

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。

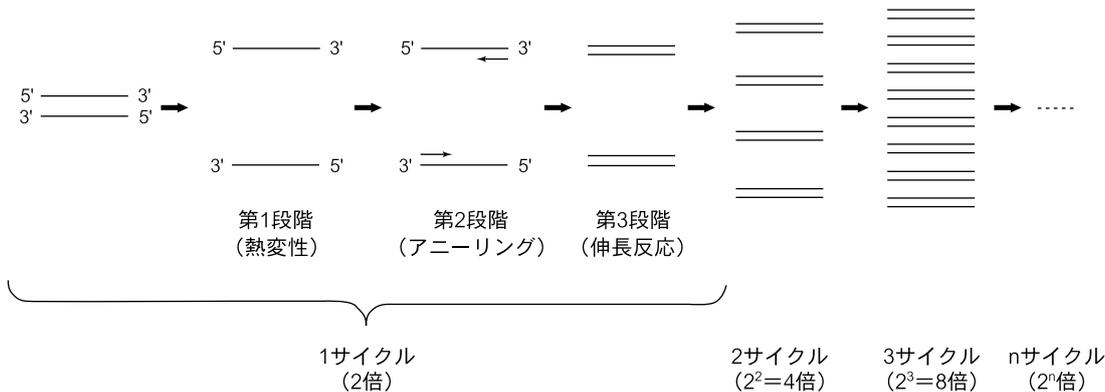


図 PCR法によるDNA増幅の原理

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 μl 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 μmol/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 μl 反応液で20 μmol/lの各dNTPが存在すれば、2.6 μg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 μmol/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 μmol/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。

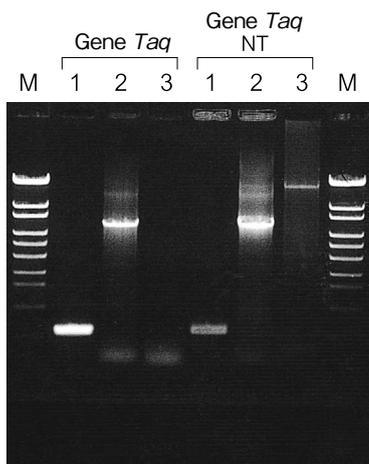
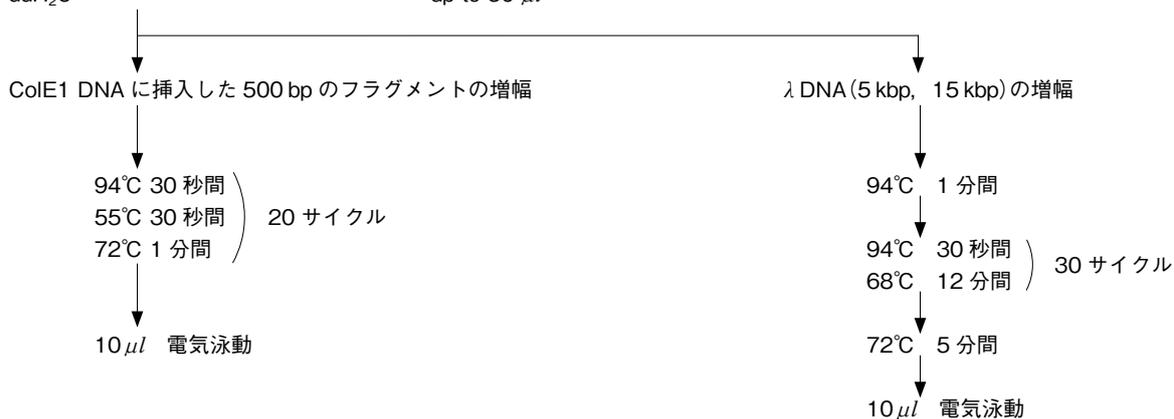
- ① 両プライマーのTm値が同程度であること。
- ② プライマーの3'末端側の塩基配列が正確であること。
- ③ プライマーの3'末端どうしが相補的でないこと。
- ④ G+C含量があまり高くないこと(50~60%がよい)。特にプライマーの3'末端側にG+Cリッチな領域がないようにする。
- ⑤ プライマー自身がヘアピンのような高次構造をとらないこと。

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