

〈短報〉

DNAシーケンスのためのPCR産物の調製方法の検討

星野 真理¹⁾

Examination of template preparation before direct nucleotide sequencing of PCR products.

Mari Ohmura-Hoshino

Summary Template preparation before direct nucleotide sequencing of PCR products was examined in this study. First, to determine annealing temperature, T_m values of each primer for PCR were calculated using the nearest neighbor method. PCR was performed using temperatures as close to each T_m value as possible, while never exceeding annealing temperatures. Next, to purify PCR products of excess primer, single stranded DNA, and unincorporated nucleotide triphosphates, which could interfere with direct DNA sequencing, samples were treated with shrimp alkaline phosphatase in combination with exonuclease I digestion. Using this template preparation of PCR product, high-quality DNA sequence data was generated directly from PCR product without any loss of the template, although it is the simplest and fastest method available. This method could be considered useful in ensuring high specificity of PCR product for direct DNA sequencing.

Key words: PCR product, DNA sequencing

I. 緒言

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、DNAとRNAのシーケンシング、遺伝子解析、そして遺伝子操作に幅広く用いられ、必須の技術となっている。DNAとRNAシーケンシング、遺伝子解析、そして遺伝子操作でPCRを行う場

合、PCR産物の解析は、必須である¹⁻²⁾。PCR産物の解析には、直接的、もしくは非直接的な方法など数多くの方法があるが、それぞれに利点と欠点がある³⁾。その中でPCR産物のダイレクトシーケンシングを行う場合、高いクオリティのDNAシーケンスデータを得るためには高い純度と収率のPCR産物が前提となる。しか

¹⁾ 学校法人暁学園四日市看護医療大学看護医療学部臨床検査学科
〒512-8045 三重県四日市市萱生町1200

¹⁾ Department of Medical Technology, School of Nursing and Medical Care, Yokkaichi Nursing and Medical Care University
1200 Kayo-cho, Yokkaichi, Mie, 512-8045, JAPAN

連絡先：星野真理
四日市看護医療大学看護医療学部臨床検査学科
Tel: +81-593-40-1905
Fax: +81-593-61-1401
E-mail: hoshino@y-nm.ac.jp

受付日：2021年3月10日
採択日：2021年4月15日

し、PCR反応系・反応条件が標準化されているにもかかわらず、シークエンシングの検体となるPCR産物間でかなりのばらつきが生じうる。そのため、シークエンシング前にはPCR産物の量と精製度をアガロース電気泳動などで確認する必要がある。さらに2本鎖DNA PCR産物のシークエンシングには特異的PCR産物のみが必要であり、PCR反応液中の余剰プライマー、不完全産物や非特異的産物の除去が、増幅用プライマーをシークエンシングプライマーとして用いる際は特に重要である。

そこで非特異的な増幅産物も除去可能で、特異的PCR産物を得るためのPCR反応液の精製として、一般的にアガロースゲル電気泳動による分離後、ゲル切り出し操作による抽出が行われる⁴⁾。しかし、PCR産物の損失が生じ、そのゲル切り出し操作による抽出の精製度と収率は、実験者の経験に依存するところが大きく、時間と手間がかかり、煩雑な手技である。そのため、できる限り検体のロスを抑え、迅速簡便にシークエンシング反応を行うために鋳型としてのPCR産物の調製・クリーンアップを行う必要がある。

さらにPCR産物の精製のための必要操作としては、シークエンシングに影響を与えるPCR反応液中の未反応のデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTPs) とプライマーといった余剰コンポーネントの除去がある。それらの不純物が含まれる中から必要なPCR産物を精製する方法が、考案されている。その方法においてエビアルカリフォスファターゼ (SAP) とエクソヌクレアーゼI (ExoI) 消化は、PCR反応後、反応に使われなかった余剰プライマーとdNTPsや反応液中の一本鎖DNAを除去する行程として汎用されているが、これら酵素は同時に存在しうるプライマーダイマーや非特異的PCR産物の除去はできず、有用性に限界がある。また、DNAシークエンシング前に反応に使われなかったdNTPやプライマーを除去する方法としてのカラム精製ではプライマーダイマーは除去できるが、非特異的増副産物の除去はできない⁵⁾。

