

海産動物稚仔の消化管内容物解析のための PNA-mediated PCR clamping 最適条件の検討

○寺原 猛（早大生医）・張 成年（水研セ中央水研）・
塚本勝巳（東大海洋研）・岡村好子・竹山春子（早大生医）

【目的】稚仔の食性情報は、生態学的にも種苗生産においても重要である。ユニバーサルプライマーを用いた PCR による消化管内容物解析では、peptide nucleic acid (PNA) による特定 DNA の増幅阻害(PNA-mediated PCR clamping)が有効と考えられる。我々は効果的な PCR clamping を得ることを目的として、PNA の位置や配列、PCR の条件等について検討した。

【方法】ウナギ DNA 1ng とイセエビ DNA 0.1ng の混合標本を鋳型とした。rDNA の ITS1 を標的としたユニバーサルプライマーを 18S と 5.8S rDNA 領域に設計し、ITS1 領域にウナギ特異的 PNA をいくつか設計した。PNA の位置、塩基置換数、PCR 条件について検討した。

【結果】プライマーと部分的に重複する位置に設計した PNA は、ウナギ ITS1 の増幅を完全に阻害したが、イセエビ ITS1 の増幅も阻害する場合があった。これは PNA の前半部分がイセエビ配列と一致していたことによる。一方、プライマーと重複しない位置に設計した PNA では増幅阻害効果にばらつきがあり、PNA の Tm 値などが影響していることが示唆された。また 2 ステップ PCR (変成+プライマー-annealing) のほうで良好な結果が得られた。4 ステップ PCR (変成+PNA annealing+プライマー-annealing+伸長反応) では、72°C の伸長反応の際に、結合した PNA が解離し、PCR clamping 効果が減少したものと考えられた。