

総 説

P C R法の基本と実際

根 本 孝 幸

岩手医大歯学部口腔生化学講座

(主任：太田稔教授)

(受付：1994年2月14日)

(受理：1994年3月11日)

1. はじめに

1993年度のノーベル化学賞はPolymerase chain reaction (PCR) 技術の開発者であるキャリー B. マリス博士と遺伝子の特定位置への点突然変異の導入法を開発したマイケル スミス博士が分け合った。ともに遺伝子解析に関する技術である。PCR法とは試験管内でDNAの特定の領域を100万倍にも増幅する画期的な手法である。PCR法による遺伝子のクローニングや遺伝子異常の解析などが非常に容易かつ迅速に行えるようになった。ここでは、PCR法を理解する上に必要な基本的な遺伝子操作の原理について解説し、ついでPCR法の様々な適用法について述べる。PCRを理解するための基礎となる事項については注を設けて説明した。本総説を読んで興味をもち、さらに勉強したいという方や、具体的な手法を知りたいという方があれば一応の目的は達したと考えている。さらに詳しく実際のプロトコルを知りたい方は文献の総説や成書を参照されたい¹⁻³⁾。

2. 分子生物学

PCR法の話の前に分子生物学について一言述べておく。分子生物学とは大筋において遺伝

子の作用、発現機構を研究する学問である。また、遺伝子操作法を駆使して研究する学問という意味合いもある。後者の側面を強調して、遺伝子操作、遺伝子工学という用語が使われることもある。分子生物学的手法の画期的な点は、目的分子の増幅、再生産にある。例えば、タンパク質化学ではヘモグロビンというタンパク質のアミノ酸配列を決定するために血液からヘモグロビンだけを集めて分析する。精製と分析、失敗を重ねるうちに試料は底をついてくる。すべてのアミノ酸配列が決定する前に試料がなくなることもありうる。その場合には、もう一度血液からヘモグロビンを精製し直すしかない。

一方、分子生物学ではタンパク質のアミノ酸配列を決定する場合にはそのアミノ酸配列情報をコードする遺伝子から攻める。赤血球ではヘモグロビン量に対応してそのmRNAも大量に発現しているので、その遺伝子を釣り上げるのも比較的容易であった(注1)。しかし微量に発

(注1) 遺伝子クローニングという。組織や培養細胞から抽出したmRNAから逆転写酵素によってDNA (complementary DNA, cDNA, この場合は多数の種類)のcDNAからなるのでcDNAライブラリーという)を作成し、その中から単一のcDNAを選択する場合をcDNAクローニング、ゲノムDNAライブラリーから選択する場合をゲノミッククローニング (genomic cloning) という。

Key words : PCR, Taq polymerase, androgen receptor, submandibular gland, Molecular basis and application of polymerase chain reaction.
Takayuki NEMOTO

(Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry) Morioka, 020 Japan

現している遺伝子となるとこの方法もやはり大変であり、目的の遺伝子を釣り上げるまではそれなりの工夫や努力がいる。しかし、いったんクローン化された DNA は、DNA のもつ複製機能を利用していくらでも増やすことができる。

さらに、目的遺伝子の研究が進み、臨床応用になったとしよう。例えば成長ホルモンを投薬する場合には大量の精製品が必要となるが、その際には、成長ホルモンの遺伝子から大腸菌などの発現系により大量のタンパク質を得ることができる。

3. PCR法の原理

PCR 法とは簡単に言えば DNA ポリメラーゼによる DNA の連続増幅反応である。PCR 法によってきわめて微量の DNA の増幅が可能になった。原理的には遺伝子一組だけをもつ精子一個からでも目的とする遺伝子を増幅できる。また、固定した組織標本、絶滅種や、古代人の骨の遺伝子解析など、これまで微量すぎて検出不可能だった試料 DNA が PCR 法により解析可能となった (注 2)。

PCR 法の原理を理解するために知っておきたい基本的な事柄について述べる。DNA や RNA のポリヌクレオチドは 5'→3'リン酸ジエステル結合により重合している (Fig.1)。鎖の片方の末端は 5'リン酸基を、もう一端は遊離の 3'水酸基をもつ。向かい合う相補鎖は逆方向を向いている。DNA ポリメラーゼによるポリヌクレオチド鎖の伸長は 5'→3'の方向へのみ進む (Fig.2)。

