

## 執筆者一覧

### 編者

養王田 正文 東京農工大学大学院 教授

### 執筆者 (50音順, [ ]内は執筆担当章)

井筒 浩	日立化成工業(株) [第7章]
小原 和彦	日立化成工業(株) [第3章]
川崎 隆史	(独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門 [第2章]
河原林 裕	(独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門 [第2, 8, 14章]
銀屋 治巳	ジェネティン(株) [第9, 11, 12章]
座古 保	(独)理化学研究所 [第1, 4, 5, 16章]
三橋 将人	Hitachi Chemical Research Center, Inc. [第3, 6, 7, 15章]
藤森 一浩	(独)産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門 [第8章]
養王田 正文	東京農工大学大学院 教授 [第9, 10, 13, 17章]

- 本書に掲載されている会社名、製品名は、一般に各社の登録商標または商標です。
- 本書では、© マーク、® マーク、™ マークの表示を省略させていただいております。
- 本書では、会社名を表記するにあたって、略称にて記載しております。
- 2010年2月現在、Applied Biosystems社とInvitrogen社は合併され、Life Technologies社として業務を展開しております。しかし、本書では便宜上旧会社名のまま記載しております。
- 2010年2月現在、Stratagene社はAgilent Technologies社に経営統合されましたが、本書では便宜上旧会社名のまま記載しております。

## まえがき

研究室に入った学生に最初にさせる実験はPCRである。特に、目的のタンパク質の遺伝子をPCRで増幅し、発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現系を作成するというメニューをよく使う。うまくいけば、目的のタンパク質の大量発現ができ、そのまま卒業論文のテーマになり、卒業論文で構造解析まで終わってしまうこともある。私が学生だった25年前なら、間違いなく博士論文が書ける内容である。

しかし、全ての学生がそのような順風満帆で幸せな学生生活を送れるというわけではない。PCRで増幅しないことや、ベクターに組み込む段階で挫折することも多い。そのような場合、我々は学生の実験への姿勢や技術に問題があると判断し、できるまで実験を繰り返させることが多い。しかし、実は、プライマーや温度サイクルなどの実験条件などが原因であることもあり、不幸な学生は不毛な実験を繰り返すことになる。

本書の執筆を依頼されたのは約3年前のことである。いろいろな雑誌に書いていた記事を読んだ講談社サイエンティフィクの編集者に依頼されたものであり、いつものように気軽に引き受けた。しかし、改めて考えると自分自身がPCRの技術に詳しいわけではないということに気がつき、執筆をためらう日々が続いた。第1章の「はじめに」にも書いてあるように、PCRの原理は単純だが、しかし得てしてそういうものほど奥が深い。いろいろな実験関係の本を読んで得た知識をまとめただけでは、奥の深いPCRの技術を伝えることができるわけがないのである。

そこで発想を転換し、私自身がPCRの奥深い技術を知り理解することを目的に、達人たちの智恵を借りることにした。今回お願いした共同執筆者は私の共同研究者であり、PCRを含めたさまざまな実験技術を独自に開発している実験の達人たちである。彼らの持っているノウハウや技術ならPCRで悩んでいる初心者の学生からベテランの研究者まで満足のいく内容になると考え、共同執筆をお願いした。その結果、本書のタイトルも『ラボマニュアルはじめのPCR実験』から『もっと知りたい！PCR実験』に変わり、目次からもわかるように、私の担当は大幅に減ることになった。

PCRの実験書は多数あるが、私の期待通り、本書には他の実験書とは異なる独自の内容や技術がふんだんに含まれている。ゆえに、初心者の学生だけでなく、ベテランの研究者にも読み応えのある本になっている。本書で最も勉強したのは私であり、私の研究室の不幸な学生の割合は確実に減ると確信している。

最後に、多忙の中、本書の執筆にご協力いただいた共同執筆者の皆様および私の担当章で図を作成してくれた佐藤雄一さんと中川あゆみさんへの感謝の言葉で、まえがきを終わらせていただきます。

2010年2月

編者 養王田 正文

# もっと知りたい！ PCR 実験●目次

まえがき

## 第 1 章 PCR の基本原理 座古 保 1

- 1-1 はじめに ..... 1
- 1-2 ゲノムの中の遺伝子 ..... 1
- 1-3 塩基の相補性 ..... 2
- 1-4 DNA 複製 ..... 4
- 1-5 DNA ポリメラーゼ ..... 4
- 1-6 プライマー ..... 6
- 1-7 PCR の原理 ..... 7
- 1-8 PCR の実際 ..... 12
  - A. DNA ポリメラーゼ 13
  - B. 鋳型 DNA 13
  - C. プライマー 14
  - D. dNTP, バッファー 16
  - E. サーマルサイクラーの設定 17