たとえ少量であっても非特異的増副産物やプライマー (ダイマー) の混在によりDNAシークエンシングのバックグラウンドが高く出る可能性がある。大量の非特異的増副産物は簡単に

アガロースゲル電気泳動により検出できるが、少量のコンタミネーションはDNAシークエンシング後までわからないことが多い。

今回、高精度のダイレクトシークエンシングを行うために、できる限り検体のロスを抑え、迅速簡便にシークエンシング反応の鋳型としてのPCR産物の調製・クリーンアップが可能な方法を考案したので報告する。

II. 材料と方法

1. 菌株

遺伝子検出には大腸菌CFT073 (ATCC700928) を用いた。

2. 鋳型調製

トリスEDTA緩衝液 0.45 mLに一晩、普通ブイオンで培養した大腸菌培養液 50 μ L を懸濁し、95°C 10分間加温し、12000 rpmで遠心した。その上清を100倍希釈し、1 μ L を鋳型DNAとして20 μ L反応系に用いた。5病原因子遺伝子: aer (aerobactin)、hly (alpha hemolysin)、iha (iron-regulated gene A homologue adhesin)、PAI (pathogenic island marker of CFT073)、sfa/foc (S/FIC fimbriae) (Table 1)⁶⁾ についてPCR反応を行った。

3. PCR増幅反応

PCR増副反応はKOD FX neo (Toyobo) のコンポーネントを用いて行い、メーカー推奨の反応系を用いた。増幅反応は鋳型DNA 1 μ L、0.2 μ mol/L プライマー、0.4 mmol/L dNTPs、2x PCR buffer 10 μ L、そして、KOD FX neo 0.2 Uを含む計20 μ Lの反応系で行った。用いたプライマーは、Table 1の通りである。Thermal Cycler (ASTECH) を用いたPCRの反応条件は、以下の通りである: 2ステップの場合、プレヒーティング 94°C 2分を行った後、変性 98°C 10秒、アニーリング、兼、伸長反応 68°C 1分を30サイクル行い、最後に伸長反応を68°C 7分、3ステップの場合、プレヒーティング 94°C 2分を行った後、変性 98°C 10秒、アニーリング 55-65°C 30秒、伸長反応 68°C 1分を30サイクル行い、最後に伸長反応を68°C 7分行う。PCR産物は2.5% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムプロ

Table 1 Primer pairs used for detection of virulence genes. (Primer sets for PCR)

Gene	Forward (F) or Reverse (R) primer	Sequence	Tm(°C)	GC(%)	PCR product (bp)
PAI	F	ggacatcctgttacagcgcgca	73.3	59.1	930
PAI	R	tcgccaccaatcacagccgaac	75.2	59.1	
aer	F	taccgattgtcatatgcagaccgt	70.7	48.0	602
aer	R	aatatcttcctccagtcggagaag	67.2	48.0	
sfa/foc	F	ctccggagaactgggtgcatcttac	71.3	56.0	410
sfa/foc	R	cggaggagtaattacaacctggca	69.3	48.0	
hly	F	aacaaggataagcaactgttctggct	66.8	44.0	1177
hly	R	accatataagcgggtcattcccgtca	71.3	48.0	
iha	F	ctggcggaggctctgagatca	71.2	61.9	827
iha	R	tccttaagctcccgggctga	73.8	61.9	

マイドにより染色し、UVトランスイルミネーション下に撮影を行った。100 bp ladder 分子量マーカー (GeneDirex) は、1ウエル当たり0.5 μ g/5 μ Lを用いた。アニーリング温度を設定するためのTmの計算は、最近接塩基対法 (nearest neighbor method) により求めた (Table 1)。

