《レポート課題》

- 各テンプレートの遺伝子構造を判別する。またその根拠を説明する。
- プライマーのオリゴヌクレオチドは、通常 18-25 塩基程度の長さのものを用いる。短すぎるとどのような問題が生じるか考える。
- プライマーを設計する際に考慮すべきパラメータとしては、2本鎖 DNA が変性して1本鎖になる温度 (T_m ; melting temperature) が挙げられる。PCR 反応でのアニーリング温度は、プライマーの T_m より 3-5°C 低くするのが基本である。アニーリング温度が低すぎる場合、高すぎる場合にはそれぞれどんな問題が生じるかを考える。

《関連事項》

PCR を利用した遺伝子工学（遺伝子のクローニング、遺伝子配列の操作など）。

臨床医学やその他の分野での PCR 法の応用。

【実験のタイムテーブル】

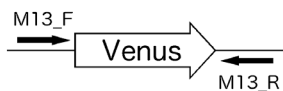
	実験1	実験2
10:50	反応液の調製	
11:15	PCR 開始	
12:10		反応液の調製
12:55	PCR 終了	
13:00		PCR 開始
~~~~~ 昼休み ~~~~~		
13:40	電気泳動開始	
14:10	写真撮影～解析	
14:40		PCR 終了
14:45		電気泳動開始
~~~~~ 片づけ・清掃 ~~~~~		
15:15		写真撮影～解析

【PCR 反応の温度設定】

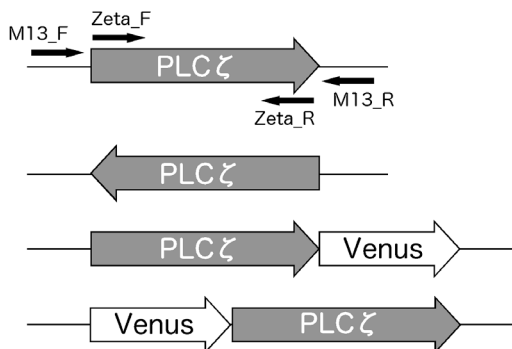
exp1-1	exp1-2	exp2
95 °C 2 min	95 °C 0.5 min	95 °C 2 min
5 cycles 95 °C 0.5 min	5 cycles 95 °C 0.5 min	20 cycles 95 °C 0.5 min
55 °C 0.5 min	55 °C 0.5 min	55 °C 0.5 min
72 °C 0.5 min	72 °C 0.5 min	72 °C 2 min
72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min
10 °C ∞	10 °C ∞	10 °C ∞

【実験に用いるテンプレートとプライマー】

<実験1>



<実験2>



【DNA サイズマーカー】