## 第 2 章 DNA ポリメラーゼ 川崎 隆史・河原林 裕 20

- 2-1 はじめに ..... 20
- 2-2 PCR に用いる DNA ポリメラーゼの分類 ..... 21
- 2-3 DNA ポリメラーゼの種類 ..... 22
  - A. 東洋紡績(株) 23
  - B. タカラバイオ(株) 25
  - C. Invitrogen 社 28
- 2-4 PCR 反応ごとの DNA ポリメラーゼの選択 ..... 29
  - A. 単に PCR によりクローンなどの確認を行いたい場合 29
  - B. 長い領域の PCR 増幅を行いたい場合 29
  - C. GC 含量の高い鋳型の PCR 増幅を行いたい場合 29
  - D. 直接、増幅断片を TA クローニングしたい場合 29
  - E. 鋳型と同じ配列の増幅断片を得る、正確な PCR を行いたい場合 30
  - F. ホットスタートで反応をスタートさせたい場合 30
  - G. RNA から RT-PCR を行いたい場合 30
- 2-5 PCR 時における DNA ポリメラーゼの使用に際して ..... 30
- 2-6 宿主 DNA の DNA ポリメラーゼ標品への混入について ..... 31
- 2-7 おわりに ..... 31

## 第 3 章 PCR プライマーの設計と合成 小原 和彦・三橋 将人 34

- 3-1 はじめに ..... 34
- 3-2 プライマー設計の手順 ..... 34
  - A. 塩基配列情報の収集 34

	B. プライマー設計のポイント	35
	C. プライマーの部位	38
	D. トラブルシューティング	38
3-3	$T_m$	39
	A. $T_m$ の計算方法	39
	B. 計算の際に役立つサイト	40
3-4	プライマーの合成	41
	A. プライマー合成の実際(依頼合成)	41
	B. プライマーの保存	42
	C. オリゴヌクレオチドの合成方法	43

## 第4章 PCR増幅DNAの精製方法 座古保 46

4-1	はじめに	46
4-2	アガロースゲル電気泳動による反応生成物の確認	46
4-3	フェノール/クロロホルム抽出	47
4-4	クロロホルム/エーテル抽出	48
4-5	DNAのアルコール沈澱	49
4-6	DNA吸着担体を詰めたスピнкаラムによるDNA精製	49
4-7	アガロースゲルからの切り出し精製	51
	A. DNA吸着担体を詰めたスピнкаラムによるアガロースゲルからのDNA抽出	52
	B. 中性平衡化フェノール添加後の凍結・融解によるアガロースゲルからのDNA抽出	54

## 第5章 PCR増幅DNAのサブクローニング 座古保 55

5-1	はじめに	55
5-2	DNA断片とプラスミドベクターDNA	55
5-3	ライゲーション	56
5-4	TAクローニング	57
	A. TベクターDNAの調製	57
	B. TAクローニング	58
5-5	プラントエンドクローニング	59
	A. インサートDNAのプラントエンド化	59
	B. プラントエンドベクターDNAの調製	61
5-6	制限酵素サイトを用いたサブクローニング	61
	A. 制限酵素サイトを持つインサートDNAの作成	62
	B. プラスミドベクターDNAの制限酵素処理	64
	C. アルカリホスファターゼによるベクターDNAの脱リン酸化処理	65
5-7	インサートチェック	66
	A. コロニーPCR	67

## 第6章 RT-PCR 三橋将人 69

6-1	はじめに	69
6-2	RT-PCRの基本手順	69
6-3	実験をはじめる前に	70

6-4	検体	70
6-5	RNAの精製	71
6-6	cDNA合成	73
6-7	PCR	74
6-8	結果の解釈	75
6-9	Hem(A) <sup>+</sup> システムの紹介	76
6-10	おわりに	77

## 第7章 リアルタイムPCR 井筒 浩・三橋 将人 78

7-1	はじめに	78
7-2	リアルタイムPCRの概要	78
7-3	リアルタイムPCRの長所と短所	79
7-4	リアルタイムPCRの増幅DNA測定方法	80
	A. TaqMan Probe法(Hydrolysis Probe法)	80
	B. インターカレータ法	81
	C. Molecular Beacon法	82
7-5	リアルタイムPCRを用いたコピー数の定量	82
7-6	リアルタイムPCR実行時の注意点	84

## 第8章 塩基配列決定とPCR 藤森 一浩・河原林 裕 85

8-1	はじめに	85
8-2	塩基配列解読の原理とその進歩	85
8-3	DNA塩基配列解読法の原理	86
	A. マクサム・ギルバート法	86
	B. サンガー法	87
	C. 各塩基配列解読手法の特徴	89
8-4	塩基配列解読の進歩とPCR反応	89
	A. サイクルシーケンシング	89
	B. マクサム・ギルバート法とPCR	90
8-5	塩基配列解読の自動化	91
	A. サイクルシーケンシングによる自動化	91
	B. 機器の進歩	93
8-6	次世代シーケンサー	93
	A. 次世代シーケンサーでのPCR反応	94
	B. 次世代シーケンサーの塩基配列検出原理	96
8-7	シーケンシングの今後	97
8-8	おわりに	97