PCR 法では反応に DNA ポリメラーゼを用いる。この酵素は一本鎖 DNA を鋳型 (テンプレート) としてその相補鎖を 5'→3'方向に合成するのだが、反応はテンプレート DNA とデオキシヌクレオチドだけでは起こらず、必ず二本鎖を形成した DNA 部分が必要である (注 3)。

(注 2) 映画ジュラシックパークでは、コハクに閉じこめられたカの標本から、そのカが血を吸った恐竜の遺伝子を PCR で増幅するプロットとなっている。

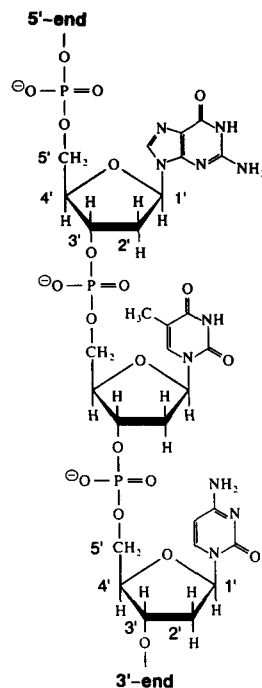


Fig.1 Structure of DNA

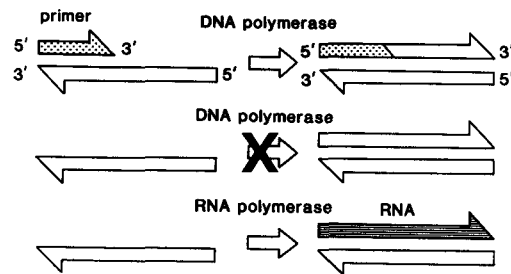


Fig.2 Substrate specificities of DNA and RNA polymerases

(注 3) ところが細胞の DNA の複製開始時には PCR 法の場合のようなプライマーは存在しない。実は生体内での複製の際には、最初に RNA ポリメラーゼ (RNA ポリメラーゼはプライマーを必要としない、Fig.2 参照) が DNA の 1 本鎖部分をテンプレートにして相補的な RNA 断片を合成し、引き続いて DNA ポリメラーゼが作用して 3' 末端に DNA を合成してゆく。

このDNAポリメラーゼの特性さえ理解すれば、PCRの原理も理解しやすい。すなわち、目的のDNA領域をはさんで2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを結合させ、DNAポリメラーゼ反応でプライマーより下流のDNAを増幅する (Fig. 3)。各サイクルで合成されたDNAは、次のサイクルでは新たなポリメラーゼ反応のテンプレート (鋳型) となるので、結果的にプライマーで挟まれた部分だけが選択的に増幅される。反応の成否は電気泳動により即座に確認することができる。各サイクルでDNA量は2倍に増加するので原理的にはn回のサイクルで 2^n 倍 (注4) 増加する。

しかしながら初期のPCR法では大腸菌由来のDNAポリメラーゼIを使用するために、DNAを一本鎖にする変性処理 (90~95°C) によって酵素自身も失活してしまった⁴⁾。そのため各サイクルごとにDNAポリメラーゼIを加得る必要があり、大変に骨の折れる作業であった。この問題を克服するため1988年に高度耐熱性細菌 *Thermus aquaticus* のDNAポリメラーゼであるTaqポリメラーゼが導入された⁵⁾。これによりPCRの反応サイクルを温度のコントロールのみで行えるようになり、飛躍的に容易になった。

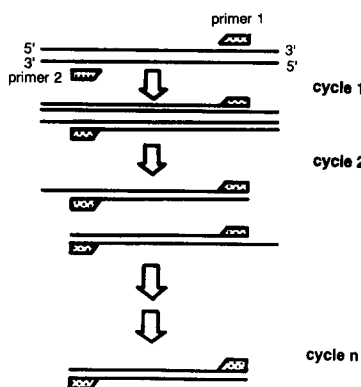


Fig. 3 Mechanism of PCR

(注4) 例えば30サイクルでは $2^{30} = 10^9$ 倍であるが、実際は基質のdNTPがある程度減少すると反応が進まなくなる。また各サイクルで完全に2倍の増幅がなされるわけではない。それでも通常最終的には数十万~百万倍の増幅が可能である。

