

## 1 目的

プラスミド DNA をテンプレートに用いて、実際に PCR 法による DNA の増幅を行い、PCR 法の基礎原理と応用について学ぶ。

## 2 原理

PCR 法とは、対象とする(テンプレート)DNA、2 種のプライマー、耐熱性のポリメラーゼを、ヌクレオチドを含む緩衝液に溶かし、それを 3 段階に温度を変化させながら反応させるというものである。

最初に 95°C に温度変化させた際には熱変性が起こり、二本鎖 DNA が 2 本の一本鎖 DNA になる。次に 55°C に変化させた際には、プライマーが相補領域に結合するアニーリングが起きる。最後に 72°C に変化させると、複製反応が起きる。この 1 サイクルあたり、DNA は 2 倍に増幅される。

## 3 実験操作

### 3.1 使用器具

- ・ マイクロピペッター
- ・ サンプルチューブ
- ・ サーマルサイ클ラー
- ・ 電気泳動用ゲル

### 3.2 試薬

この節以降は括弧内の名称で呼ぶ。

- ・ Milli-Q 水 (Milli-Q)
- ・ 反応バッファ 5 倍濃度 (5xBuf)
- ・ dNTP10 倍濃度 (dNTP)
- ・ Taq ポリメラーゼ (Taq)
- ・ プライマー (M13\_F、M13\_R、Zeta\_R、Zeta\_F)
- ・ 実験 1 でのテンプレート DNA (Venus)
- ・ 実験 2 でのテンプレート DNA (T-1, T-2, T-3, T-4)
- ・ DNA マーカー

### 3.3 実験手順

#### 【実験1】PCR 反応サイクル数と DNA 生成量の関係

- ①表 1 のとおり反応液の調製を行った。それぞれ 5.5 本分の反応液をサンプルチューブ内で作ったあと、よく混合し 5 本の PCR チューブに 20  $\mu$ l ずつ分注した。

表 1. 反応液の内訳

試薬	1 本分の量 / $\mu$ l	5.5 本分の量 / $\mu$ l
Milli-Q	12	66
5xBuf	4	22
dNTP	2	11
M13_F	0.5	2.75
M13_R	0.5	2.75
Taq	0.1	0.55
Venus	1	5.5
合計量	20.1	110.55

- ②サーマルサイクラーに 5 本ともセットし、exp1-1 の設定を使って反応を開始した。終了後、1 本取り出し氷上に保存した。

表 2. exp1-1 の温度設定

	温度 / $^{\circ}$ C	時間 / min
	95	2
5cycles	95	0.5
	55	0.5
	72	0.5
	72	1
	10	$\infty$

- ③続けて exp1-2 に設定変更し、再度スタートした。終了後、1 本取り出し氷上に保存した。これを最後の 1 本まで繰り返した。

表 3. exp-1-2 の温度設定

	温度 /°C	時間 /min
5cycles	95	0.5
	95	0.5
	55	0.5
	72	0.5
	72	1
	10	∞

- ④反応液を 10  $\mu$ l ずつ電気泳動した。その際 100 bp の DNA マーカー 2  $\mu$ l も同時にゲルに流し込んだ。
- ⑤泳動終了後、画像解析ソフトを用いて、泳動したゲルのデジタル写真より PCR 産物の量を比較した。

### 【実験 2】PCR による遺伝子構造の判別

- ⑥表 4 のとおり反応液の調製を行った。それぞれ 4.5 本分の反応液をサンプルチューブ内で作ったあと、よく混合し 4 本の PCR チューブに 19  $\mu$ l ずつ分注した。プライマーの違いによって A~C とした。

表 4. 反応液の内容の内訳

試薬	1 本分の量 / $\mu$ l	4.5 本分の量 / $\mu$ l	A	B	C
Milli-Q	12	54	○	○	○
5xBuf	4	18	○	○	○
dNTP	2	9	○	○	○
M13_F	0.5	2.25	○	○	○
M13_R	0.5	2.25	○		
Zeta_R	0.5	2.25		○	
Zeta_F	0.5	2.25			○
Taq	0.1	0.45	○	○	○
合計量	19.1	85.95			

- ⑦それぞれに 4 種類のテンプレート DNA(T-1, T-2, T-3, T-4)を 1  $\mu$ l ずつ加え、攪拌した。サーマルサイクラーに 12 本全てセットし、exp2 の設定を使って反応を開始した。

