

便宜的なプライマー (arbitrary primer) を 用いた PCR 法によるゲノム分析の基礎的な検討

長野 功 高橋優三

(岐阜大学医学部寄生虫学講座, 〒500 岐阜市司町 40)

(掲載決定:平成7年5月2日)

要 約

ゲノム DNA の多型性を寄生虫種の同定・分類の基準のひとつとして用いる基礎として, AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) 法を検討した。寄生性蠕虫 (*Taenia saginata*, *Fasciola* sp, *Tricinelia*) のゲノム DNA を鋳型として AP-PCR を行った。使用したプライマーと検体 DNA の種類に応じて多彩なバンド・パターンが得られた。本法による PCR 産物のバンド・パターンの再現性は, 同じ PCR 試薬, 同じ PCR 機を用いた時に確認された。さらに, PCR 機や反応容器, DNA 変性条件もバンド・パターンに影響する可能性がある事が指摘された。以上の留意点を考慮すれば, AP-PCR によって示されるバンド・パターンは, 蠕虫種のゲノムを鋭敏に分析できる技術として使用可能と思われた。

Key words: genome; DNA; polymorphism; helminth; AP-PCR; RAPD.

緒 言

最近の遺伝子工学における長足の進歩はゲノム分析を日常の技術とし, 法医学の分野では遺伝子指紋の概念が個人認識や親子鑑定に応用されているが, 病原体に関してもその遺伝子指紋が種や株の同定・分類の基準として用いる試みがなされている。古典的には, 寄生虫の同定・分類の基準として用いられているのは, 発育史, 形態, 大きさ, 抗原型, アイソザイム, 等であり, すでに先人による膨大な知識の集積があるので, ゲノム分析はこれらの基準を補完するものと位置づけられる。

現在までのところ, ゲノム分析に利用されている遺伝子関連の技術は, 相同の遺伝子の塩基配列の差, 制限酵素によるゲノム切断パターンの差, 反復配列遺伝子の特徴などであるが, 近年 Williams ら (1990) と Welsh ら (1990) により同時に報告された AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) 法は, その簡便さ故に病原体 (細菌や寄生虫など) のゲノム分析に急速に応用が始まっている。AP-PCR 法とは, 便宜的に決めたプライマー (arbitrary primer) を用いてゲノム DNA を PCR で増幅させ, そのバンド・パターンでゲノムを分析する技術であり, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) とも呼ばれている。Williams らの発表した方法では, 10塩基 (bp) 程度

の短いプライマーを用い, 低いアニーリング温度で PCR する。Welsh らの発表した方法では, 20 bp 程度のプライマーを用い, 最初の 2 回のサイクルを低い stringency でアニーリングし, 3 回目以後のサイクルは通常の stringency のアニーリングで PCR を行う。いずれも手元にあるプライマーを流用するもので, 塩基配列に関する情報が無くても, 鋳型 DNA の一部を増幅できる。すでに寄生虫の同定・分類の基準にも応用が始まり, 再現性に富み, 有用であるとされているが, 原理的に不明な点もあり (Muralidharan and Wakeland, 1993), 今後さらに検証する必要があるものと思われる。本論文では, Williams らの方法を基礎に, 我々が 10 bp のプライマーの AP-PCR 法を寄生性蠕虫のゲノム分析に応用した結果について述べる。

材料と方法

1) PCR 用試薬について

Taq DNA polymerase は, TaKaRa 社 (京都市) とニッポンジーン社 (東京都) から購入し, 最終濃度を 1 U/50 μ l として使用した。dNTP (最終濃度は 0.2 mM) と反応用緩衝液 (100 mM Tris-HCl 緩衝液, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin) は TaKaRa 社より購入した。PCR の反応液の量は 50 μ l とした。

便宜的に決めた 6 種類の短いプライマー (10 bp) のコード名と塩基配列は, 以下の如くである。GC100;