4. PCR法の問題点

PCR法にもいくつかの問題点があり、その限界もある。PCRをおこなう場合にはこれらの点を考慮して実験を計画しなければならない。以下に、主なものをあげる。

1) PCR法の感度の鋭敏さゆえにわずかなDNAの混入 (例えば一分子のDNA) も敏感に捕らえ、増幅してしまう。DNAは非常に安定な分子であるだけに一度目的DNAで汚染した器具や実験台を使用するとすべての試料が偽陽性になりかねない。

2) 感度がよすぎるために逆に定量性にかける。しかしこの点についてはPCRのサイクル数を減らしてサザンプロットをおこなったり、反応液に修飾ヌクレオチド (ビオチン標識, ジョキシングニン標識, アイソトープ標識) を加えたりするなどの工夫により通常解決できる。

3) DNAポリメラーゼによる合成の際にわずかな確率であるが、正しくない塩基が取り込まれてしまう (注5)。平均440塩基に一回の割合でエラーが起こるとの報告もあるが、至適条件では10,000塩基に一回ともいわれる。いずれにしても、PCRで増幅されたDNAをクローニングして塩基配列を決定する場合には変異がはいっている可能性がある。しかしながらPCRクローニングしたDNAの複数の塩基配列を決定することで間違いを避けることができる。またたとえエラーがあったとしても、それぞれの塩基について見れば変異したDNAは全体のうちごく一部にすぎない。そこで、増幅したDNAをクローニングせずに、直接配列決定すれば問題はない。

(注5) このような複製のエラーは生体内での複製時にも起こりうる。たとえわずかな確率でも遺伝子の長さから考えるとどこかに変異の生ずる可能性は無視できず、これは生命の連続性をおびやかす。大腸菌のDNAの複製を担当するDNAポリメラーゼIIIホロ酵素は5'→3'ポリメラーゼ活性以外に3'→5'ヌクレアーゼ活性をもち、万一誤った塩基が挿入された場合にはヌクレアーゼ活性によりすみやかに分解され、続いて再度塩基が導入される。5'→3'ポリメラーゼ、3'→5'エクソヌクレアーゼ反応のエラー率はそれぞれ 10^{-4} 、 10^{-3} であり、そのため全体のエラー率は 10^{-7} となる。その結果DNAの複製は生体内でもっとも間違いなく進む反応となっている。大腸菌は 4×10^6 塩基対のDNAをもつので一度の複製で変異する確率は1以下である。さらに生物はDNAの修復機能をもつので複製後にも変異塩基の排除機構が働く。

4) PCR で増幅できる塩基の長さには限度があり、一般に 2-3 kb 程度とされる。条件を選べば 10 kb でも増幅できるという報告もある⁶⁾が、いずれにしても増幅できる長さには限界がある。実験によっては目的の遺伝子内の任意の位置にプライマーの位置を設定できるので、その場合には数百塩基程度にすることが妥当であろう。

5) いかに高感度の方法とはいえ、全く塩基配列に関する情報がない場合にはプライマーのデザインができない。しかし、このような場合でも様々な工夫がなされている。

5. PCR法に必要な準備, 機材

1) PCR 用プログラブル恒温槽

PCR 反応は単に温度を繰り返し変化させる反応なので、普通の恒温槽を組み合わせても実験可能だが、やはり専用器が便利である。機能に応じて種々のものが市販されている。使用頻度や目的、予算との兼ね合いで選べばよい。

