

1. はじめに

新型コロナウイルスでよく聞く(もう聞かないかもしれないが)PCR とは何をやっているのか、あまり理解していない人も少なくないだろう。そこで今回は、お酒に強いか弱いかの判断材料となる ALDH2(2 型アルデヒド脱水素酵素)遺伝子を PCR で増幅させながら、PCR の理論も説明していこう。

2. DNA とは

PCR とはつまるところ、DNA を増幅する作業である。では、そもそも DNA とはなんだろうか。DNA(デオキシリボ核酸 Deoxyribonucleic acid)は遺伝情報を担う物質であり、人間の体を構成するタンパク質の設計図である。細胞内の核の中には染色体があり、その中に DNA がある。DNA は、デオキシリボースという糖と、リン酸と塩基から構成されており、塩基にはアデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)の 4 種類がある。これらの塩基は図 1 に示すように A と T、G と C がそれぞれ水素結合により相補的に結合をしており、二重らせん構造を取る。

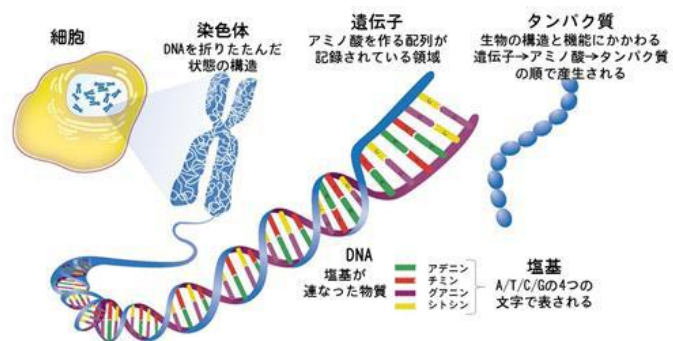


図 1 DNA の構造

3. DNA 抽出

まず PCR を行うには、増幅したい DNA (鋳型 DNA と呼ぶ)を採取する必要があるので、ISOHAIR EASY というキットを用いてヒトの毛髪からヒト DNA を回収する。この段階で回収した DNA はそのまま PCR に使うことが出来る。

以下にプロトコルを示す。

(1) -20°C で保存してある ISOHAIR EASY を室温で融解し、転倒混合した後スピンドウン(数秒間遠心分離をし、チューブ内の溶液をチューブの底に集めること)して氷上に静置する。

(2) DNA を抽出する毛髪を用意し、不純物を取り除く。

① 1.5ml チューブにエタノールを $300\mu\text{l}$ 加える。

② はっきりと毛根が認められる毛髪を 3 本採取する(自然脱毛した毛髪

では上手く抽出できない可能性があるので、その場で引き抜く)。

③採取した毛髪 3 本は、毛根部から 1.5 cm 程のところを切断し、エタノールを加えたチューブに毛根部 3 本をピンセットで入れる。

④チューブを数回転倒混和して毛根部を簡単に洗浄した後、毛根部をキムワイプ等の上に取り出してエタノールを蒸発させる。

(3) 毛根部から DNA を抽出する。

①0.2ml チューブに ISOHAIR EASY を 50 μ l 加える。

②さらに 3.(2)で得た毛根部をチューブに加える。

③サーマルサイクラーを用いて、チューブを 55 $^{\circ}$ C で 20 分間と 94 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートする。インキュベート後は速やかに 4 $^{\circ}$ C に冷却する。