5'-CGGCCCCGGC-3', GC90; 5'-CGGCCCCGGT-3', GC80; 5'-CGGCCCCTGT-3', GC70; 5'-CGGCCACTGT-3', GC60; 5'-CGGTCACTGT-3', GC50C; 5'-TCACGATGCA-3'。濃度を25 μ M, 10 μ M, 5 μ M と2.5 μ M に調製し, PCR 反応液に対して1/10量を加えた。各PCR反応には1種類のプライマーを用いた。これが5'側DNA鎖と3'側DNA鎖の両方にアニーリングした場合, その間のDNA断片が増幅される事になる。

2) PCR 機

PCRの機器として, PCRシステム9600 (Perkin Elmer社, Norwalk, USA)とZYMOREACTOR II (ATTO社, 東京)を使用した。尚, 機種によっては, アルミブロックの位置によって温度が異なっている事も指摘されている。そこで本研究では, 同一試料をアルミブロックの中心や周辺に配置してAP-PCRを行い, バンド・パターンに差がない事をあらかじめ確認した。

PCRシステム9600については専用のチューブ(0.2 ml)を使用した。ZYMOREACTOR IIについては推奨のチューブ(微量遠心試料チューブ, ベリタス社が販売, 東京)を使用し, アルミブロックにチューブを整列させた後に, 上からスポンジで適当な圧力で押さえて, チューブとアルミブロックの完全密着につとめた。

3) PCRの反応条件

DNA変性の条件は, 温度が92~94 $^{\circ}$ C, 時間が30~60秒であった。アニーリングの温度は32 $^{\circ}$ C, 36 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ Cの3種類を検定した。いずれも時間は1分を設定した。結果と考察の項で後述するが, 本研究では36 $^{\circ}$ C, 1分を標準条件として採用した。エクステンションの条件は, 72 $^{\circ}$ C, 時間2分とした。サイクルは30回と45回を検定した。

4) 検体遺伝子の調製

使用した寄生虫の種類は無鉤条虫 (*Taenia saginata*), 肝蛭 (*Fasciola* sp.), 8種類の旋毛虫の株 (Polish strain, Yamagata strain, Polar strain, USA strain, Thai strain, Iwasaki strain, Changchun strain, *Tricinella pseudospiralis*) である。虫体を乳鉢にて凍結粉碎後に, 虫体1gにつきSE緩衝液(0.5% N-Lauroyl Sarcosine Natrium と20 mM EDTAを加えた20 mMのTris-HCl緩衝液 pH 7.4) 10 mlを加え, 50 μ g/mlのProtease K (Merck社, Darmstadt, ドイツ)で36 $^{\circ}$ Cで3時間以上消化した。その後, TE飽和フェノール(和光純薬, 京都市), クロロフォルム(クロロフォルムとイソアミルアルコールの24対1混合液)で処理し, -30 $^{\circ}$ Cでエタノール沈澱を3時間以上行った。遠心にて沈澱したDNAを乾燥させ, TEバッファー(1 mMのEDTAを加えた10 mM Tris-HCl緩衝液 pH 7.4)に溶解し, 0.2 ng/ μ l また

は1 ng/ μ l (最終濃度)でPCR反応を行った。鋳型DNAの濃度は, Fig. 1に示す如くバンド・パターンに大差をもたらさない(1と2, 3と4の比較), 本研究では0.2 ng/ μ lを標準条件として採用した。

cDNAの一例として, ヒトの脳のcDNA(クローンテック社, Palo Alto, USA)を鋳型DNAに用いてAP-PCRを行った。

5) 電気泳動

PCR産物を1.5%アガロースで泳動し, エチジウムブロマイド染色によるバンド・パターンを比較した。分子量マーカーにはpGEM DNAマーカー(Promega社, Norwalk, USA)を用いた。主なDNAバンドは2,645 bp, 1,605 bp, 1,198 bp, 676 bp, 517 bp, 469 bpである。