2) プライマー

自分の実験計画に適した DNA プライマーが必要である。プライマーの設計は PCR の成否を決定するほど重要である。一方はセンスプライマー (5' プライマー)、もう一方はアンチセンスプライマー (3' プライマー) と呼ばれる、後者は通常の配列 (+鎖) とは逆向きで相補的な配列となる。通常 20 mer (20 塩基) 程度がよいとされるが、目的にもよる。一般的には GC 比が 50%, アニール (注 6) 温度が 55°C が基本とされている。プライマーは DNA 合成装置さえあれば自分でも合成できるが、最近では比較的安価で作成してくれる会社がある。

(注 6) 焼きなましの意。通常 90-95°C で二本鎖 DNA を完全に一本鎖に解離させた後に、温度を下げて過剰に存在するプライマーとテンプレート DNA 間で二本鎖を形成させる。アニール温度は T_m (melting temperature) を考慮して決定する。 T_m とはもともと物質が個体から液体になる温度をいうが、DNA の場合は 2 重らせん構造が一本鎖となるときの遷移温度をいう。G-C ペアは 3 コの、A-T ペアは 2 コの水素結合よりなるので、G-C ペアの方がより構造を安定化し、 T_m を押し上げる。PCR では T_m より 5°C 低い温度を設定するのが良いとされる。非特異的バンドが生じるときはアニール温度を上げる。

T_m は以下の式から求める。

$$T_m (^\circ\text{C}) = 4x (G+C) + 2x (A+T)$$

3) DNA ポリメラーゼ

現在、Taq ポリメラーゼがもっともよく使われている。いろいろな会社の製品があるがどこでも一応大丈夫のようである。Taq polymerase よりもエラー率が低い Pfu DNA polymerase という酵素もストラタジーン社より発売されている。後述の RT (逆転写) -PCR の場合には RT と PCR の両反応を触媒する rTth RTase (タカラ) という酵素もある。

4) テンプレート

いろいろな純度の DNA や RNA が用いられるが、細胞からの粗抽出液でも可能である。ホルマリン固定されたパラフィン組織標本もテンプレートになりうる。

6. PCRの条件

PCR法にはさまざまな応用があり、それらの反応すべてをたった一つの条件で行うことはできない。しかしながら以下に述べる条件は通常、多くの場合に効果的に機能すると思われるので、実験のスタートポイントとはなるだろう。
 reaction volume ; 50-100 μl (overlay 30 μl mineral oil) (注 7)
 template ; cDNA or genomic DNA ($10^2 - 10^5$ copies) (注 8)
 buffer ; 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 200 μM each deoxy-nucleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (注 8)
 primer ; 0.25 μM each
 Taq polymerase ; 2.5 units
 反応条件は
 変性 90-95°C 20 sec~1 min (注 9)

(注 7) スクリーニングが目的ならばもっと反応液は少なくても良い。例えば 10 μl でも可能である。いずれも蒸発を押さえるためにミネラルオイルを重層する。

(注 8) 1 コピーでも可能である。ただしテンプレートの量が多い方がそれだけ合成のサイクル数が減らせるのでエラーの可能性も低くなる。各ヌクレオチドの濃度を下げた方がエラー率が減少するので 200 μM ではなく 40-50 μM とする研究者もいる。4 種のヌクレオチドの濃度に差があっても取り込みのエラーが生じやすい。

(注 9) Taq ポリメラーゼも 95°C では徐々に変性するので不必要に長くしてはいけない。

アニーリング 40 - 60°C 20 sec ~ 1 min
(注6)

伸長 (DNA 合成) 70 ~ 75°C 30 sec ~ 1.5 min (注10)

サイクル数 30

以上が一般的な条件である。ただし最初のサイクルの変性ステップと最終サイクルの伸長反応だけはやや長めに設定する。最初の変性を確実にするためと、最後の DNA 合成を完全にするためである。サイクル数はもっと増やしてもよい。

6. PCR でなにができるのか

PCR 法の特徴の一つはその応用範囲の広さである。これまでに様々な応用法が発表されている。主なものをあげてみよう。

1) PCR クローニング

これまでのクローニング法では、ゲノミックライブラリーや cDNA ライブラリーの作成から始まり、目的遺伝子のクローニングまでの一連の作業が必要であった。しかし PCR 法ではそれらの過程を経ずに、抽出した DNA や mRNA から、直接目的遺伝子をクローニングすることが可能である。例えばラットで A 遺伝子の配列が決定されていて、ヒトの同じ遺伝子をクローニングするときは、ラット遺伝子の塩基配列の情報からプライマーを作成し、ヒトゲノムや cDNA をテンプレートにして PCR を行う。ただし目的遺伝子がある程度以上 (> 数 kb) 長い場合にはいくつかの領域に分けて増幅する必要がある。