④ピペティングした後、不溶物をとらないように上清を 1.5ml チューブに移し、DNA 抽出液を得る。

⑤これで鋳型 DNA が採取できた。

4. PCR

(1) 理論説明

抽出した DNA サンプルを用いて PCR を行う。この PCR では、135bp(塩基対のこと)の領域を増幅する。反応液の調製は氷上で行う。PCR では、まず温度を約 95 $^{\circ}$ C に上昇させることで二本鎖の鋳型 DNA の水素結合を切断し、一本鎖に熱変性させる。次に、60 $^{\circ}$ C 程度に下げる。この時、DNA 鎖は二本鎖に戻ろうとする。しかし、反応液に加えたプライマー(DNA を伸長する際、DNA の合成開始点になる物)は、元の DNA よりも短く、量も多いため、元の DNA が二本鎖に戻るよりも優先して鋳型の DNA に結合する。この際、プライマーは塩基の A-T、G-C の相補性によって増幅したい領域の末端にくっつく。この段階をアニーリングという。次に、約 70 $^{\circ}$ C にし、DNA ポリメラーゼを活性化させることで、プライマーから元の DNA の相補鎖を合成する。この段階を伸長反応という。これで DNA 量が 2 倍になった。つまり、理論上はこの操作を n 回行くと DNA 量は 2ⁿ 倍になる。

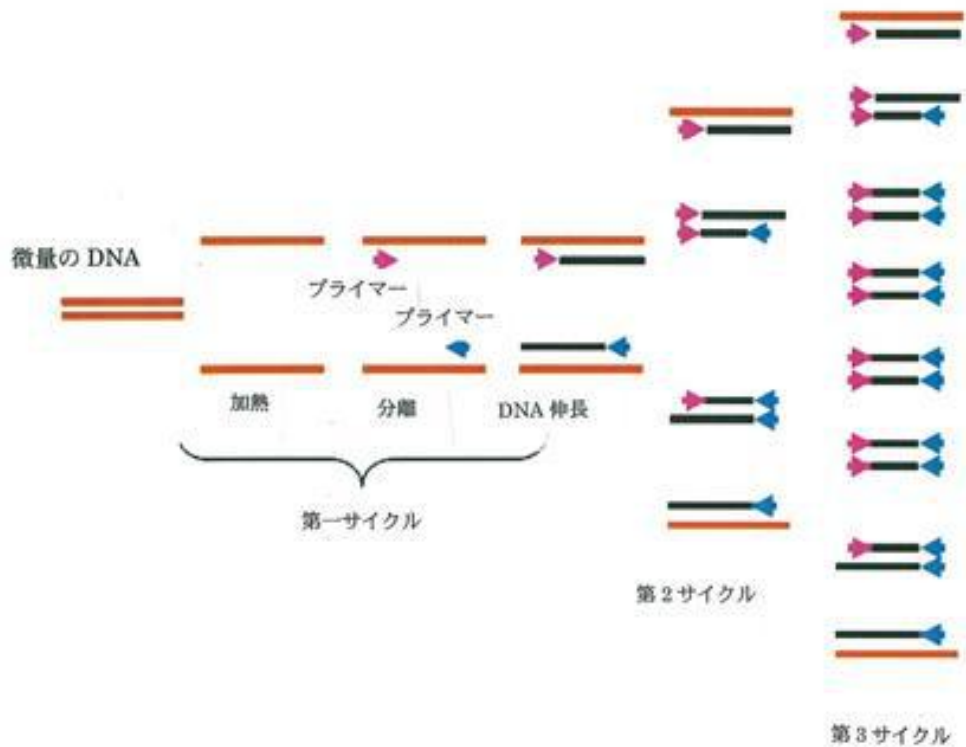


図 2 PCR サイクルの説明

(2) PCR に必要な物

① 鋳型 DNA

これがないと増幅はできない。

② プライマー

鋳型 DNA に相補的な塩基配列を持つ合成オリゴヌクレオチド(短い一本鎖 DNA)である。増幅したい領域を挟む 2 か所に結合するものを使用する。

③ DNA ポリメラーゼ

伸長反応の際 DNA を合成する酵素。

④ バッファー

DNA ポリメラーゼが最適な環境で働くことができるよう pH や塩濃度を整えるために必要。

⑤ マグネシウムイオン (Mg^{2+})

