## 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］
川﨑　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　　ジェネテイン（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えさせることが多い．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ての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な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　川﨑 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ンカラムによる 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ンカ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　ブラントエンドクローニング …… 59
A. インサート DNA のブラントエンド化　59
B. ブ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)$^+$ 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（Hydrolsis 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