2) Nested PCR (注11)

第一の PCR で特異的な増幅産物が得られない場合でも、最初のプライマーセットの内部に第二のプライマーセットをデザインして二段階の PCR を行うことにより、増幅産物の特異性を上げることができる (Fig. 4a)。

3) 突然変異の導入

プライマー内に変異部、例えば、アミノ酸の

(注10) 標的とする配列の長さによる。通常 1 kb あたり 1 分を目安とする。

(注11) nest: (箱を) 入れ子にする。

置換や欠失、制限酵素部位などをいれておき、PCR をおこなえばプライマー部位に変異を持った DNA を作成することができる。一段階の PCR ではプライマーの位置、すなわち末端に近い位置に変異が入ることになる (Fig. 4b) が、二組のプライマーを用意して 2 段階の PCR を行うことにより、DNA 断片の任意の位置に種々の変異 (欠失、挿入、置換) を入れたたり、全く異なる遺伝子のキメラを作成することも可能である⁷⁾。

4) RT-PCR 法

従来、mRNA の検出には主にノーザンブロットが用いられてきた。²²P 標識 DNA プロブ (注12) は高感度ではあるが、場所的制約、早い半減期 (14 日)、被爆などの問題があった。RT-PCR 法はこれらの問題を解決した上に、より高感度である。この方法は、最初に reverse transcriptase (RT) 反応 (注13) により RNA から cDNA を合成しておき、これをテンプレートにしてその後に PCR をおこなうもので、まさに以前の cDNA クローニングに相当する。RT-PCR によってごく微量発現している遺伝子の検出が可能である。

5) 塩基配列情報がない場合の PCR

(a) 混合プライマーを用いた PCR

塩基配列の情報はないが、目的タンパク質のアミノ酸配列の一部が決定している場合には、以前はアミノ酸配列から予想されるオリゴヌクレオチド (通常は何種類もの混合物) をプロブとして cDNA ライブラリーのスクリーニングをおこなっていた。当然、合成プライマーの塩基配列は真の配列とは異なるために、二重鎖形成 (ハイブリダイゼーション) の効率が悪く、

(注12) 探針。DNA 断片の一部を放射性アイソトープや修飾物質でラベルしておき、このプロブと同じまたは類似の配列をもつ DNA や mRNA との二重らせんを形成させて検出する。DNA を検出する場合はサザンブロット法、RNA を検出する場合はノーザンブロット法と呼ばれる。

(注13) RNA ウィルスは宿主に感染後、自身のもつ RT (逆転写酵素) により自己の RNA をテンプレートにして DNA を合成する。この RT による mRNA から cDNA の合成反応は cDNA クローニングに不可欠である。

