

ペプチド核酸（PNA）を利用した特定の配列を持つDNAの濃縮

PNAはDNAと類似の構造を持つ非天然の化合物（図1）で、相補的なDNA配列と強固な二本鎖を形成します。そのため、特定のDNA配列と二本鎖を形成するPNAを作製しPCR反応に添加すると、そのDNA増幅を阻害することができます。PNAは1塩基の違いを厳密に識別できるので、希少な変異を含むDNAを特異的に増幅することも可能です。

本実験では、野生型-変異型EGFP遺伝子混合物を鋳型DNAとしてPNA存在下でPCRを行い、PNAの添加による選択的なDNA増幅を評価しました。

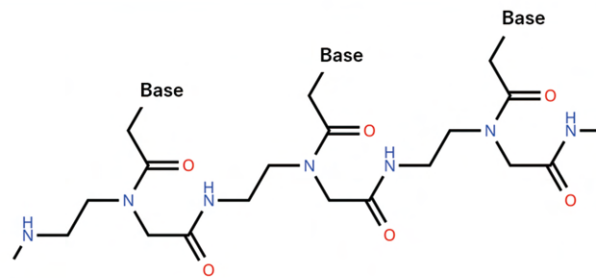


図1 PNAの構造

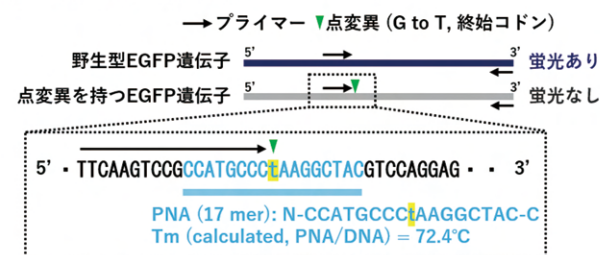
方法

EGFP及びその変異型遺伝子（GAA→TAA、Glu90Ter変異）を含むプラスミドを作製し、PCRの鋳型DNAとしました。PNAは変異部位を中心として17 merとなる様に設計しました（図2-1）。

野生型遺伝子に対して変異型遺伝子を100倍量添加した混合液（野生型遺伝子1%）を鋳型DNA（0.5 ng/μL）として、プライマー（0.25 μM）及びPNA（1 μM）を用いてPCRを行いました（図2-2）。

PCRの条件：94℃5分→98℃10秒-55℃30秒×25
PCR反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離・精製し、PCR増幅断片をpEFaベクター（弊社タンパク質発現ベクター）にクローニングしました。増幅断片をクローニングしたプラスミドを調製後、大腸菌BL21(DE3)の形質転換を行い、IPTGを含むLB寒天培地で培養を行うことによりEGFPの発現を観察しました。

1. 鋳型DNAとPNAの設計



2. 遺伝子の特異的な増幅

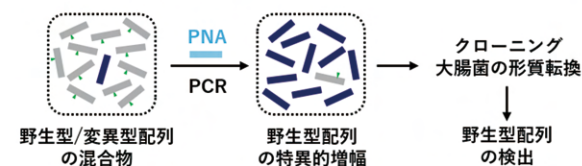


図2 実験方法

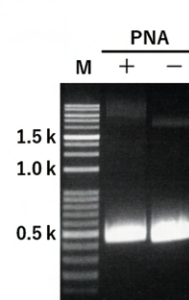
結果

本実験では、1塩基の変異を含むEGFP遺伝子の増幅を選択的に阻害するため、17 merのPNAを設計しPCRに用いました。PCRの結果、PNAの添加条件でも遺伝子断片の増幅が確認されました（図3-1）。PNAの結合しない野生型遺伝子の選択的な増幅が示唆されます。

サンガーシーケンス及びEGFPの発現を指標として、鋳型DNAには1%しか含まれない野生型遺伝子の増幅を評価しました。その結果、PNA添加条件では野生型配列を示す波形が見られ、EGFPの発現も確認できました（図3-2）。これらの結果は、PNAの添加により野生型遺伝子が選択的に増幅されたことを示します。

このように、PNAは特定の配列を持つ遺伝子の濃縮にもご利用いただけます。

1. PCRの結果



2. クローニングされた配列の確認

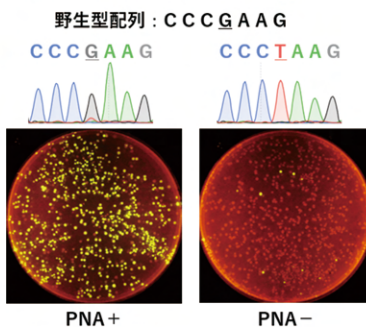


図3 PNAによる野生型遺伝子の選択的な増幅