結果と考察

PCRのサイクルが30回の場合は, 45回に比してバンドが不明瞭の場合が多かったので (Fig. 2で, 1と2, 3と4, 5と6の比較), 本研究では45回を標準とした。プライマーの濃度を, 0.25 μ M~2.5 μ M (最終濃度)の範囲で検討したところ, 濃度が低くなるに従いバンドの

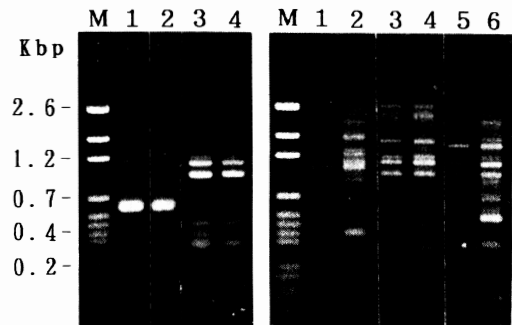


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 1 AP-PCR profile of *Taenia saginata* DNA with variation of template DNA concentration (1 ng/ μ l in lanes 1 and 3, and 0.2 ng/ μ l in lanes 2 and 4) and with variation of primer (GC60 in lanes 1 and 2, and GC80 in lanes 3 and 4). No essential difference was observed regardless of the concentration. Used *Taq* polymerase was from Nippon Gene Co. Ltd. M: the molecular marker.

Fig. 2 AP-PCR profile of *Taenia saginata* DNA with variation of cycle numbers (30 cycles in lanes 1, 3 and 5; 45 cycles in lanes 2, 4 and 6). PCR with 45 cycles resulted in more numbers of bands. Used primers were GC70 in lanes 1 and 2, GC80 in lanes 3 and 4, and GC90 in lanes 5 and 6. Used *Taq* polymerase was from TaKaRa Co. Ltd.

数が減少したが、バンド・パターンに大差をもたらさなかった (Fig. 4)。従って本研究では0.5 μM を標準濃度として使用した。

アニーリングの温度はPCRのstringencyに影響する最大要因として知られている。一般にPCRの反応に於いて、アニーリング温度を下降させると、プライマーのミスマッチが多くなり、非特異的なバンドが出現する。本研究で、この温度を32°C、36°C、40°Cと上昇させるに従い、バンドの数が減少した (Fig. 5で、Lane 1, 2, 3の順)。これは、アニーリング32°CのPCRで生じたバンドの一部は、プライマーが完全に一致して生じたものではなく、ミスマッチで増幅したものも含まれている事を示唆している。本研究では36°Cを標準とした。

ゲノムDNAとプライマーの組み合わせにより、PCR産物の電気泳動結果のバンドはその数、その濃度、DNAの分子量が異なるパターンを示した (Fig. 3)。このようなバンド・パターンの多彩さがゲノムDNAの多型性 (RAPD) を反映するものと考えられ、種や株の同定・分類の基準として提案されている

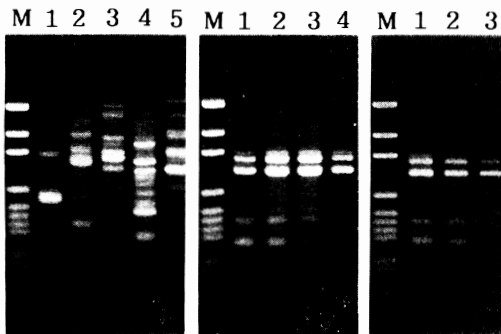


Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 3 AP-PCR profile of *Taenia saginata* DNA (Lanes 1~5) using 5 different kinds of primers, GC60, GC70, GC80, GC90 and GC100, respectively. Note a variety of banding pattern depending on the primer used. Used *Taq* polymerase was from TaKaRa Co. Ltd.

Fig. 4 AP-PCR profile of *Taenia saginata* DNA (Lanes 1~4) using 4 different concentration (2.5 μM , 1.0 μM , 0.5 μM and 0.25 μM , respectively) of primer (GC80). No substantial difference was noted in major bands regardless of the concentration. Used *Taq* polymerase was from Nippon Gene Co. Ltd.