シーケンシングに際してPCR産物を精製するために反応に使われなかった余剰プライマーとdNTPsや反応液中の一本鎖DNAの除去を目的として、PCR産物反応液中にSAPとExoI酵素液 (ExoSAP-IT, Thermofisher scientific) 2 μ L/PCR産物 5 μ Lを添加し、37°C 15分処理後、80°C 15分処理 (メーカー推奨条件) を行った。

酵素反応後、PCR産物のシーケンシングは、外部受託により行った (マクロジェンジャパン)。シーケンシング反応は、機器 BioRad DNA Engine Dyad PTC-220 Peltier Thermal Cycler、試薬 ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) を用いて、メーカーが提供するプロトコールに従い、行われた。

Ⅲ. 結果と考察

まず、遺伝子aer、hlyA、iha、PAI、そしてsfa/focに関して、一般的な実験条件としてTm値より低いアニーリング温度 55°Cで反応を行い、電気泳動でPCR産物を確認した。その結果、iha、PAIに関しては非特異的バンド1-2本認められたが、他のaer、hlyA、sfa/focに関しては目的の位置に1バンドのみが観察された (Fig.

1A)。いずれも分子量マーカー (100 bp ladder) との比較からaer、hlyA、iha、PAI、sfa/foc、それぞれ約30、30、50、30、40 μ g/ μ Lの濃度と推測された。それらのPCR産物が、目的遺伝子が増幅されたものかを確認するためにPCR産物の遺伝子配列のシーケンシングを行ったが、確定することはできなかった (Fig. 2A)。現象としては、いずれもmulti peakの状態であり、この現象が生じた原因としては、シーケンシング反応液中のプライマーが、本来シーケンシングプライマーが結合すべき目的のPCR産物の末端 (目的領域) とは異なる部位に反応してしまったことが考えられる。目的領域と異なる部位に反応したプライマーとしては、反応液中の①シーケンシングプライマーが反応している場合と②シーケンシングプライマーではないプライマーが反応している場合が考えられた。②の場合、PCR反応に使われなかった余剰プライマーの残存の可能性はあるが、SAPとExo I消化処理により余剰プライマーは除去されていると考えられるため、①の場合の解決法について考える。シーケンシングプライマーが反応する場合には、目的のPCR産物との反応の場合と、非特異的PCR産物との反応の場合の二通りが考えられる。まず、目的のPCR産物と反応している場合は、目的領域ではない別の領域に結合していることになるが、このような非特異的結合がないようにプライマーのTm値が高く設計されているため、この問題に対してはプライマーを設計し直さないと改善できない。次に非特異的PCR産物と反応している場合は、非特異的PCR産物が産生さ