耐熱性 DNA ポリメラーゼが働くために必要。

⑥ dNTP

DNA を合成するために必要な原料。dATP、 dGTP、 dCTP、

dTTP の 4 種類からなる混合物である。

(3) プロトコル

- ①凍結したバッファーやプライマーは室温で融解して混合し、氷上に設置する。すべての試薬類をスピンドウンする。
- ②1.5ml チューブに表 1 の通り(鑄型 DNA 以外の)試薬を加え、マスターミックスを作る。本実験では 2 種類のプライマーセットを使うことに注意する。つまり、Primer Fw(Forward)と Primer Rv(Reverse)-N を使って野生型アレル(対立遺伝子、親から子へ遺伝子が伝えられる時にお互いにどちらか一方が選ばれるような関係にある遺伝子のこと。例えば、ヒトの ABO 式血液型の A 遺伝子、B 遺伝子、O 遺伝子など)の有無を調べる。また、Primer Fw と Primer Rv-M を使って変異型アレルの有無を調べる。

表 1 PCR 反応液の組成

滅菌水	30.1µl
10x Gene Taq Universal Buffer	5.0µl
dNTP Mixture	4.0µl
Primer Fw(100pmol/µl)	0.2µl
Primer Rv-N または Primer Rv-M(100pmol/µl)	0.2µl
Gene Taq NT	0.5µl
鑄型 DNA	10µl
Total	50µl

チューブ内の溶液が飛散している場合はスピンドウンする。

- ③マスターミックスを穏やかにピペッティングして、0.2ml チューブに入れる。
- ④鑄型 DNA を加える。
- ⑤以下の条件で PCR を行う。チューブの蓋をしっかりと閉めないと、溶液が蒸発してしまうので留意する。

98℃	1 分	35 サイクル
98℃	20 秒	
60℃	20 秒	
72℃	45 秒	
72℃	5 分	

- ⑥これで DNA が増幅できた。

5. 電気泳動

(1) 理論説明

増幅した DNA サンプルをアガロースゲル電気泳動にかけ、DNA を分けることで目的の遺伝子が増幅できたかどうか確かめる。なぜ DNA を分けることができるのだろうか。まず、アガロースを緩衝液(TAE バッファー)に溶かし、固めるとアガロースが網目状になる。

そして、右の図 3 が電気泳動装置である。黒色のコードが陰極で、マイナスに帯電している。

DNA を構成しているヌクレオチドは図 4 のようにリン酸残基によりマイナスに荷電している。アガロースゲルに DNA を添加し、緩衝液(TAE バッファー)中で電気を流すと、DNA は陽極(赤色のコード)に移動する。この時、大きい DNA はアガロースゲルの網目構造に引っ掛かりやすくゆっくりと動くのに対して、小さい DNA はより速く動く。この原理を利用して DNA を分離する方法がアガロースゲル電気泳動である。

(2) プロトコル

- ① 3%アガロースゲルを用意する。
- ②ゲルを泳動槽にセットして、1×TAE バッファーを注ぐ。
- ③PCR 反応液とローディングバッファーを 5:1~10:1 の割合で調整する。
- ④ウェルに合わせて 10~20 μ l アプライする。
- ⑤100V で電気泳動する。ローディングバッファーの紫色がゲル端 1 cm