表 5. exp2 の温度設定

	温度 /°C	時間 /min
	95	2
20cycles	95	0.5
	55	0.5
	72	2
	72	1
	10	∞

⑧反応終了後、反応液 10  $\mu$ l ずつ電気泳動し PCR 産物を確認した。その際 1 kb の DNA マーカー 2  $\mu$ l も同時に泳動させた。

#### 4 実験結果

【実験 1】 PCR 反応サイクル数と DNA 生成量の関係

電気泳動の写真を以下に添付した。

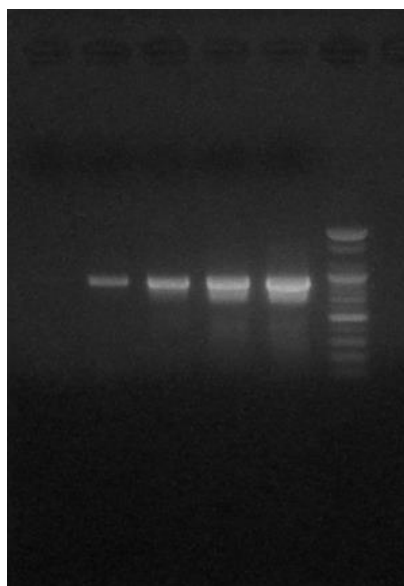


図 1. 実験 1 の電気泳動

また、次の表に蛍光強度をまとめた。

表 6. 実験 1 の蛍光強度の測定結果

反応サイクル数	蛍光強度	蛍光強度の対数値
5	20	1.30
10	712	2.85
15	1884	3.28
20	2863	3.46
25	3457	3.54