Fig. 5 AP-PCR profile of *Taenia saginata* DNA (Lanes 1~3) with variation of annealing temperature (32°C, 36°C and 40°C, respectively). Note fewer bands in PCR products with higher annealing temperature. Used *Taq* polymerase was from Nippon Gene Co. Ltd.

(Williams *et al.*, 1990)。旋毛虫の場合、従来の基準やアイソザイムの型では異同の判定が困難な株もあるが (Fukumoto *et al.*, 1988; Fukumoto *et al.*, 1990)、そのような株間についてもゲノムDNAの多型性が本法によって検出する事ができる (Takahashi *et al.*, 1995)。

増幅されたDNA断片の分子量は約300 bpから約2,600 bpであった (Fig. 2)。バンドの濃度は増幅されたDNAの量を反映するが、濃いバンド (major band) から、非常に薄いバンド (faint band) まで、様々であった (Fig. 1)。major bandが存在しない場合もあれば、単数または複数個存在する場合もあった。faint bandも複数個存在するケースが多いが、ときにはfaint bandの判別が困難であった (Fig. 7)。

ヒトの脳のcDNAを鋳型としてAP-PCRをした場合にもバンドが出現したので (Fig. 8)、AP-PCRで増幅されるDNAのなかには、機能遺伝子も含まれていると推測された。尚、複数の細胞の発現遺伝子の差をcDNAのAP-PCRによって比較する方法は、differential display (Liang *et al.*, 1992) として繁用され始めている。

プライマーの種類は、PCRの結果に大きく影響する因子の一つであった。Fig. 3で、Lane 1と2はそれぞ

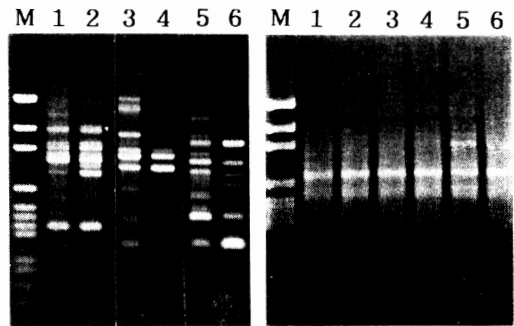


Fig. 6

Fig. 7

Fig. 6 AP-PCR profile of *Taenia saginata* DNA with variation of *Taq* polymerase. Compare banding pattern between lanes 1 and 2, lanes 3 and 4, and lanes 5 and 6. Note some major bands were missing in lanes 4 and 6. Used *Taq* polymerase was from TaKaRa Co. Ltd. in lanes 1, 3 and 5, and from Nippon Gene Co. Ltd. in lanes 2, 4 and 6.

Fig. 7 AP-PCR profile of DNA from 6 different sources of *Fasciola* sp. using the same primer (GC50C). No essential difference was noted among samples except that the lane 5 exhibited a minor extra band. Used *Taq* polymerase was from TaKaRa Co. Ltd.

れプライマー GC60と GC70によるものであるが、バンドの数とパターンに大きな差がある。GC60と GC70は1塩基が異なるにすぎない。これは、本法の鋭敏さを示す。Lane 2と3, 3と4, 4と5についても同様に1塩基が異なるプライマーによる差である。

同じ寄生虫種ならば個体を変えても AP-PCR の結果に差がない事は、本法の信頼性の証明のために必要である。これを確認するため、同一種と判定された複数の寄生虫個体よりゲノム DNA を得、同じ条件で PCR を行った。同種の寄生虫は全く同じバンド・パターンを示す場合が多く、この点で AP-PCR によるゲノム分析の信頼性が確認できた (Fig. 7)。しかし稀ながらも、バンド・パターンが微妙に異なる場合がある。Fig. 7 に示す如く Lane 1 ~ 4 と 6 の検体は一本のバンド (約800 bp) を共有するが、Lane 5 の検体だけは、約1,200 bp のバンドを持つ。これは実験の artifact によるものか、種の中の微妙な変異によるものか不明である。