図 3 電気泳動装置



図 4 ヌクレオチドの構造

に来たらやめる。

⑥ Gel Green(核酸染色色素)で後染めする。

⑦ 波長 470nm のライトで照射してバンドを撮影する。

6. 実験結果

4. (3)の実験

をしたものを電

気泳動したとこ

ろ、図 5 の結果

が得られた。右

からラダーバン

ドごとに DNA

の塩基数が決ま

っており、試料

DNA の塩基数

がわかる。筆者

の N(野生型)、

筆者の M(変異

型)、筆者の父

の N、筆者の父の M、筆

者の母の N、筆者の母の

M)。ラダーの一番下のバ

ンドのあたりに、ずらっ

と 6 個うすくバンドが出

ていることが確認できる。

これは図 6 にあるように筆

者、筆者父、筆者母とも

に MN 型(NN 型はお酒に

強く、MN 型はお酒に強く

も弱くもない。そして

MM 型はお酒に弱い。)で

ある可能性もあるが、

PCR がうまくいかずプラ

イマーが残っており、そ

れがバンドとなって出

ている可能性がある。その

25kbp →

3kbp →

1.5kbp →

500bp →

200bp →

50bp →

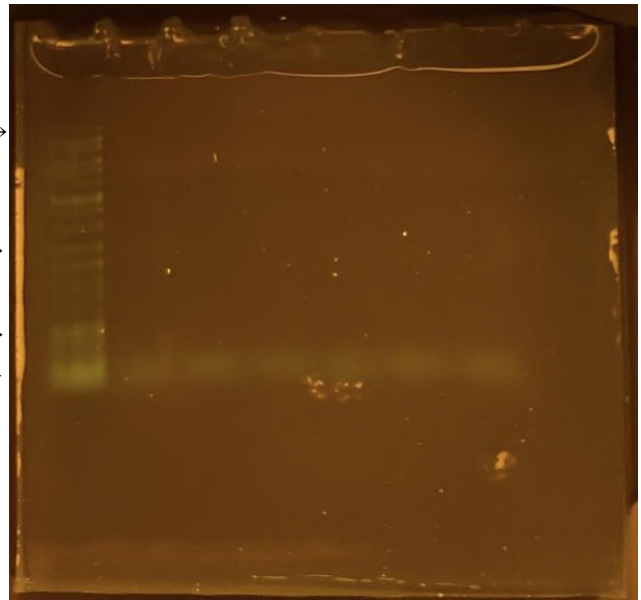


図 5 電気泳動結果

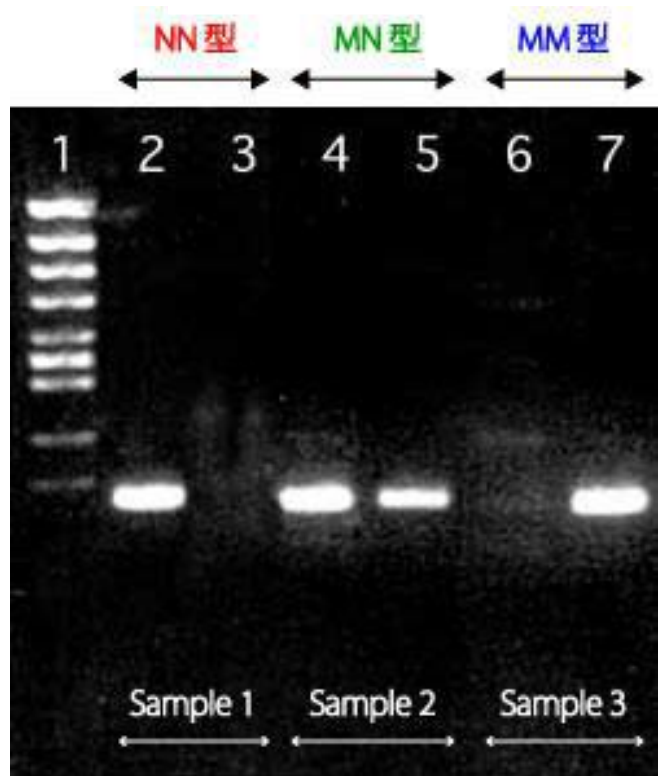


図 6 増幅例

可能性を調べるために、分光光度計で DNA が本当に抽出できているか調べた。

7. 分光光度計

(1) 分光光度計とは

分光光度計とは、分光器と光検出器を組み合わせた構造をもち、波長を順次変化させながら単色光ごとの光の強さを検出してスペクトル分布を測定する装置である。これを使うと資料のスペクトル分布を調べることができ、スペクトル分布を見れば目的の物質の有無や量が分かる。