## 第9章 PCRを用いた遺伝子変異導入方法 養王田 正文・銀屋 治巳 99

9-1	はじめに	99
9-2	PCRを用いた部位特異的突然変異導入方法	99
9-3	エラープローンPCRを用いたランダムな変異導入法	102
	A. 背景	102

- B. エラー頻度の決定因子 103
- C. 変異の偏り 105
- D. EP-PCR の実施例 107
- E. 留意点 110

## 第 10 章 PCR を用いた遺伝子変異, 多型検出技術 養王田 正文 112

- 10-1 はじめに ..... 112
- 10-2 SSCP ..... 112
- 10-3 DGGE ..... 113
- 10-4 Allele Specific PCR ..... 114
- 10-5 PCR-RFLP ..... 114
- 10-6 マイクロサテライト ..... 115
- 10-7 大規模 SNP タイピング技術 ..... 116

## 第 11 章 マルチプレックス PCR 銀屋 治巳 119

- 11-1 はじめに ..... 119
- 11-2 マルチプレックス PCR の必須条件 ..... 119
- 11-3 条件検討の方法論 ..... 120
- 11-4 各 step の解説 ..... 121
  - A. step1 PCR プライマーの選択と構造チェック 121
  - B. step2 PCR プライマーの相互利用と相同性のチェック 121
  - C. step3 モノプレックス PCR の実施 122
  - D. step4 マルチプレックス PCR の実施 123
  - E. step5 各種パラメータの最適化 123
- 11-5 マルチプレックス PCR の重要なパラメータの解説 ..... 124
  - A. PCR プライマー 124
  - B. dNTPs 124
  - C. *Taq* DNA polymerase 124
  - D. バッファー中の塩類 124
  - E. 添加物 124
  - F. マルチプレックス PCR の実施条件 125
- 11-6 トラブルシューティング ..... 126
- 11-7 その他の方法: DPO 法 ..... 127

## 第 12 章 サーマルサイクラーと PCR の自動化 銀屋 治巳 129

- 12-1 はじめに ..... 129
- 12-2 サーマルサイクラー ..... 129
  - A. サーマルサイクラーの温度制御 129
  - B. 新規機構のサーマルサイクラー 131
- 12-3 PCR の自動化 ..... 131
  - A. PCR 自動化が困難な要素 131
  - B. PCR 操作の自動化 132

## 第 13 章 PCR 以外の DNA 増幅法 養王田 正文 136

- 13-1 はじめに ..... 136
- 13-2 RCA 法 ..... 136
- 13-3 LAMP 法 ..... 137
  - A. プライマー 138
  - B. 前処理サイクル 138
  - C. 増幅サイクル 139
- 13-4 ICAN 法 ..... 140

## 第 14 章 微生物と PCR 河原林 裕 143

- 14-1 はじめに ..... 143
- 14-2 病原微生物の検出 ..... 143
- 14-3 微生物量の定量とリアルタイム PCR ..... 144
- 14-4 16S rDNA 領域を用いた微生物の検出と同定 ..... 144
- 14-5 おわりに ..... 145

## 第 15 章 PCR の医療への利用 三橋 将人 146

- 15-1 はじめに ..... 146
- 15-2 診断と治療 ..... 146
- 15-3 検体の種類 ..... 146
- 15-4 簡易検査, 迅速検査, Point of Care Testing (POCT) ..... 147
- 15-5 DNA 診断と RNA 診断 ..... 148
- 15-6 診断のタイプ ..... 150
- 15-7 PCR 診断開発にあたっての留意点 ..... 150
- 15-8 おわりに ..... 151

## 第 16 章 法医学における PCR 座古 保 152

- 16-1 はじめに ..... 152
- 16-2 遺伝子多型と DNA 鑑定 ..... 152
  - A. 反復配列多型 153
  - B. 単一塩基多型 (SNP) 153
  - C. ミトコンドリア DNA 多型 153
- 16-3 犯罪捜査への DNA 鑑定の利用 ..... 154
- 16-4 おわりに ..... 155

## 第 17 章 PCR の考古学への利用 養王田 正文 157

- 17-1 はじめに ..... 157
- 17-2 分子考古学の歴史 ..... 157
- 17-3 分解とコンタミネーション ..... 157
- 17-4 絶滅した生物の遺伝子解析 ..... 159
- 17-5 おわりに ..... 159

索引 ..... 161