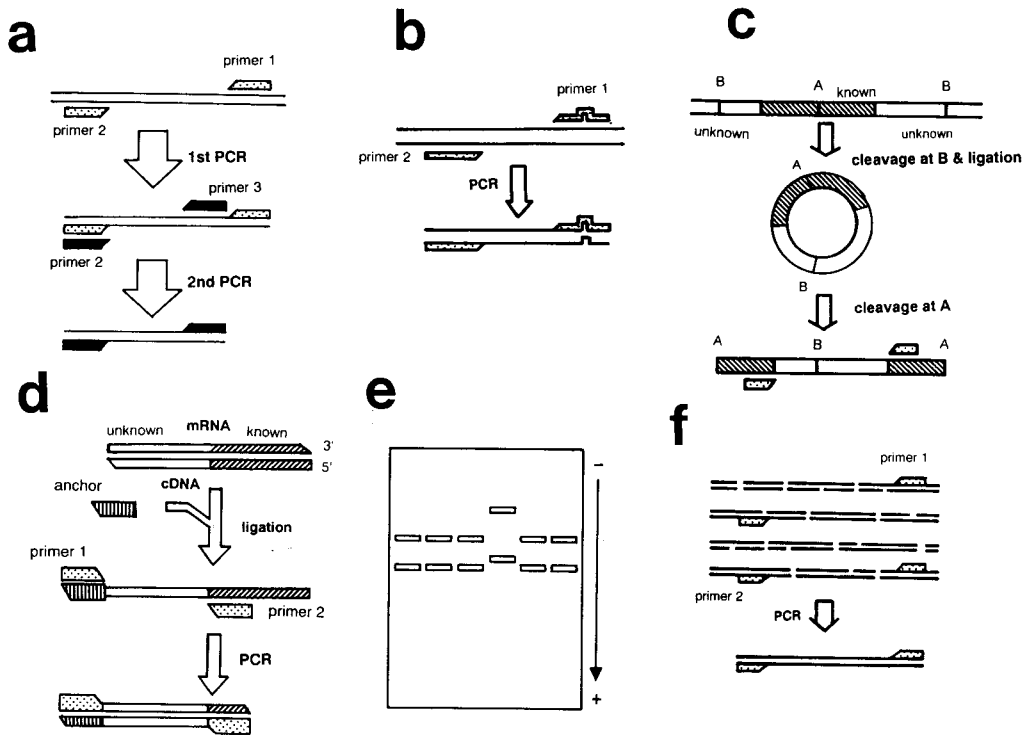


Fig. 4 (a) Nested PCR (b) *In vitro* mutagenesis by PCR (c) Reverse PCR (d) RACE (e) SSCP (f) Jumping PCR

強いシグナルが得られないことが多い。一方、この混合オリゴヌクレオチドを数組用意して、これらをプライマーとしてPCRを行えば、相同性の高い一部の配列が目的のDNAとアニリングして、目的遺伝子の一部が増幅できる。得られたPCR産物は目的の塩基配列そのものであるから、これをプローブにしてDNAライブラリーから全長を含む遺伝子をスクリーニングできる。

(b) 逆PCR (reverse PCR)

逆PCRとは既知の塩基配列部分の外側の未知領域を増幅する方法である。ゲノムのある領域の塩基配列が決定していて、さらにその周辺領域の配列も決定する際に有効である。具体的にはテンプレートDNAを制限酵素(注14)で適当な長さに切断した後、分子内結合(ライゲーション)により環状化する。環状DNAに

ニック(切れ込み)をいれるか、制限酵素で直鎖化すると、未知の部分の両側が既知の部分に挟まれることになり、PCRが可能となる(Fig. 4c)。

(c) アンカーを用いる方法

これはプライマーを決定するために必要な塩基配列情報がない場合に、DNAの両側または一方に既知の配列(アンカー、足場)を導入してプライマー部位をつくる方法である。

ここでは特に rapid amplification of cDNA ends (RACE) と呼ばれる方法を示す。cDNA

(注14) 二本鎖DNAの特定の塩基配列を認識して切断するエンドヌクレアーゼを制限酵素という。いわばDNAの特定の場所を任意に切り張りできるハサミである。遺伝子を自由に操作できるのも制限酵素に負うところが大きい。本来の機能は、侵入したウイルスDNAを分解することにある。

例	制限酵素	認識配列
	EcoRI	G AATTC
		CTTAA G

クローニングの場合には、mRNA が非常に分解しやすい分子であるためと、cDNA を合成する RT 反応が mRNA の 5' 末端まで到達しないために、目的遺伝子の一部領域を欠いた cDNA しかクローニングされないことがある。この場合、mRNA の RT 反応により新たに合成した cDNA の 3' 末端に既知の塩基配列（アンカー）を付加することにより、目的遺伝子の未知領域の増幅が可能となる（Fig.4d）。

