

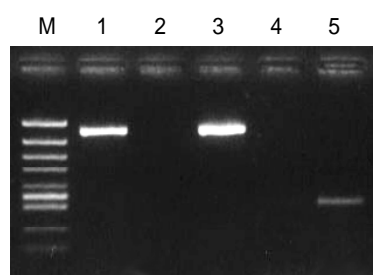
T4 gene 32 protein を用いた PCR 阻害の緩和

毛髪から抽出した DNA 溶液が、茶褐色や黒色に着色していることがある。これは 15cm 以上の長い毛髪の毛先部や脱色された毛髪において特に顕著である。着色の原因物質は毛髪に含まれている色素メラニンであると考えられ、PCR を阻害することが報告されている。

ISOHAIR を用いて、毛髪よりメラニンを多く含むと思われる DNA を抽出した。

既に PCR による増幅が確認されている(Lane 1)反応混合液に、得られた DNA の 1/20 量を添加したところ増幅しなかった(Lane 2)。そこで、さらに T4 gene 32 protein を添加したところ増幅した(Lane 3)。

また、得られた DNA をテンプレートとして、ヒト ミトコンドリア DNA(280bp)の PCR を行ったところ増幅しなかった(Lane 4)が、T4 gene 32 protein を添加したところ増幅した(Lane 5)。



M: Marker 5 (X174/*Hinc* digest)
3% Agarose 21

- Lane 1: ColE1 をテンプレートとした 900bp の増幅
- Lane 2: Lane 1 + 毛幹部 6cm より抽出した、メラニンを多く含む DNA1/20 量
- Lane 3: Lane 2 + T4 gene 32 protein (2 μg)
- Lane 4: 毛幹部 6cm より抽出した、メラニンを多く含む DNA1/20 量をテンプレートとしたヒトミトコンドリア DNA (280bp) の増幅
- Lane 5: Lane 4 + T4 gene 32 protein (2 μg)

< ColE1 PCR 混合液 >

Template DNA (ColE1/ <i>Sau96</i> I digest)	0.1ng
10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μl
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μl
primer-forward (20pmol/ μl)	1 μl
primer-reverse (20pmol/ μl)	1 μl
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μl)	1 μl
Total (H ₂ O up to)	40 μl

< ヒトミトコンドリア DNA PCR 混合液 >

10 × Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μl
dNTP mixture (2.5mM each)	4 μl
primer-forward (20pmol/ μl)	1 μl
primer-reverse (20pmol/ μl)	1 μl
Gene <i>Taq</i> NT (5units/ μl)	1 μl
H ₂ O	28 μl
Total	40 μl

	Lane1	Lane2	Lane3
ColE1 PCR 混合液	40 μl	40 μl	40 μl
メラニンを多く含む DNA 溶液	0 μl	1 μl	1 μl
T4 gene 32 protein(0.5 μg/ μl)	0 μl	0 μl	4 μl
H ₂ O	10 μl	9 μl	5 μl
Total	50 μl	50 μl	50 μl

	Lane4	Lane5
ヒトミトコンドリア DNA PCR 混合液	40 μl	40 μl
メラニンを多く含む DNA 溶液(鑄型)	1 μl	1 μl
T4 gene 32 protein(0.5 μg/ μl)	0 μl	4 μl
H ₂ O	9 μl	5 μl
Total	50 μl	50 μl

< PCR 条件 >

94	1 min.	} 20 cycles
94	20 sec.	
55	20 sec.	
72	20 sec.	
72	5 min.	

< PCR 条件 >

98	1 min.	} 35 cycles
98	15 sec.	
60	15 sec.	
72	30 sec.	
72	5 min.	