## 【実験 2】PCR による遺伝子構造の判別

電気泳動の写真を以下に添付した。

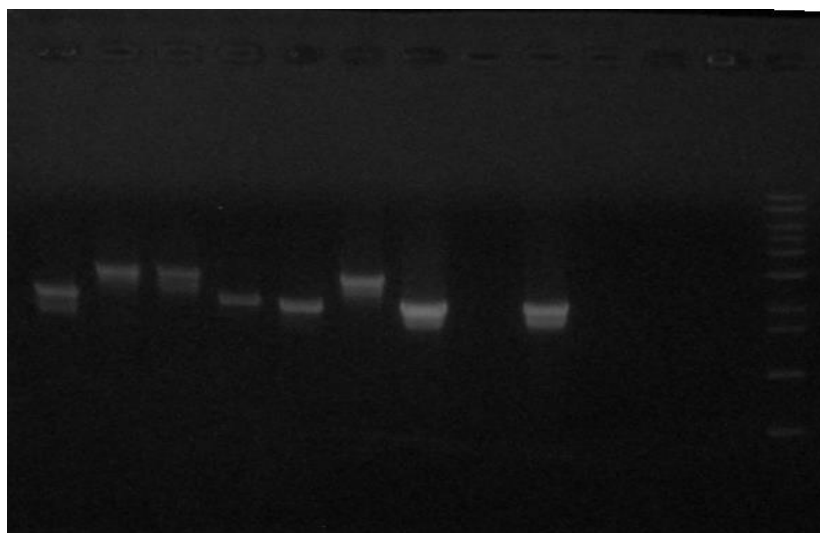


図 2. 実験 2 の電気泳動

## 5 レポート課題

### 5.1 PCR 反応サイクル数と DNA 生成量の関係

実験 1 で得られた測定結果(表 6)を、縦軸を PCR 産物量(蛍光強度)、横軸を反応サイクル数として、グラフにまとめた。

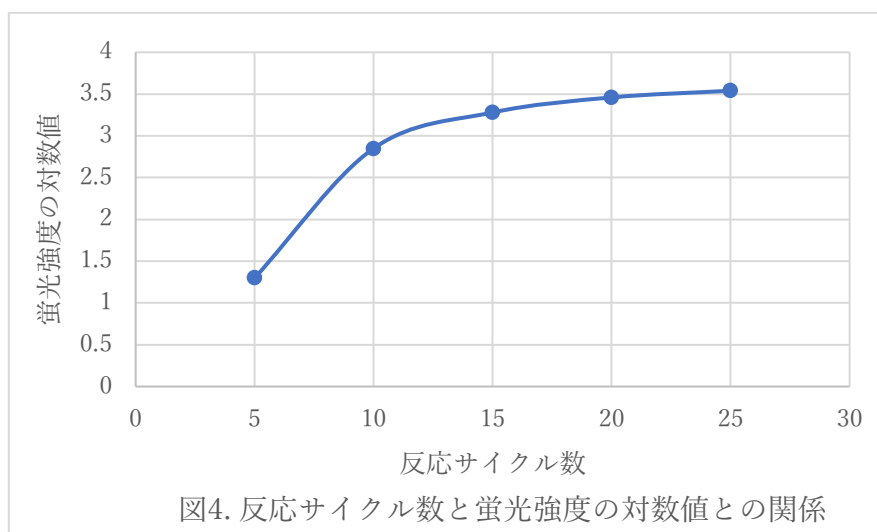
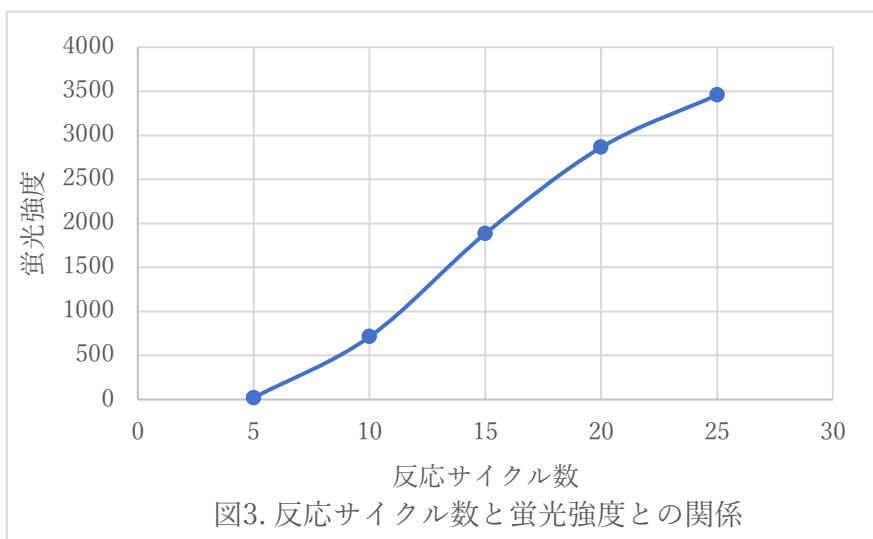


図3について、反応のはじめは徐々にPCR産物量が増加し、10サイクルを過ぎると急激に増加している。この調子で15サイクルまでは指数関数的に増加している。15サイクル数を過ぎると増加はやや緩やかになっている。

図4について、5～10サイクルでほぼ直線となっている。10サイクル過ぎたあたりから、傾きが穏やかになり、最後はほぼ0になっている。

序盤PCR産物量は急激に増加し、終盤では緩やかな増加になる理由について考える。最初は、まだDNAにアニーリングしているプライマー数が少なく、DNAサンプルが増えていることが考えられる。また、DNAを増幅させるためには、プライマーとDNAポリメラーゼ、塩基の元となるdNTPが必須である。反応が進み、これらはどんどん消費されてしまうとこれらの数は少なくなってしまう。そのため、DNAはそれ以上増幅することができず、PCR産物量の増加が緩やかになったと考えられる。

テンプレート DNA の濃度を变化させた時の①のグラフ变化を考える。

元の DNA 量が多いほど、PCR 産物量はより早く検出可能な量に達することができる。そのため、曲線はより早いサイクルで立ち上がると考えられる。よって、初期濃度が高いと、図 3 のグラフの概形はそのまま左にずれる。反対に、初期濃度が低いほど、右にずれると考えられる。また、グラフの傾きに関しては、影響しないと考えた。これは、濃度を変えたとしても、指数関数的に増えていくことは同じだからだ。したがって、最大増幅産物量にも変化は生じない。

増幅効率  $Y$  について考える。

PCR による増幅過程は、以下の式で表される。 $(N_0$  : ある時点での産物量、 $N_1$  :  $n$  サイクル後の産物量、 $Y$  : 増幅効率)

$$N_1 = N_0(1 + Y)^n$$

これを变形すると、

$$Y = \left(\frac{N_1}{N_0}\right)^{\frac{1}{n}} - 1$$

と導ける。表 6 より、 $N_0 = 20$ 、 $N_1 = 712$ 、 $n = 5$ を代入すると、

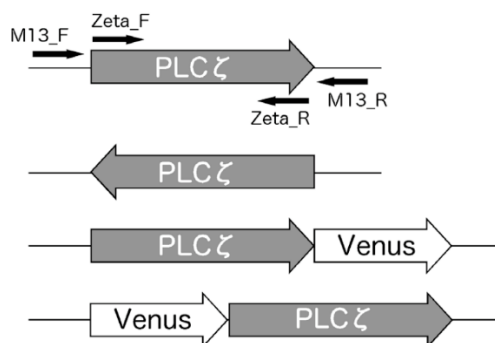
$$Y = \left(\frac{712}{20}\right)^{\frac{1}{5}} - 1 \cong 1.0$$