前者の場合として二つの可能性が考えられる。一つは検体の死後からゲノム DNA 分離開始までの過程で DNA 分解酵素が働いた事であろう。二番目の可能性は、寄生虫の宿主や共存細菌の DNA の混入である。

検体の個体差が、もし種の中の変異によるものならば、AP-PCR 法は従来の基準では分類しきれない僅少な差をも検知できる鋭敏な方法という事を意味し、まさに遺伝子指紋 (DNA fingerprint) としての価値があり、寄生虫の感染源の同定などにも応用可能であろう。

Taq polymerase による AP-PCR の結果の差を検

定した。PCR の他の条件を一定にして、TaKaRa 社またはニッポンジーン社の Taq polymerase を用いた。その結果、Fig. 6 (Lane 1 と 2, 3 と 4, 5 と 6 の比較) に示すように、同じバンドが増幅される場合が多いが、時にはバンドが欠如する場合があった。現在の所、なぜバンド・パターンに差が出るのか不明であるが、ゲノムの比較のためには同じ Taq polymerase を使用する必要があると判断される。

PCR 機の機種によるバンド・パターンの相違を検討した。同時に調製された同一の試料を機種を変えて PCR を行ってみると、機種によりバンド・パターンが相違する場合があった (Fig. 9 の Lane 1 ~ 8 が PCR システム 9600, Fig. 9 の Lane 9 ~ 16 が ZYMOREACTOR II)。

このような差異は AP-PCR 法の微妙さを認識させるが、その有用性を揺るがすものではない。なぜなら、PCR システム9600を使用して得られた旋毛虫の株の間のゲノムの類似関係は、ZYMOREACTOR II を用いて得られた旋毛虫の株の間のそれとほぼ同じであり、どちらの機種を用いてもゲノムの類似関係に関しては同様の結論が得られる。同一の試薬、機種を用いてもバンド・パターンが異なる事例についても、ゲノムの類似関係は同じである。

今回用いた AP-PCR 法では、10 bp の primer を用いて低いアニーリング温度で PCR を行い、その産物を電気泳動して、バンド・パターンを比較した。同一種か否かの判定には数個のプライマーで AP-PCR を行い、

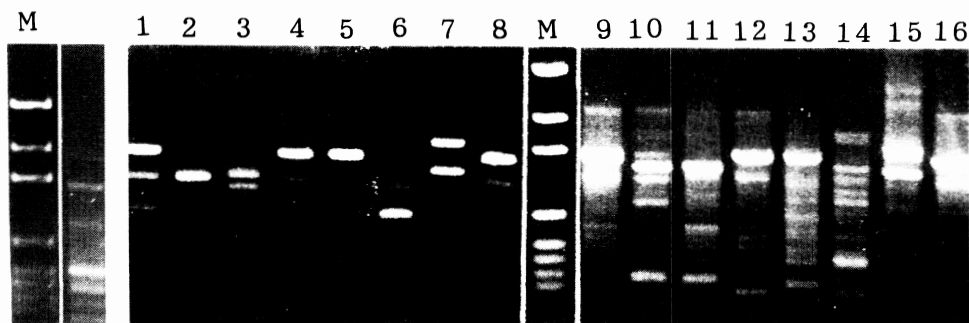


Fig. 8 Fig. 9

Fig. 8 AP-PCR profile of cDNA from a human brain with primer GC50C. Note RAPD with only faint bands. Used Taq polymerase was from TaKaRa Co. Ltd.

