

PCR実験

なるほど

QA

必ず増やす条件設定とコツ+
様々な実験への活用法



序

谷口武利

1章 これだけは知っておきたいPCRの基礎知識

- | | | | |
|---|-----------------------------------|------|----|
| 1 | PCRで遺伝子が増えるのはなぜですか？ | 谷口武利 | 14 |
| 2 | Taqポリメラーゼはどのような酵素で、誰がどこで見つけたのですか？ | 谷口武利 | 17 |
| 3 | PCRを使って、どのようなことができるのでしょうか？ | 谷口武利 | 20 |
| 4 | PCRをするにはどのような装置が必要ですか？ | 谷口武利 | 22 |
| 5 | PCRをするにはどのような試薬が必要ですか？ | 谷口武利 | 24 |
| 6 | PCR実験のためにどのような練習をしたら良いですか？ | 谷口武利 | 26 |

2章 PCRを始めるにあたって何が必要か

① 実験条件

- | | | | |
|----|--|------|----|
| 7 | PCRで遺伝子がうまく増えません。どのような原因と対応が考えられますか？ | 谷口武利 | 27 |
| 8 | プライマーの設計はどのようにしたら良いですか？ | 谷口武利 | 29 |
| 9 | Primer3Plusの使い方、パラメーターの設定について教えてください。 | 谷口武利 | 31 |
| 10 | アニーリング温度はどのように決めたら良いですか？ | 谷口武利 | 34 |
| 11 | PCRをうまく行うために考えなければいけない反応条件にはどのようなものがありますか？ | 谷口武利 | 36 |
| 12 | 伸長時間はどのように決めるのですか？伸長時間を長く設定すれば長いPCR産物が作れますか？ | 谷口武利 | 37 |
| 13 | 試薬やサンプルの調製はうまくできているはずなのに、バンドが検出されません。 | 谷口武利 | 39 |
| 14 | どのような場合にコンタミネーションを疑った方が良いでしょうか？また対応は？ | 谷口武利 | 43 |

② 鋳型DNAと反応産物

- 15** プライマーやテンプレート、その他の試薬の濃度はどのように最適化するのですか？ 谷口武利 44
- 16** 鋳型DNAの種類とそれぞれの鋳型DNAの取り方を教えてください。 谷口武利 46
- 17** PCR産物の検出にはどのような方法がありますか？ 谷口武利 47
- 18** 変異が入らないように長い産物をPCRするにはどうすれば良いですか？ 谷口武利 48
- 19** PCR産物がいくつも出てしまいます。どのような原因と対応が考えられますか？ 谷口武利 49
- 20** GCリッチの配列の増幅がうまくいきません。
GCリッチの配列をPCRするコツを教えてください。 谷口武利 50
- 21** ゲノムからPCRをしましたがバンドが出ません。 谷口武利 51
- 22** 適切な量のTaqポリメラーゼを取ろうとしてもうまく取れません。
必要以上に酵素を取らないコツを教えてください。 谷口武利 53
- 23** 鋳型DNAは十分量あるはずなのに、遺伝子がうまく増幅されません。 谷口武利 54
- 24** PCR反応を阻害する夾雑物にはどのようなものが考えられますか？ 谷口武利 56
- 25** 鋳型DNAやプライマーの安定な保存法について教えてください。 谷口武利 58
- 26** 鋳型となるDNAやRNA、PCR産物の純度と濃度を調べる方法には
どのようなものがありますか？ 谷口武利 59
- 27** PCR産物の精製法にはどのようなものがあるのでしょうか？ 谷口武利 60

③ コロニーPCR

- 28** コロニーPCRの利点は何ですか？ 近藤基樹, 谷口武利 62
- 29** コロニーPCRで多数のサンプルを手早く処理するコツを
教えてください。 近藤基樹, 谷口武利 64
- 30** コロニーPCRでバンドが出ないのはなぜですか？
また、出てもスメアーになるのはなぜですか？ 近藤基樹, 谷口武利 66

