

## Q &amp; A

秦 美暢, 小林 賢

防衛医科歯科大学校, 検査部

Q. PCR-RFLP 法で DNA タイピングをしたところ、既知の切断パターンとは異なる結果が得られました。新アリルでしょうか。

A. 新アリルの可能性もありますが、まずはタイピングの過程をもう一度チェックしてみてください。タイピング方法のチェックだけでなく、人為的過誤（ヒューマンエラー）にも充分気をつけ、それでも問題がない時に新アリルを疑ってシークエンスやクローニングを考えることにしましょう。

タイピング方法のチェックとして、まずは使用した検体 DNA の質（純度や濃度）に気をつけて下さい。もし、DNA 検体にタンパク質や DNA 抽出試薬などが残留していたら、あとの反応に影響が出ることもあります。次に PCR 反応では、コンタミネーションの他にも、得られた産物が本当に目的とする遺伝子座のものかどうか問題となります。たまたま同じサイズで別の遺伝子が増幅しているのではないか、ということです。通常 PCR-RFLP 法ですと、制限酵素の切断パターンによって得られた PCR 産物が目的のものであることを確認しつつ検査を進めていけるわけですが、切断パターンが全く滅茶苦茶な場合には、このような偽増幅の可能性も考えてみてください。そして、制限酵素処理のところでは言うまでもなく制限酵素の活性がチェックポイントとなります。各酵素の至適反応温度の確認もお忘れなく。活性低下による部分切断か、ヘテロ接合体かの判別は時として非常に困難なことがあります。

このため、タイピングの全行程は（場合によっては DNA 抽出の部分にも）、コントロール検体と一緒に進めていくことが必要となります。

さて、もうひとつの問題点である人為的過誤ですが、実はこれがやっかいです。たとえ手慣れた人であっても、するはずのない間違いを起してしまうから「過ち」と呼ぶのであり、人が行うからには必ず（ごくわずかな確率であっても）つきまとう問題点です。検体、プライマー、反応チューブの取り違い、ゲルのレーンの間違い、写真の取り違い、転記ミスや判定表の読み違い、など疑い出したらきりがありませんが、疑ってください。そのために、二人でダブルチェックしたり、再検するのも一法でしょう。

こういった、タイピングの精度上のことや人為的過誤の問題がクリアーできたならば、いよいよ本当の新アリルかも知れません。いや、ちょっと待ってください。使用したタイピング法がどれだけのアリルを判定対象としたものであるかを確認してください。膨大な数のアリルの全てに闇雲に対応する必要があるかどうかは別の問題ですが、どの程度まで判定可能な方法を使ったのかを把握した上でタイピング結果を評価することも重要なことです。

とにかく新アリルのようだ、ということになったら、シークエンスやクローニングを行うこととなりますが、これは詳しい人に尋ねてください。PCR 産物をダイレクトシークエンスするのが手っ取り早いのですが、複数の箇所がヘテロであった場合には、それらの組み合わせ（シスからトランスか）を確認するためにもクローニングまで必要となります。折角ですから新鮮な検体から mRNA を抽出して、RT-PCR で全エクソンを増幅しましょう。これをベクターに挿入して大腸菌に組み込み、増やした大腸菌の中から目的の PCR 産物が入っているものを単離

し、それから再度ベクターの DNA を抽出してシーケンスするのです。ただし、PCR ダイレクトシーケンスでほとんど問題にならなかった PCR 増幅エラーがクローニングでは無視できなくなりますので、複製エラーの少ない DNA ポリメラーゼを使用したほうが良いでしょう。ミスを最小限にするためにシーケンスは、3つ以上のクローンで確認しなければいけませんし、これらはすべて両方向から行う必要があります。

ここまできたら、存分に祝杯をあげてください！