

Q & A

秦 美暢

防衛医科大学校, 検査部

Q. HLAのDNAタイピングを始めたいのですが、コンタミネーションに注意せよと言われました。具体的にはどうするのでしょうか。

A. コンタミネーションとは検体が様々なものに汚染されることをいいます。DNAタイピングでPCRを扱う際には、埃や手指に付いているDNaseが混入してDNAが破壊されることや、微生物のDNAや他の検体のPCR産物が混入して偽陽性になることが問題となります。特にPCR前の検体が他の検体のPCR産物で汚染されてしまうと、飛沫程度のごく僅かな混入でもPCRで大量に増幅されてしまい、*polymerase contamination reaction*などと悪口を言われることになってしまいます。

コンタミネーションを防ぐため、使用する器具や試薬類とその操作方法に注意します。チューブやチップは使い捨てのものをオートクレーブ処理して準備しますが、DNAが混入するとオートクレーブでは除去できませんので、手袋を着用して扱います。もちろん、手袋を着けたまま電話の受話器をとったりしては元も子もないわけで、キムタオルを介して触るとか、いちいち手袋を外すとか、無菌操作やRIの扱いと同様の注意をして下さい。水(ミリQ水や再々蒸留水)や試薬類はオートクレーブ処理し、不可能なものは濾過滅菌などを行なっておきます。

また、PCR前の検体を扱う部屋とPCR産物を扱う部屋を分けることが推奨されていますが、必ずしも恵まれた環境ばかりとは限りません。机やピペットを分けるとか、使用前に机をアルコールで拭くなどという注意が現実的でしょう。むしろ操作自体が問題で、操作による飛散やピペット本体への吸い込みが重大な汚染源となりますので、慎重にピペッティングを行なうよう留意して下さい。

このようにコンタミネーションに注意し、またPCRに際しては至適条件をよく探して、誤増幅のないきれいなPCR産物を得ることがタイピング精度に直結します。頑張ってください。

Q. HLAのDNAタイピングでPCR-RFLP法を行なう際のコツがありましたら教えてください。

A. エクストラバンドのないきれいなPCR産物と活性確認済の制限酵素を使うことです。活性低下にはBSA添加が有効なこともあります。またDR4で制限酵素*Mnl*Iを使う時は泳動ゲルを替えます。*Mnl*IはCCTCの7塩基後と、相補鎖の切断に伴うGAGGの7塩基前とを切断しますが、DRB1*0405やDRB1*0408では2つの認識部位と切断部位とが重なり合い、片方の切断だけが先に済むと他方が切断されず不完全切断のように見えます。11th IWSのプライマーを用いた場合、83 bp, 107 bp, 60 bpに加え、 $107+6=113\text{bp}$ 、 $6+70=76\text{bp}$ の弱いバンドも出現します。一方、DRB1*0401やDRB1*0409では、83 bp, 113 bp, 70 bpのバンドのみです。このため、これらのバンドの区別に適したゲルが必要で、ミューピッドでは6%ヌシーブ3:1アガロースゲルや15%ポリアクリルアミド(29:1)ゲルなどがよいでしょう。可能なら13cm程度の長いゲルで泳動することをおすすめします。