

=====

PCR の話し (2)

PCR で標的の増幅が見られないときに、鋳型 DNA 溶液を希釈して使用することで増幅が得られることがあります。以前、ラボマニュアル「PCR の話し (1)」 (www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/manual.html) で触れたことがあります。鋳型 DNA の溶液中に入り込んでいる何らかの物質が、PCR 反応を阻害していることが考えられ、溶液の希釈によりその阻害物質の濃度が下がることで阻害が解除されると考えられます。

ところで、その阻害物質は何でしょうか？今回、「BRC-JCM 保有微生物株由来ゲノム DNA 」 (<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/en/JCMDNA2en.html>) の調製過程でその「これがその正体か?!」という事例に遭遇しましたので、報告します。

遺伝子材料開発室では、微生物材料開発室と共同で 30 種あまりの微生物 DNA を調製し、提供してきました。利用者から新たな菌の追加依頼があり、*Mitsuokella multacida* (RDB 6653, JCM 2054T)、*Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* (RDB 6655, JCM 6582T) と *Prevotella albensis* (RDB 6677, JCM 12258T) について、これまでと同じようにアルカリ法で DNA の抽出を行いました。(下記参照)

いつものように提供用に調製したサンプルを 10 倍希釈し、それを鋳型 DNA として 1 ul を用いた 20 ul の反応系で 16S rRNA gene を標的とする真正細菌検査用プライマーを用い、PCR を行いましたが、全くバンドが観察されません。これまで調製してきた 30 あまりの株では、このように濃い鋳型 DNA で PCR による目的バンドの増幅阻害がかかる菌はありませんでした。疑問に思い、*Mitsuokella multacida* の DNA 抽出過程を思い出してみると、エタノール沈殿操作によって、DNA のほかに結晶様の白い沈殿が観察されていたことに思い当たりました。

この白い結晶様の沈殿は、エタノール沈殿の過程で析出し、水に良く溶け、DNA と挙動を共にしていません。多糖類ではないかと思い、多糖類の除去に有効であるとされる CTAB [Cety1 Trimethyl Ammonium Bromide (hexadecyltrimethyl ammonium bromide)] による DNA 抽出を試みました。(下記参照)

その後、通常のアルカリ法で調製した DNA とそれをさらに CTAB 抽出し、多糖類を除く操作をした DNA を同じ濃度 (300 ng/ul) に調製し、PCR の鋳型として PCR を行いました。今度は、もとの DNA を 10 倍に希釈するだけでなく、10 の 0.5 乗倍ずつ段階希釈し、鋳型 DNA として PCR を行いました。PCR 産物を電気泳動により確認したところ、期待に反して両者とも同じ結果となりました。即ち、もとの DNA を 10 倍に希釈した 30 ng/ul の鋳型 DNA を 1 ul 用いた場合は、増幅される DNA 断片は観察されず、10 の 1.5 乗倍希釈では薄っすらとしたバンドが、10 の 2 乗倍以上の希釈で良好なバンドを観察できました。

結局、CTAB 抽出により DNA 溶液から結晶様の白い沈殿を除くことはできたのですが、それにより PCR による増幅が改善されたわけではありませんでした。CTAB 抽出により除去できたものが PCR を阻害しているわけではないことは分かりましたが、何が阻害物質なのかは未だ分かりません。改善のヒントとなる情報をお待ちいたしております。(T.M.)

(Mail News 08.10.10 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/>

=====

アルカリ法による DNA 抽出

1. 50 ml コニカルチューブで菌体を 8 ml の 0.15 M NaCl + 0.1 M EDTA (pH8.0) に懸濁する
2. 1 ml の 10 mg/ml lysozyme (in PBS) を加える
3. 37 水槽で 5 分間加温する
4. 1 ml の 0.5 M Tris-HCl (pH7.5) + 5% (w/v) SDS を加える
5. 25 ul の 10 mg/ml proteinase K を加える
6. 60 水槽で 10 分間加温する
7. 等量のフェノールによる抽出を 2 回繰り返す
8. 等量のフェノール/クロロホルムによる抽出を 2 回繰り返す
9. 等量のクロロホルムによる抽出を 1 回行う
10. 水相を新しいチューブに移し、2 倍量のエタノールを加え、静かに混和する
11. 現れた DNA (白い糸くずの塊状のもの) をプラスチック製エーゼに巻き取り、新しいチューブに移す
12. エーゼから DNA が離れない場合は、無理にとらずにエーゼの先端をハサミで切る
13. 10 ml の 75% エタノールを加え、沈殿をすすぐ
14. 遠心をかけずにエタノールを十分除く
15. DNA が乾かないうちに 1 ml の TE + 10 ug/ml RNaseA を加える
16. 37 で 30 分間加温する
17. 5 ul の 10 mg/ml proteinase K を加える
18. 37 で 1 時間加温する
19. さらに 1 ml の TE バッファーを加える
20. 等量のフェノールによる抽出を 1 回行う
21. 等量のフェノール/クロロホルムによる抽出を 1 回行う
22. 等量のクロロホルムによる抽出を 1 回行う
23. 水相を新しいチューブに移し、2 倍量のエタノールを加え、静かに混和する
24. 3,000rpm で 5 分間遠心分離を行う
25. 1 ml の 75% エタノールを加え、沈殿をすすぐ
26. 3,000rpm で 5 分間遠心分離を行う
27. エタノールを十分除く
28. DNA が乾かないうちに 1 ml の TE バッファーを加え、十分溶解させる
29. DNA 濃度を測定し、濃い場合にはさらに TE バッファーを加える

CTAB による DNA 抽出

1. TE バッファーに溶解した DNA 溶液 600 ul を新しいチューブに分ける
2. 100 ul の 5 M NaCl を加える

3. 80 μ l の CTAB/NaCl [10% (w/v) CTAB/0.7 M NaCl] 溶液を加える
4. 65 $^{\circ}$ C 水槽で 10 分間加温する
5. 等量のクロロホルムによる抽出を 1 回行う
6. 等量のフェノール/クロロホルムによる抽出を 1 回行う
7. 等量のクロロホルムによる抽出を 1 回行う
8. 水相を新しいチューブに移し、0.6 容のイソプロパノールを加え、静かに混和する
9. 現れた DNA (白い糸くずの塊状のもの) をプラスチック製エーゼに巻き取り、新しいチューブに移す
10. エーゼから DNA が離れない場合は、無理にとらずにエーゼの先端をハサミで切る
11. 1 ml の 75% エタノールを加え、沈殿をすすぐ
12. 3,000rpm で 5 分間遠心分離を行う
13. エタノールを十分除く
14. DNA が乾かないうちに 300 μ l の TE バッファーを加え、十分溶解させる
15. DNA 濃度を測定し、濃い場合にはさらに TE バッファーを加える