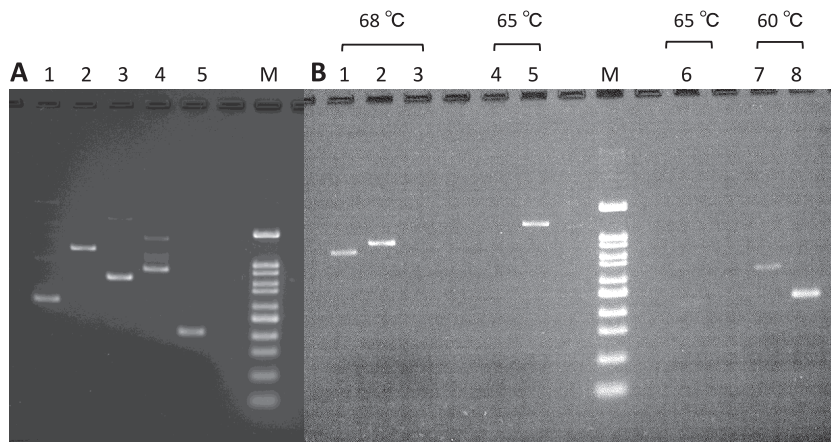


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR products of *Escherichia coli* (*E. coli*) genes. (A) The PCR products of aer, hly, iha, PAI, and sfa/foc genes using 55°C annealing temperature. Lanes: 1, aer; 2, hly; 3, iha; 4, PAI; 5, sfa/foc; M, 100 bp ladder molecular weight marker. (B) The PCR products of aer, hly, iha, PAI, and sfa/foc genes using 68, 65, or 60°C annealing temperature. Lane: 1, iha; 2, PAI; 3, sfa/foc; 4, aer; 5, hly; M, 100 bp ladder molecular weight marker; 6, sfa/foc; 7, aer; 8, sfa/foc.

れないようにアニーリング温度を上げてPCRを行う必要がある。また、たとえ電気泳動上、目視で1バンドであったとしても見えない非特異的バンドが存在しうることも考えられる。そこで、非特異的PCR産物の存在の可能性を減らすためアニーリング温度をTm値 (Table 1) 近くに設定し、PCRを行った。iha、PAI、sfa/focに関してはアニーリング温度が68°C以上のため、2ステップPCR反応を行い、aer、hlyAに関してはアニーリング温度を65°Cにし、3ステップPCR反応を行った。その結果、hlyA、iha、PAIに関しては目的の大きさの1バンドのPCR産物が得られたが、sfa/foc、aerに関してはPCR産物が得られなかった (Fig. 1B 1-5)。PCR産物が得られなかったsfa/foc、aerに関して、1ステップアニーリング温度を下げてそれぞれ65°C、60°CでPCR反応を行った。その結果、aerでは目的の大きさの1バンドのPCR産物が得られたが、sfa/focに関してはPCR産物が得られなかった (Fig. 1B 6,7)。sfa/focに関しては更にアニーリング温度を下げて60°CでPCR反応を行ったところ、目的の大きさの1バンドのPCR産物が得られた (Fig. 1B 8)。いずれも分子量マーカー (100 bp ladder) との比較から、iha、PAI、hlyA、aer、sfa/focそれぞれ約20、30、20、10、40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度

と推測された。PCR産物が得られたhly、iha、PAI、aer、sfa/focのPCR反応液をSAPとExo I消化によって処理後、シーケンシングを行った。その結果、今回は全検体についてバックグラウンドが見られず、前回のようなmulti peakを示さない、良好な波形データが得られた (Fig. 2B)。

今回の一連の実験から、PCR産物のダイレクトシーケンシングによるDNAシーケンスを良好なクオリティにするためには、純度の高いPCR産物を得ることが必要であることが確認された。PCR産物の精製にはアガロースゲルによるPCR産物の分離、切り出しが望ましいのかもしれないが、こうした精製を行わない場合、PCR条件の最適化がDNAシーケンシングの成功に必須、かつ、重要な条件となる。もしPCR条件の最適化を行わなければ、PCR副産物などの影響により良好な解析結果が得られない可能性がある。本研究では、PCR産物のダイレクトシーケンシングにおいて良好な波形のクロマトグラムを得るためには、できる限りTm値に近いアニーリング温度を用いたPCR反応を行うことが必要で、それによって得られた特異性の高いPCR産物の有用性について明らかにした。

