

PCR の話し (1)

市販の PCR 用試薬の増幅効率が格段に上がっているとはいえ、PCR で目的のバンドが現れないことは時々経験します。テンプレートがゲノム DNA だったり、増幅領域が長かったり、GC リッチの配列が含まれる場合は条件設定が特に難しくなります。最近、ゲノミック PCR を行う機会が多くなり、失敗と成功の体験から幾つかの教訓を得ました。

テンプレートの条件：ゲノム DNA 抽出には様々なプロトコールがありますが、特にこだわる必要はありません。フェノール-クロロホルム抽出を一回とエタノール沈澱で精製するか、または市販のゲノム DNA 抽出カラムで精製しておけば十分です。PCR 用のテンプレートの場合、サザンプロット用のゲノム DNA のように数十 kb の長さを保つ必要がなく、むしろボルクスで適度に断片化させた方が増幅しやすい感があります。RNA の大量混入は PCR 反応を阻害する要因になりえますが、DNA 抽出の最初のステップで組織を溶解するバッファーに RNase A を添加していれば、問題になることはありませんでした。最も重要な点は PCR 反応にテンプレートを入れすぎないことです。20 μ l の反応系なら 5 から 10ng で十分です。増幅実績のある反応系でも、30ng 以上のゲノム DNA を入れると何も増幅されなくなることをしばしば経験しています。バンドがまったく現れない時は、抽出の失敗で DNA が全く入っていないか（抽出した DNA が貴重で電気泳動に使う余裕がない場合）、反応に使った DNA が多すぎると考えた方がいいでしょう。むやみにテンプレートを増やさないことが肝要です。

GC リッチ領域の増幅：増幅させる目的の配列の中に GC リッチ領域があると、相補鎖が結合しやすくポリメラーゼが走りにくくなるので、伸張反応の過程でいかに DNA を解離状態に保つかがポイントとなります。

そのため、反応温度を高くし、高い反応温度でも利用できる T_m 値の高いプライマーを設計することが基本です。GC リッチ領域に限らず、ゲノム PCR 用のプライマーの T_m 値は 65 以上に設計することが好ましいです。 T_m 値が 65 のプライマーセットを用いる場合、最初に 60 でのアニーリングを試みます。もし、目的のバンドとともにエクストラバンドが現れたり、バンドが薄いときは、解決策としてアニーリング温度を上げることが試して下さい。これで改善されることがよくあります。アニーリングステップを省略した 2 ステップ PCR プログラムも選択肢として考慮できます。一方、GC リッチ領域の T_m 値を下げるため、反応液に 5 から 10% の DMSO を加える手法も効果がありました。このほかに、denature（変性）ステップの温度を通常より 2 から 3 高く設定することで問題が解決されたことも経験しています。この場合、酵素の失活を防ぐため denature ステップの時間を短くした方が無難です。サーマルサイクラーの機種にも依りますが、我々は 20 μ l の反応系の場合 10 秒くらいに設定しています。

長いゲノム領域の増幅：長い DNA 領域をターゲットとした時、要求される PCR 酵素の増幅効率や熱安定性が格段に高くなります。明確な閾値はありませんが、増幅領域が 10kb 以上の場合は Long PCR 対応と謳っている PCR 試薬を選ぶことをお勧めします。ただし、通常の DNA ポリメラーゼ製品の中でも 6 から 10kb の比較的長いターゲットの増幅に適用できるようにされたものがあります。最新版の PCR 酵素カタログをよく読んで選んでください。さらに、「裏技」の範疇に入りますが、PCR 用酵素とそれと異なるブランドのバッファーを併用することで 8kb 以上のフラグメントの増幅に成功したこともあります。Long PCR を行う時に限らず、反応系や PCR プログラムをいろいろ変えても複数のバ

ンドまたはスミアな産物しか得られないこともよくあります。この場合、一回目の反応液を 1/50 から 1/100 に希釈し、nested-PCR を行うことで、予想よりもうまくいくことが多々あります。異なるプライマーセットで nested-PCR を行うのではなく、first-PCR と同一のプライマーセットをそのまま用いても、目的フラグメントのみが増幅されて明瞭な単一バンドが見えてきたことを何度も経験しています。(J.P.)

(Mail News 2007.03.27 掲載記事)

=====

発行

理化学研究所・バイオリソースセンター

遺伝子材料開発室

dnabank@brc.riken.jp

<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/>

=====