

PCR

1. PCR の原理

PCR とは、Polymerase Chain Reaction の略である。文字通り DNA ポリメラーゼを用いて連鎖反応的に DNA を増幅する方法である。PCR 法の開発は、分子生物学のみならず、さまざまな分野に影響を与えた。

PCR の原理は、増幅したい DNA とその両端の配列に相補的な一対の DNA プライマーおよび耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて、3 段階の温度変化を n サイクル繰り返すことによって標的

DNA を 2^n 倍に増幅することにある。温度変化の第 1 段階 (94 ~ 96°C) で、標的二本鎖 DNA を熱変性して一本鎖とし、第 2 段階 (55 ~ 60°C) でプライマーを一本鎖 DNA にアニーリングさせ、第 3 段階 (72 ~ 74°C) で伸長反応を進める。1 サイクルで標的 DNA は 2 倍になる。従って理論的には n サイクルの反応で標的 DNA は 2^n 倍に増幅されるので 20 サイクルでは約 100 万倍に増幅されることになる。実際には数 100 万倍まで増幅することができる。

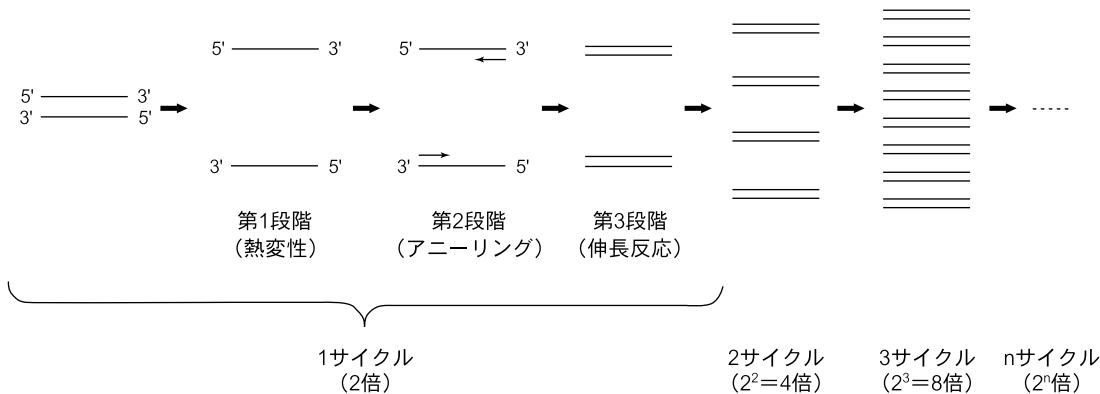


図 PCR 法による DNA 増幅の原理

2. PCR に影響を与える因子

このように PCR は非常に簡単に DNA を増幅できるわけであるが、さまざまな反応条件によって影響を受けるので、行う実験によって反応条件の最適化を行った方がよい。Taq DNA ポリメラーゼを用いた PCR に影響を与える因子について以下に簡単に解説する。

酵素濃度

Taq DNA ポリメラーゼは、通常 1 ~ 2.5 units/100 μ l 反応液で使用される。一般に濃度が高すぎると非特異的産物が出現することがあり、逆に濃度が低すぎると増幅が不十分になる。

dNTP 濃度

dNTP 濃度は通常それぞれ 20 ~ 200 μ mol/l である。各 dNTP の濃度は同一でないと誤った取り込みによるエラーが生じる原因になる。特異性と忠実度は、dNTP 濃度が低いほど高くなる。理論的には、100 μ l 反応液で 20 μ mol/l の各 dNTP が存在すれば、2.6 μ g の DNA が合成できる。

Mg²⁺濃度

通常、総 dNTP 濃度より 0.5 ~ 2.5 mmol/l 高い濃度が採用される。鋳型 DNA やプライマーから持ち込まれる EDTA などのキレート剤の濃度に注意しなければならない。

プライマー

プライマーは、通常 18 ~ 28 ヌクレオチド長で、G+C 含量が 50 ~ 60% で、Tm 値が 55 ~ 80°C となるように設計する。2 つのプライマーはそれぞれ 0.1 ~ 0.5 μ mol/l で使用する。

温度

変性温度は高いほど特異性や増幅度が高くなるが、逆に Taq DNA ポリメラーゼの活性低下を早めるので、普通は 94 ~ 96°C で 15 ~ 30 秒間である。

プライマーのアニーリング温度は、Tm 値より 5°C 程低い温度がよく、通常 55 ~ 60°C である。アニーリング温度が高いほど特異性は高くなる。0.2 μ mol/l のプライマーは数秒間でアニーリングする。