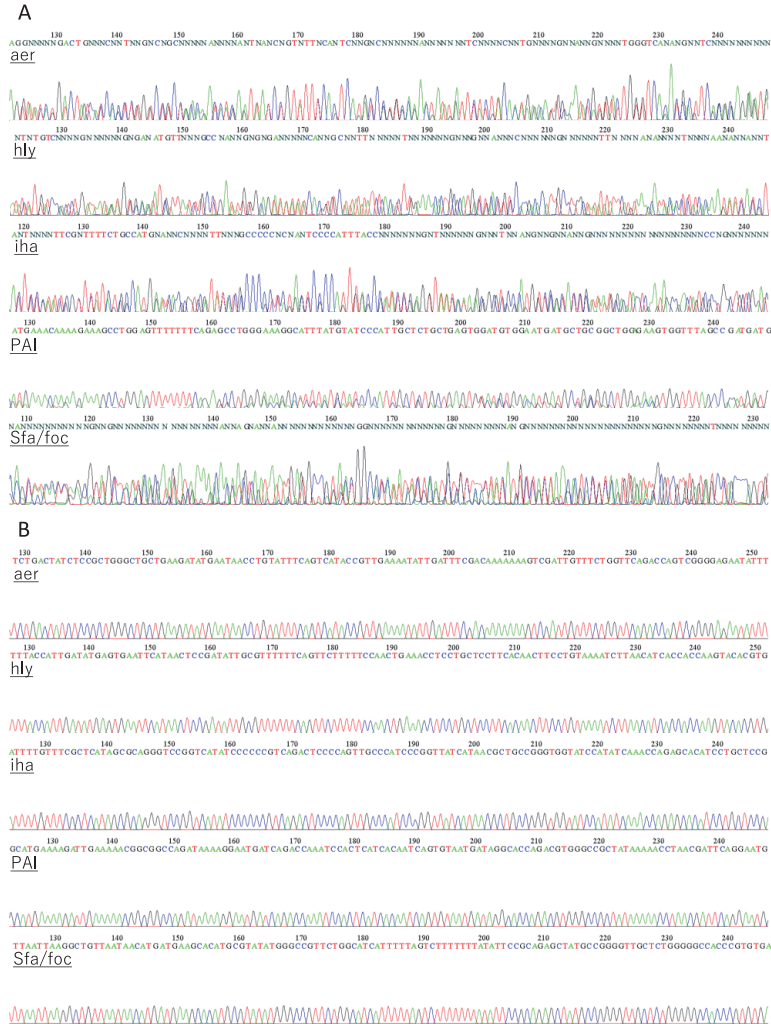


Fig. 2 Quality of sequencing chromatograms. The chromatograms were obtained by direct sequencing of PCR product for each gene derived from *E. coli* CFT073. The genes of PCR product were aer, hly, iha, PAI, and sfa/foc. The annealing temperature of PCR reaction was (A) 55 °C, and (B) 60-68 °C.

IV. 結語

PCR産物のDNAダイレクトシーケンシングを行う際の有用なPCR産物の調製方法について検討した。本研究で解析した方法は、検体のロスを抑え、迅速簡便にシーケンシング反応の鑄型を調製できる方法であると考えられる。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

文献

- 1) Saiki RK, Scharf S, Faloona FA, Mullis KB, Horn CT, Erlich HA and Arnheim N: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354, 1985.
- 2) Ishino S and Ishino Y: DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field. *Front Microbiol*, Aug 29; 5: 465, 2014.
- 3) Erlich HA, Gelfand D and Sninsky JJ: Recent ad-

- vances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252: 1643-1651, 1991.
- 4) Srivastava AK, Montanaro V, Kere J, Srivastava AK, et al: Simplified template preparation and improved direct sequencing using Taq polymerase: *PCR Methods Appl*, May; 1(4): 255-256, 1992.
 - 5) Leonard JT, Grace MB, Buzard GS, Mullen MJ and Barbagallo CB: Preparation of PCR products for DNA sequencing. *Biotechniques*, Feb; 24(2): 314-317, 1998.
 - 6) Takahashi A, Kanamaru S, Kurazono H, Kunishima Y, Tsukamoto T, Ogawa O, Yamamoto S, Takahashi A, et al: *Escherichia coli* isolates associated with uncomplicated and complicated cystitis and asymptomatic bacteriuria possess similar phylogenies, virulence genes, and O-serogroup profiles. *J Clin Microbiol*, Dec; 44(12): 4589-4592, 2006.