

## II-84 PCR法による *in vitro* 遺伝子 増幅とDNAプローブの作成

東北学院大学工学部 学生員 ○金子 朋之  
同上 小関 多賀美  
同上 正 員 遠藤 銀朗

### 1. はじめに

DNA組換え体のような遺伝子改変微生物を環境工学分野において活用するためには、DNA組換え体の生理的特性や効率が重要であるばかりでなく、それが導入される場における挙動についても十分な情報を得ておく必要があると考えられる。

本研究においては、大腸菌（以下 *E. coli* と記す）とそのプラスミドを用いて、*E. coli* から抽出したプラスミドDNAの特定部分をポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）法によって増幅し検出・定量する方法について基礎的検討を行なった。近年開発されたPCR法は好熱性DNA合成酵素（*Taq* DNAポリメラーゼ）を用いて試験管内でDNAの大量増幅を行なう方法である。また定量的検出の方法としてコロニーハイブリダイゼーションについて検討した。

### 2. 実験方法

#### 《PCR法の概要》

二本鎖DNAに熱（94℃）をかけることによって一本鎖に変性させることができる。このようにして変性したDNAの一方の鎖を鋳型として、相補するもう一方の鎖を合成するにあたって、まず温度を下げた（60℃）状態で15～25マーのプライマー-DNAをアニーリングさせる。次に上記 *Taq* ポリメラーゼ（この酵素の至適温度は72℃）を用いてヌクレオチドの重合反応を行ない二本鎖を完成させる。さらにこのサイクルを繰返し行なうことによって2<sup>n</sup> 倍（nは反応繰返し数）に元のDNAを試験管内で増幅することができる。

#### 《実験材料および装置》

- ①制限酵素・Bgl I：東洋紡製
- ② *Taq* DNAポリメラーゼ：シークス社製—宝酒造販売
- ③ pBR322 DNA：宝酒造製
- ④ pBR322用プライマー-DNA・プライマー-HおよびP1：宝酒造製
- ⑤ dNTPs：宝酒造製
- ⑥ DNAプローブ作成用キット・ケミプローブキット：宝酒造販売

PCR反応を行なわせるための温度可変インキュベーターとして、アルミブロックヒーター式のテンプサイクラーモデル150（COY社製）を用いた。

表-1 PCR反応液の調製方法

|                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| 前述の材料を用いて0.5μℓのエッペンドルフ               |                                  |
| チューブ中で表-1のような反応系を構成させた後、             | 1・dd-H <sub>2</sub> O 34.5μℓ     |
| サーマルサイクラーにセットし、DNA変性温度（              | 2・[10×] Reaction Buffer 5.0      |
| 94℃）⇒プライマー-DNAとのアニーリング温度             | 3・dNTPs Mix 1.25mM 8.0           |
| （最適温度）⇒ポリメラーゼ反応温度（72℃）⇒              | 4・Primers 0.5                    |
| 次のサイクル、のように反応液の温度を変化させ目              | 6・T. Template 1.0                |
| 的とするDNA断片（ターゲットDNA）を <i>in vitro</i> | 7・ <i>taq</i> DNA Polymerase 0.5 |
| で増幅させた。                              | 計 50μℓ                           |

コロニーハイブリダイゼーションによるDNAの検出のためには、前述の酵素標識によるプローブ作成キットを用いてpBR322用のプライマー-DNAを抗原-抗体反応によって標識した。これを用いて寒天プレート上に出現させたコロニーに対し、常法によりハイブリダイズさせることによって検出した。

### 3. 実験結果

pBR322 DNAを制限酵素(Bgl I)で切断したのちにフェーノール・クロロホルム処理等によって精製したものとししないものをターゲットDNAに用いた場合のPCR増幅結果には有意の差は見られず、制限酵素の存在(但し、PCR反応液中での酵素濃度は1/50に薄まる。)は妨害しないことが知られた。またpBR322を制限酵素で切断することなく直接ターゲットとして用いた場合およびE. coli HB101でクローニングしたものから粗抽出したものを直接ターゲットとして用いた場合にも十分な増幅が可能であった。これらの結果から、PCR法における対象サンプルの精製度やターゲットDNAの性状は、適切な反応条件と適切なプライマーを用いる限りそれほど問題ないことが知られた。

ターゲットDNAの調整に際してフェノライズ処理によって精製したものとしなかったもの(この精製によってDNA濃度が約1/10に減少した)をPCR法(アニーリング温度55℃、反応サイクル数20回)によって増幅した後アガロースゲル電気泳動によって検出した結果を図-1に示した。また至適条件(アニーリング温度50℃)の下でpBR322のDNA断片を反応サイクル数を変えて(5、8、11、14、17、20回)増幅した場合の結果を図-2に示した。これらの結果により、初期ターゲットDNA量がある限界以下に低濃度(PCR反応液中濃度で0.02 pg/μl以下)となるような場合には、PCR法による増幅検出が困難であること、および反応サイクル数を増すことによって、5~17回の間で反応サイクル数と増幅DNA濃度の間には正の相関があることが認められた。しかし17回以上では増幅は飽和に達することも同時に知られた。

DNAプローブを作成し、コロニーハイブリダイゼーションによるpBR322およびpBK9プラスミド保有E. coliの検出を行なったところ図-3および図-4に示すように十分な感度をもって検出が可能であった。また、DNAプローブと相補しないDNAしか持たないE. coliのコロニーはまったくこのプローブと反応せず検出特異性が高いことが知られた。

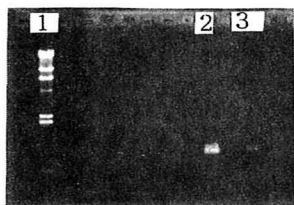


図-1

1. λ-DNA/HindIII
2. pBR322/Bgl I
3. pBR322/Bgl I  
フェノライズ処理

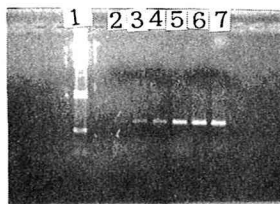


図-2

1. λ-DNA/HindIII
2. pBR322 PCR 5回
3. pBR322 PCR 8回
4. pBR322 PCR 11回
5. pBR322 PCR 14回
6. pBR322 PCR 17回
7. pBR322 PCR 20回

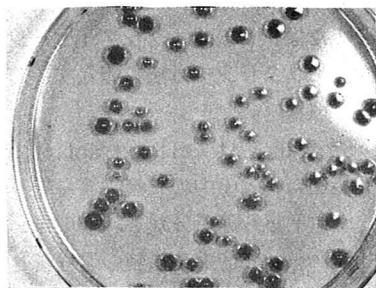


図-3 元のコロニー

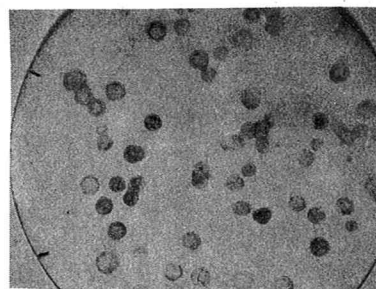


図-4 反応させた結果