④ シークエンス

- 31** シークエンスの原理と使い分けについて教えてください。 戸高 寛, 谷口武利 69
- 32** シークエンスが行えません。どのような原因と対応が考えられますか？ 戸高 寛, 谷口武利 73
- 33** シークエンスのためのサイクルシークエンスPCR反応とサンプル調製の
コツ・注意点を教えてください。 戸高 寛, 谷口武利 75
- 34** サンプル調製はうまくいっているのにシークエンサーの不具合で
シグナルがうまく検出できないようです。 戸高 寛, 谷口武利 77
- 35** ダイレクトシークエンスとは何でしょうか？
どのような場合に使えますか？ 戸高 寛, 谷口武利 80

3章 各種キット・試薬・酵素の紹介など

① 酵素の選択

- 36** PCRをするための酵素の種類や機能・強みを教えてください。 森澤啓子 82

- | | | | |
|-----------|------------------------------------|------|----|
| 37 | 多数の検体を安価にPCRするには、どの酵素が良いですか？ | 森澤啓子 | 85 |
| 38 | PCR産物を効率良く増やすには、どの酵素が良いですか？ | 森澤啓子 | 86 |
| 39 | 変異を入れずに、正確にPCRをするにはどの酵素が良いですか？ | 森澤啓子 | 88 |
| 40 | ホットスタートとは何ですか？どのような場面で使うと良いのでしょうか。 | 森澤啓子 | 89 |

② バッファー

- | | | | |
|-----------|---|------|----|
| 41 | バッファーに入っている試薬にはそれぞれどのような役割があるのですか？ | 森澤啓子 | 91 |
| 42 | バンドが出ないので、バッファーを自作しようと考えていますが、注意することはありますか？ | 森澤啓子 | 92 |
| 43 | バッファー中のMg ²⁺ 濃度について教えてください。 | 森澤啓子 | 93 |

4章 遺伝子発現解析

① RT-PCR

- | | | | |
|-----------|---|------------|-----|
| 44 | RT-PCRの原理を教えてください。 | 樋口琢磨, 坂本修士 | 94 |
| 45 | RNAの取り方、取るときの注意点を教えてください。 | 樋口琢磨, 坂本修士 | 96 |
| 46 | RT-PCRで定量する際、再現が取れないときがあります。定量PCRにおけるサイクル数の許容範囲はどれくらいですか？ | 坂本修士 | 99 |
| 47 | RT-PCRやリアルタイムPCRでmRNAを定量する際、内部標準コントロール遺伝子はどのように選択したら良いのでしょうか？ | 坂本修士 | 100 |
| 48 | RNAの分解を疑うのはどのような場合ですか？また、分解している場合の対処法について教えてください。 | 坂本修士 | 102 |

② リアルタイムPCR

- | | | | |
|-----------|----------------------------------|------|-----|
| 49 | リアルタイムPCRの検出には、どのような方法がありますか？ | 森澤啓子 | 104 |
| 50 | リアルタイムPCRでmRNAが正確に定量できるのは、なぜですか？ | 森澤啓子 | 107 |
| 51 | 定量のための検量線（スタンダード）作成について教えてください。 | 森澤啓子 | 109 |
| 52 | 比較Ct法とはどのような方法ですか？ | 森澤啓子 | 112 |
| 53 | リアルタイムPCRで何ができますか？ | 森澤啓子 | 114 |
| 54 | リアルタイムPCRでシグナルが検出できません。 | 森澤啓子 | 116 |

5章 遺伝子発現調節を調べる

- | | | | |
|-----------|--|------------|-----|
| 55 | 遺伝子発現調節領域はどのように決めたら良いですか？ | 樋口琢磨, 谷口武利 | 118 |
| 56 | レポーターアッセイの利点は何ですか？PCRでどのようにコンストラクトを作るのですか？ | 樋口琢磨, 谷口武利 | 121 |
| 57 | レポーターコンストラクト作製のためのプライマー設計の注意点を教えてください。 | 樋口琢磨, 谷口武利 | 124 |

