

## Q & A

阿藤 みや子<sup>1)</sup>, 小林 賢<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>防衛医科大学校輸血部, <sup>2)</sup>同検査部

**Q.** PCR に用いるプライマーの反応条件はどのように決められるのですか？

**A.** PCR の至適条件は、プライマー、Taq DNA ポリメラーゼ、dNTP 濃度、バッファー、MgCl<sub>2</sub>濃度、PCR 装置、チューブの形状や液量等により異なるのでそれぞれに適した条件を求めなくてはなりません。PCR 反応は、熱変性、アニーリング、伸長反応の 3 ステップを 30 回程度繰り返し行い、目的領域の DNA を増幅させる方法ですが、通常熱変性と伸長反応の温度はどの条件でもだいたい一定で、94~96°C の熱変性と 72°C の伸長反応が用いられています。反応時間については、液量、ミネラルオイルの有無や目的領域の DNA 鎖長によって異なります。PCR 条件を決定する要因のなかで、アニーリング温度は最も重要になってきます。言い換えれば、プライマーの設計が大変重要なウエイトを占めることとなります。通常アニーリング温度 (T<sub>m</sub>) を計算式で求める場合、 $T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$  (°C) の計算式が用いられますが、ここで求められた値は、実際の温度よりも高いことが多く、5°C 前後のずれが生じます。近年、熱力学を計算要素に加えた実際の温度に近い値の求められる計算式が報告されています。すなわち、 $T_m = \Delta H / \Delta S + \Delta S^\circ + R \times \ln(c/4) - 273.15 + 16.6 \log M$  という式です。実際に自分で計算しようとするとかかなり複雑ですが、コンピューターソフトが出ていますのでそれを利用すると簡単に求めることができます。いずれにせよ至適条件を見いだすには何回かの試行が必至のようです。

**Q.** アガロースゲルにエチジウムブロマイドを入れて泳動すると、ゲルに濃淡が生じるのはなぜですか。

**A.** TBE 泳動緩衝液を用いた場合、DNA は陰極から陽極側へと移動しますが DNA 染色に用いるエチジウムブロマイドは、逆に陽極側から陰極側へと移動します。そのため、あらかじめゲルにエチジウムブロマイドを加えてから泳動すると、どうしても下半分が白っぽく、上半分が濃くなるという現象が起きてしまいます。この方法はただ PCR 産物の確認を行うだけでしたら短時間で出来るという利点もあります。しかしながら細かなエキストラのチェックや RFLP を行う場合には向きません。細かい DNA 断片を見なければならぬような場合には、バットに染色液を作りゲルを浸して染色する方法をとります。0.5mg/ml 濃度のエチジウムブロマイド液を遮光できるバットに作っておき、泳動の終わったゲルを 15分~30分間浸し染色すると、ムラなく均一に染色できます。この染色液は繰り返し使用することができ (肉眼で見て赤色が消えるまで) 経済的でもあります。ひとつ注意したいことは、ポリアクリルアミドゲルの染色の際、必ずフタを取ってから染色液に浸けること (忘れると染色されません)、またこのゲルはアガロースゲルやヌシーブドゲルに比べ軽いためによく沈めたつもりでも浮き上がってしまうこともありますので、軽く振とうさせながら染色します。この他にもエチジウムブロマイドをアガロースゲルと泳動緩衝液に加え泳動する方法もあります。しかし実際この方法で行う場合には十分注意する必要があります。きれいに染色出来、廃液量や危険性の問題からも泳動後染色する後染色法がもっとも望ましい方法であると思われます。染色後の廃液も直接流してしまうことは避けて、専用のビンなどに貯めて、それぞれの施設での処理法に従わなければなりません。