



”主婦力”が活きる仕事
～私にもできる実験補助～
(実験補助セミナー)

PCR

PCRとは

複製連鎖反応 polymerase chain reactionの略。DNAの特定の部位だけを大量に複製する手法。分子進化学の研究や犯罪捜査などに活用される。ポリメラーゼ連鎖反応。

PCRに必要な成分

- (1) バッファー (通常、酵素を買うとついてくる)
- (2) NTPs (増幅するDNAの部品となるヌクレオチド。
ATP、CTP、GTP、TTPの4種類のミックス)
- (3) プライマー (合成屋さんに注文。濃度を整えた水溶液の状態を使う)
- (4) DNA (増幅の鋳型となるDNA。濃度を整えた水溶液の状態を使う)
- (5) 酵素 (ポリメラーゼ。通常試薬屋さんで買う)
- (6) 水 (純水を滅菌したもの。反応液量の調整に使う)

研究室で用意されているものを使うことが多いです。
(ベテランになると調製から任されることもあります)

PCRの原理

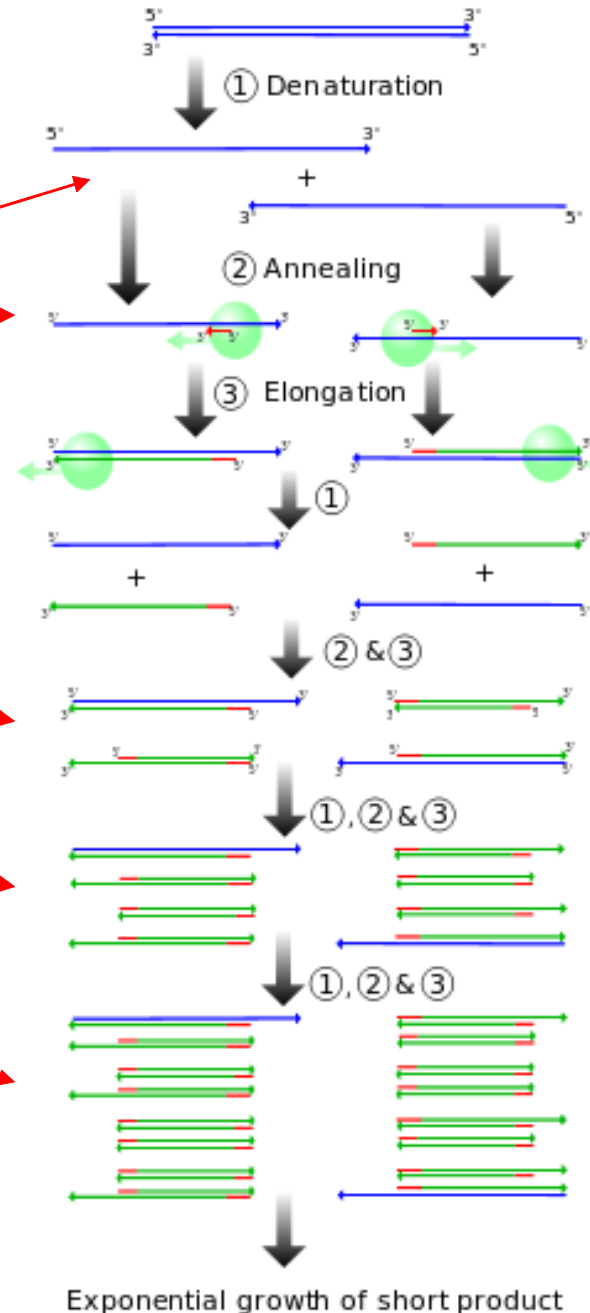
- ①二本鎖のDNAを熱変性して一本鎖にする
- ②プライマーをアニーリングさせる
- ③ポリメラーゼにより伸長反応させる
→二本鎖のDNAが2セットできる

- ①再び熱変性し、②プライマーをアニーリングし、
③伸長反応する
→二本鎖のDNAが4セットできる

- ①さらに熱変性、②アニーリング、③伸長反応
→二本鎖のDNAが8セットできる

- ①さらに熱変性、②アニーリング、③伸長反応
→二本鎖のDNAが16セットできる

これを20~30回繰り返すことにより、特定の部分だけを数百万倍に増やすことができる
(20サイクルで100万倍)



PCRを行う際の注意点（初心者編）

(1) わずかなDNAでも増幅する

→「コンタミ(汚染)」しないように気をつける

(2) 反応液にムラがあると増えにくい

→液量は正確に測り、きちんと混ぜる

(3) 酵素が失活すると増えない

→試薬は氷上に置き、手早く行う

(4) 材料の入れ忘れがあると増えない

→チェックリストを作るなど工夫する

(5) チューブの底に空気を残さない

→遠心してから反応装置にセットする

(6) 温度設定を間違えると増えない

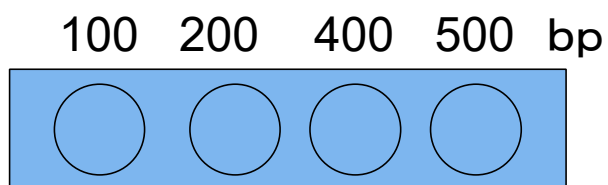
→機械の設定とプロトコルの一致を確認

一般的なPCR反応液組成の例

	1サンプル	8サンプル
10×バッファー	5	40
2mM dNTPs	5	40
TaqPolymerase (酵素)	0.5	4
プライマーA	0.5	4
プライマーB	0.5	4
DNA	1	-
水	add to 50 μ l (37.5)	300

PCR反応液調製(実習)

	1サンプル	4サンプル
水	24	96
2×すいすい※	25	100
Paq5000(酵素)	0.6	2.4
プライマー	1	-
DNA	1	4



別のチューブに水、2×すいすい、酵素、DNAを混ぜる
→各ウェルに49 μ l分注する
→各ウェルにプライマー1 μ lを加える

※ バッファー、dNTP、ローディングダイを含む、2×のプレミックス(自作)

PCR装置にかける

- (1) あらかじめ電源を入れておく
(ふたが温まるのに時間がかかる)
- (2) 遠心したプレートをセットする
(ふたが水平に押さえられるようにバランスよく配置)
- (3) プログラムを選択し、内容を確認する。必要があれば編集する。
- (4) 反応をスタートする