6) イミノ PCR-PCR 法によるタンパク質の高感度検出法

現在、抗原の高感度検出としては ELISA 法がある。ELISA では抗原を結合した一次抗体に対してさらにアルカリフォスファターゼなどの酵素を結合した二次抗体を結合させ、酵素反応により検出する。一方、イミノ PCR 法⁹⁾では抗原に結合した IgG に streptavidin-protein A（注15）融合タンパク質を介してビオチン標識 DNA を付加する。この結合 DNA をテンプレートとして PCR を行うことにより、微量の抗原を検出する。ELISA 法に比して 10⁵ 倍高感度であるという。

7) 病原菌やウイルス感染の検出

PCR により病原菌やウイルスの感染の有無を検定することが可能である。抗体検査法では感染しても一定の期間は抗体が産生されないでネガティブに出る場合もあるが、PCR ではその危険は少なくまた感度もよい。HIV の初期感染においても PCR での検出が可能である。

8) ガン遺伝子、遺伝病原因遺伝子の変異や遺伝子多型の検出

ある種の癌ではプロトオンコジーンや癌抑制遺伝子が質的量的に変異している。PCR 法により、病巣のプロトオンコジーンを増幅して変異の有無を検定する。また家族性癌では遺伝的にプロトオンコジーン変異をもつ場合があるが、これも PCR により発病前に検定できる。同様に遺伝病の原因遺伝子を増幅してその変異

を知ることができる。実際、最初に PCR が用いられたのは鎌状赤血球貧血患者の変異グロビン遺伝子の解析であった⁴⁾。

PCR 法により増幅した遺伝子内の変異の検出には種々の方法がある。Single strand conformation polymorphism (SSCP) 法は、PCR 反応により得られた DNA を変性して一本鎖とした後、電気泳動で分離する分析法である。一本鎖 DNA は塩基配列によって高次構造が異なり、点突然変異などのわずかな塩基配列の変化でも電気泳動における移動度の変化として捕らえることができる（Fig.4e）⁹⁾。

9) 考古学への応用

古代人の皮膚や骨やミイラの DNA を増幅しその塩基配列を決定して現代人との類縁関係を知ることができる。今日では絶滅してしまった種でも剥製や凍った死体があれば遺伝子を増幅して現存種との類縁関係を定量的に求めることができる。

非常に興味のある応用にジャンピング PCR がある（ただし手法的には通常の PCR と何ら変わらない）（Fig.4f）。標本の保存状態が悪くて DNA が断片化していても、PCR 反応の初期の段階ではプライマーが各サイクルごとに対応する対応する断片を探しながら少しずつ延びてゆく。やがて同じようにもう一方のプライマーから延びてきた DNA を出会う、以後は通常の PCR となる。最終的に、標本にもすでに完全な長さでは存在していないが、本来は存在していたはずの DNA を得ることができる。本法は繰り返し配列のないミトコンドリア DNA などに適用できる。

7. マウス顎下腺遺伝子発現への PCR の適用例

最後に筆者らがおこなった RT-PCR の一例を示す。雌雄マウス顎下腺では微量のアンドロゲンレセプターと比較的大量の上皮成長因子 (EGF) が発現している。30 サイクルの PCR で両者の mRNA に由来する PCR 産物が検出されたが、この条件ではすでに反応は飽和に達しており、雌雄の差は認められなかった。そこで

(注15) Protein A は *Staphylococcus aureus* (Cowan I 株) の産生するタンパク質で IgG に強く結合する。*Streptomyces avidinii* の産生する streptavidin はビオチンに強く結合する。