(2) 結果

図 7 は、3.(3)で得られた試料を分光光度計にかけた結果である。図 8 は DNA のスペクトル分布である。両者を比較すると、おそらく 3.(3)で DNA は抽出できてい

たものの、濃度が非常に薄かったと思われる。その結果 PCR がうまくできず、プライマーの余りが図 5 の 2～7 列目バンドの正体であり、3 人とも MN 型であるから前述の結果が出たのではないかと推測される。

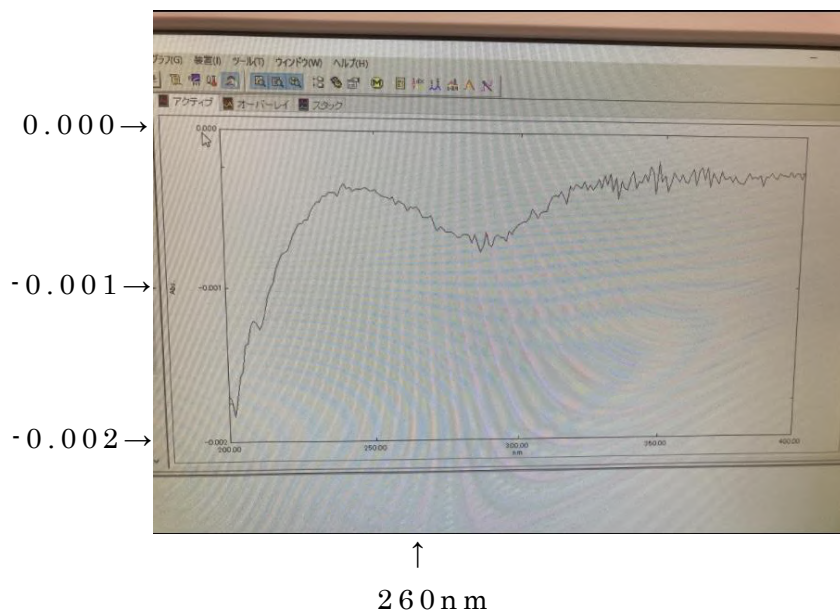


図 7 3.(3)試料のスペクトル分布

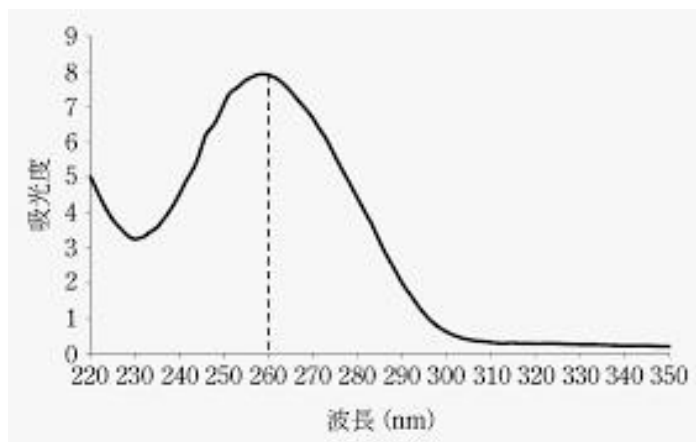


図 8 DNA のスペクトル分布

8. おわりに

今回はおそらく DNA 抽出の時点でうまくいっていなかったため失敗してしまったと思われるが、PCR は目に見えない DNA の違いを可視化してくれるすごい技術である。今後、DNA 抽出をやり直し、それでも結果が出なければ DNA 抽出方法のアプローチを変えて実験を続けていきたい。

9. 参考文献

タカラバイオ PCR 実験の手引き

https://www.takara-bio.co.jp/research/kensa/pdfs/book_1.pdf

(最終閲覧日 2022-3-31)