伸長反応の温度は、72°C が多く用いられる。合成速度は、他の反応条件にもよるが、1 秒間で 35 ~ 100 ヌクレオチドである。

サイクル数

サイクル数は多いほど増幅度は高くなるが、同時に非特異的産物が増加する。40 サイクルを越えないことが望ましい。理論的には指数関数的に増幅するが、実際にはプラトーになる。プラトーになる条件は、反応条件により異なる。

その他

pH も PCR に影響をおよぼす。通常 10 ~ 50 mmol/l Tris-HCl (pH 8.3 ~ 8.8 at 20°C) が用いられる。また、塩濃度、ゼラチンや非イオン性界面活性剤の存在によっても影響を受ける。

PCR は非常に高温で反応を行うため、反応液中の水分が蒸発し、組成が変わってしまう。反応液にミネラルオイルを重層することにより水分の蒸発を防ぐことができる(サーマルサイクラーの種類によってはミネラルオイルが必要ないものもある)。

3. PCR の実際

プライマーの設計

プライマーの設計上のポイントは以下の通りである。

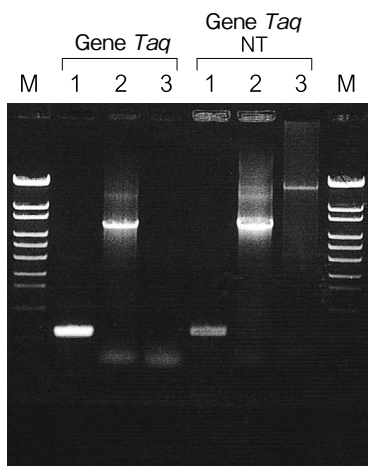
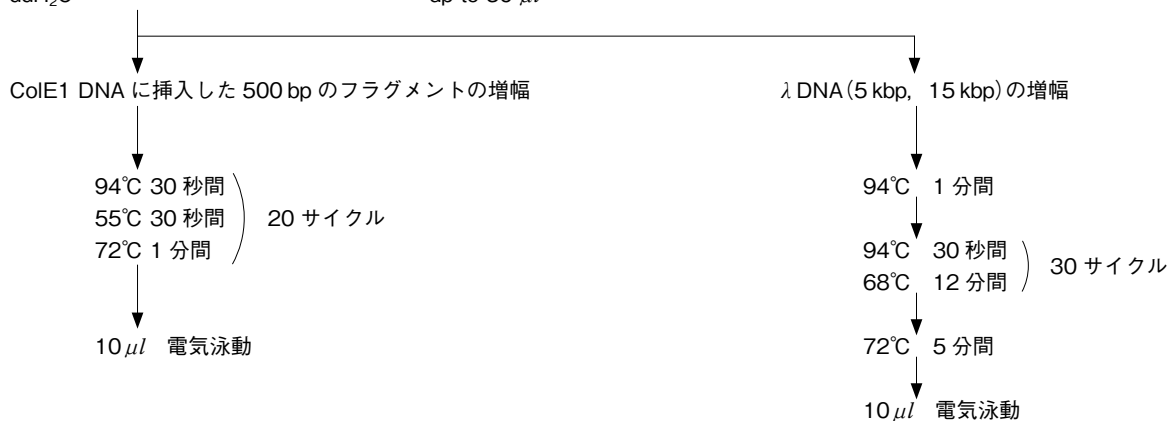
- ① 両プライマーの Tm 値が同程度であること。
- ② プライマーの 3' 末端側の塩基配列が正確であること。
- ③ プライマーの 3' 末端どうしが相補的でないこと。
- ④ G+C 含量があまり高くないこと (50 ~ 60% がよい)。特にプライマーの 3' 末端側に G+C リッチな領域がないようにする。
- ⑤ プライマー自身がヘアピンのような高次構造をとらないこと。

PCR 例

ニッポンジーンの GeneTaq または GeneTaq NT を用いた標準的な PCR の実験例は以下の通りである。なお、プライマーの

デザインや鋳型 DNA などにより反応の至適条件が変わることがある。

鋳型 DNA	< 1 μ g
10 × Gene Taq Universal Buffer (添付)	5 μ l
dNTP Mixture (添付) (2.5 mmol/l each)	4 μ l
primer-forward (20 pmol/ μ l)	1 μ l
primer-reverse (20 pmol/ μ l)	1 μ l
Gene Taq または Gene Taq NT (5 units/ μ l)	0.5 μ l
ddH ₂ O	up to 50 μ l



M : Marker 6 (λ /Sty I digest)

鋳型 DNA
Lane 1 ColE1 DNA 500 bp
Lane 2 λ DNA 5 kbp
Lane 3 λ DNA 15 kbp

0.8% Agarose S
100 V、30 分間