Fig. 9 Lanes 1~8 show AP-PCR profile of DNA from 8 kinds of *Trichinella* amplified by PCR System 9600, and lanes 9~16 show those by ZYMOREACTOR II. Resemblance of two banding patterns among each *Trichinella* obtained by different PCR machines was compared. DNA sample was Polish strain in lanes 1 and 9, Yamagata strain in lanes 2 and 10, Polar strain in lane 3 and 11, USA strain in lanes 4 and 12, Thai strain in lanes 5 and 13, Iwasaki strain in lanes 6 and 14, *Trichinella pseudospiralis* in lanes 7 and 15, and Changchun strain in lanes 8 and 16.

完全一致があれば結論を出せると思われる。原理的には、近縁種ほどゲノムを共有している事が多いので、共有するバンドの数も多くなるものと考えられる。ただし、一つのプライマーで増幅されるのは量的にみてもゲノムの一部であり、しかも増幅される DNA の分子量は高々 3,000 bp 程度以下のものであるので、近縁関係を定量的に論じるには、可及的に多くのプライマーで PCR を行い、共有するバンドを統計的に考察する必要がある。

以上、10 bp の primer による AP-PCR 法を蠕虫 DNA のゲノム分析に応用する事を目的として、基本的な事項について検討を行った。結論として、AP-PCR 法は鋭敏、簡潔で、分類への応用が可能であるが、バンド・パターンは微妙な実験条件にも影響されるので、使用機材にも十分な注意を払う必要があり、複数のゲノタイプと比較には、同じ PCR 試薬を用いて同時に PCR をすべきである事が示唆された。

文 献

- 1) Fukumoto, S., Takechi, M., Kamo, H. and Yamaguchi, T. (1987): Comparative studies on soluble protein profiles and isozyme patterns of seven *Trichinella* isolates. *Parasitol. Res.*, 73, 352-357.
- 2) Fukumoto, S., Nagai, D., Yazaki, S., Kamo, H. and Yamaguchi, T. (1988): The molecular phylogenetic tree of the genus *Trichinella* constructed from isozyme patterns. *Parasitol. Res.*, 74, 574-580.
- 3) Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R. and Pardee, A. B. (1992): Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, 52, 6966-6968.
- 4) Muralidharan, K. and Wakeland, E. K. (1993): Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechniques*, 14, 362-364.
- 5) Takahashi, Y., Nagano, I., Wu, Z, Fukumoto, S., Saito, S. and Yamaguchi, T. (1995): Further justification of arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for use of genomic analysis of *Trichinella*. *Jpn. J. Parasitol*, 44, 133-137.
- 6) Welsh, J. and McClelland, M (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 7213-7218.
- 7) Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.

Abstract

A PRELIMINARY STUDY OF ARBITRARILY PRIMED
POLYMERASE CHAIN REACTION TO ANALYSE GENOMIC DNA

ISAO NAGANO AND YUZO TAKAHASHI

*Department of Parasitology, Gifu University School of Medicine,
Tsukasa 40, Gifu, 500, Japan*

We have adapted AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) method to analyse genomic DNA of helminth. In this contribution we describe technical details and discuss about possibilities and limitations of this method. The recommended condition for AP-PCR was as follows. Primer; 10 base pair oligonucleotide, denature condition; 92~94°C for 40~60 seconds, annealing condition; 36°C for 1 minute, extension condition, 75°C for 2 minutes, cycles; 45, final concentration of primer; 0.5 μ M, final concentration of template; 0.2 ng/ μ l.

Gel electrophoresis of PCR products resulted in a characteristic band pattern that differs in the number and intensity of band, and molecular weight of DNA. Major factors that affected the banding pattern included template DNA and primers, and minor factors included annealing temperature, concentration of primers or template DNA, and the number of PCR cycle. Although the band pattern was reproducible when the same PCR reagent and machine were used, minor polymorphism among samples from the same species was occasionally observed. This may simply due to technical problems in DNA preparation, or due to intraspecies polymorphism of DNA. Thus we have confirmed advantages of AP-PCR in analysis of genomic DNA of helminth, which included straightforwardness, reproducibility and high sensitivity.