6章 PCR産物の応用，PCRでできること

① PCR産物の利用法

- 58** PCR産物をどのような実験に利用できますか？ 谷口武利 126
- 59** PCR産物を利用したクローニングにはどのような種類がありますか？ 谷口武利 129
- 60** PCR産物をクローニングするときのコツを教えてください。 谷口武利 134
- 61** PCR産物が制限酵素で切れていないようです。
どのような原因と対応が考えられますか？ 谷口武利 136
- 62** PCR産物がうまくクローニングできませんでした。
どのような原因と対応が考えられますか？ 谷口武利 137

② 融合タンパク質

- 63** PCR産物から融合タンパク質を作るにはどうすれば良いですか？ 谷口武利 138
- 64** 融合タンパク質のさまざまな作り方とその応用について教えてください。 谷口武利 141

③ 培養細胞・組織での目的遺伝子発現

- 65** 目的遺伝子を培養細胞で発現させその機能を調べたいのですが、
どうすれば良いですか？ 谷口武利 144
- 66** 変異を入れた遺伝子を作製するには、どのような方法がありますか？ 谷口武利 146
- 67** ウイルスベクターで目的遺伝子を発現させるにはどうしたら良いですか？ 谷口武利 148

7章 ゲノム解析

- 68** エピジェネティックな遺伝子発現制御について、
PCRを使ってどのように解析するのですか？ 坂本修士 155
- 69** PCRを使ったメチル化DNAの検出法・注意点について教えてください。 坂本修士 157
- 70** ChIPとはどのような手法ですか？ どのような解析ができるのですか？ 坂本修士 159
- 71** ChIP法でよくあるトラブルとその原因および対応策について教えてください。 坂本修士 162
- 72** bisulfite-PCRがうまくいきません。 どのような原因と対応が考えられますか？ 樋口琢磨 165

8章 PCRを用いた高度な特殊実験手法

① SNP

- 73** SNPにはどのような種類があり、どのような効果が予測されますか？ 秋丸国広 167
- 74** SNP解析の原理と解析方法を教えてください。 秋丸国広 169
- 75** SNP解析により疾患原因遺伝子を検索した例を教えてください。 秋丸国広 173

② マイクロダイセクション

- 76** マイクロダイセクションを利用して、
どのような実験ができるのですか？ 五井孝徳、高木 均、岸本由香、松川 茂 175

- 77** マイクロダイセクションをするためには
どのような装置が必要ですか？ 五井孝徳，高木 均，岸本由香，松川 茂 177
- 78** 組織切片から切り出したサンプルから
どのようにRNAを抽出するのですか？ 五井孝徳，高木 均，岸本由香，松川 茂 180
- 79** マイクロダイセクションで得た微量RNAから行う
RT-PCRの注意点を教えてください。 五井孝徳，高木 均，岸本由香，松川 茂 185

③ FISH

- 80** FISHとはどのような手法ですか？
どのようなことができるのでしょうか。 田口尚弘 189
- 81** 染色体顕微切断をするにはどのような機器が必要ですか？ 田口尚弘 192
- 82** 染色体顕微切断はどこに注意が必要ですか？ 田口尚弘 194
- 83** FISHで得られた具体例について教えてください。 田口尚弘 196
- 84** FISHに利用できるDNA（遺伝子）の種類とそのサイズについて
教えてください。 田口尚弘 199

④ 個人識別

- 85** PCRを使った個人識別とはどのような検査ですか？ 中西祥徳，橋本良明 201
- 86** 個人識別のための遺伝子（DNA）の採取方法を教えてください。 中西祥徳，橋本良明 204
- 87** 個人識別の具体的な検査方法を教えてください。 中西祥徳，橋本良明 207

⑤ ノックアウトマウス，トランスジェニックマウスの作製・解析法

- 88** 相同組換えを起こしたES細胞のスクリーニングに
PCR法は利用できますか？ 津田雅之 210
- 89** PCRを使ったマウスの遺伝子型の判別方法（genotyping）について
教えてください。 津田雅之 212
- 90** マウス・ラット組織からのRNAの抽出方法を教えてください。 津田雅之 216
- 91** スピードコンジェニックで使用されるPCR-SSLP法について教えてください。 津田雅之 219
- 92** マウス・ラットの微生物検査にPCRを利用することはできますか？ 津田雅之 222