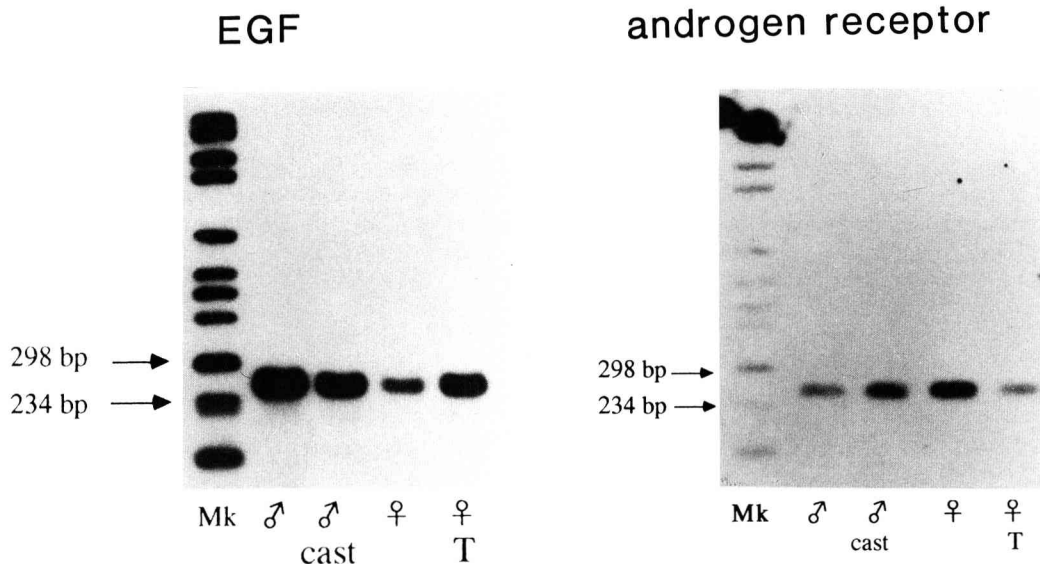


Fig.5 RT-PCR of EGF and androgen receptor

雌雄顎下腺 mRNA の量比を定量的に求めるために PCR のサイクル数を 20 回とし、PCR の基質にジゴキシゲニン標識ヌクレオチドを添加した。PCR 産物はすでにジゴキシゲニンで標識されているので、抗ジゴキシゲニン抗体で検出することができる。その結果、EGF mRNA はすでに知られているようにアンドロゲンに依存して増加したが、アンドロゲンレセプター mRNA は全く逆の傾向を示した。すなわち、マウス顎下腺アンドロゲンレセプター mRNA は雌で、より高く、雄の精巣摘出により増加し、雌のテストステロン投与により減少した (Fig.5)。このように顎下腺のアンドロゲンレセプター mRNA 量は EGF mRNA とは逆にアンドロゲンにより down regulation されていた (永井ら, 投稿中)。

8. 終わりに

ここに記した方法は PCR の可能性のほんの一部にすぎない。まだまだユニークな応用がある。歯科領域での応用については特に述べなかったが、PCR 法はこれまで解析が困難であった骨や歯の組織の研究にも有効な手段だと思われる。百聞は一見 (一実験) にしかず。みなさんも自分で PCR をおこなえば、すぐにそ

の威力を実感します。そして画期的な PCR の応用法を思いついてください。PCR 法自体、分子生物学を学びはじめたばかりの研究者が思いついたアイデアなのです。

謝 辞

この執筆の機会を与えていただいた野坂洋一郎教授 (本誌編集委員長)、ならびに共同研究者の永井雅純博士に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Henry A. Erlich ed.: PCR cloning ; principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, 1989.
- 2) 榑佳之, 松村正実, 高久史磨編: PCR とその応用 - 基礎から臨床まで 実験医学 増刊 8:1990 羊土社
- 3) 藤永蕙編: 遺伝子増幅 PCR 法: 基礎と新しい展開 タンパク質核酸酵素 臨時増刊 35:1990 共立出版
- 4) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., 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
- 5) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J, Higuchi, R., Horn, G. T, Mullis, K. B, and Erlich, H.A: Primer-directed enzymatic amplification

- of DNA with a thermostable DNA sequences. *Science* 239 : 487- 491, 1989
- 6) Kainz, P., Schmiedlechner, A., and Strack, H. B.: *In vitro* amplification of DNA fragments >10 kb. *Anal. Biochem.* 202 : 46- 49, 1992
- 7) Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R.: A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments : study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acid Res.* 16 : 7351- 7367, 1988
- 8) Sano, T., Smith, C. L., Cantor, C. R.: Immuno-PCR : very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 258 : 120- 122, 1992
- 9) Tamura, T., Kihara, T., Nomura K., and Terada, M., Sugimura, T., and Hirohashi, S.: Detection of frequent gene mutation in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res.* 51 : 3056- 3058, 1991