となった。本来ならば、実際の反応では  $Y$  は 1 未満であるはずだが、そうならなかった。原因として考えられるのは、画像解析ソフトを用いて線を引いた際に、狂いが生じたことである。

## 5.2 PCR による遺伝子構造の判別

各遺伝子構造を判別する。

実験 2 では T-1～T-4 のテンプレート DNA を使用した。今回の遺伝子構造はの図 5 の通りである。上からア、イ、ウ、エとする。



テンプレート DNA と混合されているのは、プライマーセット 1 では M13\_F と M13\_R、プライマーセット 2 では M13\_F と Zeta\_R、プライマーセット 3 では M13\_F と Zeta\_F である。

アニーリング開始の方向に関しては、M13\_F はテンプレート DNA の左から右、M13\_R はテンプレート DNA の右から左、Zeta\_F は PLCζ の左末端から右、Zeta\_R は PLCζ の右末端から左へ、それぞれ始まる。

図 2 の電気泳動の写真より、遺伝子構造を決定していく。

プライマーセット 1 を用いた時、全てのテンプレート DNA がアニーリングされ、DNA の長さに変化が出ると考えられる。結果、全てのテンプレート DNA はアニーリングされ、プライマーセット 1 の T-2 と T-4 は T-1 と T-3 より DNA の長さが長くなっている。したがって T-2、T-4 はウ、エのどちらかであり、T-1 と T-3 はア、イのどちらかだと予測される。

プライマーセット 2 を用いた時、プライマーの Zeta\_R が PLCζ の右側末端からしかアニーリングしないので、アとウはほぼ同じ DNA 長になると考えられる。またイは PLCζ と Zeta\_R が同じ向きであり、アニーリングができない。よって増幅されず、電気泳動は現れないと考えられる。結果、T-1 の電気泳動が現れず、T-2～T-4 は電気泳動が現れた。濃さに少し差はあるものの T-3 と T-4 は、ほぼ同じ DNA 長を示した。したがって T-1 はイ、T-3 と T-4 はア、ウのどちらか、T-2 はエだと予測される。

プライマーセット 3 を用いた時、ア、ウ、エは PLCζ と Zeta\_F が同じ向きであり、アニーリングができない。よって増幅されず、電気泳動は現れないと考えられる。結果、T-1 の電気泳動のみ現れた。したがって T-1 はイと予測される。

以上より、T-1 がイ、T-2 がエ、T-3 がア、T-4 がウと予測した。

プライマーの長さについて、もし用いたものが短かった場合どうなるのかを考える。

プライマーに対し、DNA の塩基配列は非常に長い。プライマーが短すぎてしまうと、塩基配列からプライマーに対する塩基対が生じてしまい、意図しないところからアニーリングが始まってしまう可能性がある。よって、長すぎず短すぎない、適した長さのプライマーを用いることが大切である。

アニーリング温度について、もし低すぎるあるいは高すぎる場合について考える。

PCR 反応でのアニーリング温度は、プライマーの  $T_m$  (melting temperature : 2 本鎖 DNA が変性して 1 本鎖になる温度) より 3～5℃低くするのが基本である。今回 55℃で行った。このアニーリング温度が高すぎると、伸長反応との温度差がなくなってしまう、アニーリング途中に伸長反応がはじまる恐れがある。また、そもそものプライマー自体に熱変性が生じてしまい、アニーリングができない可能性も考えられる。反対に、アニーリング温度が低すぎると、プライマーと鋳型 DNA が合わず、プライマーの非特異的なアニー



リングが起こしやすくなる。したがって目的増幅物が減少すると考えられる。

## 6 引用・参考文献

- ・『Essential 細胞生物学』 訳・中村桂子他 南江堂出版
- ・PCR 反応条件における 6 つの注意点 – Thermo Fisher Scientific 株式会社  
URL : <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>