

新技術紹介

リアルタイム PCR

MORI Yasuyuki

ヨーネ病研究チーム チーム長 森 康行

Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応：PCR) は核酸を増幅する方法としてよく知られていますが、リアルタイム PCR ではこの核酸の増幅をリアルタイムで検出することが可能な装置を用いて行います。通常の PCR では増幅反応が終了した後、電気泳動等で目的の核酸が増幅されたか否かを判定する為、検査サンプル中の目的核酸の量は分かりません。これに対して、リアルタイム PCR では核酸の増幅を蛍光の強さとして検出し、PCR 1 サイクル毎に反応液の蛍光強度を測定します。従って、一定の蛍光の強さ（閾値、あるいは Threshold）に達するまでに PCR を何サイクル行うことが必要であったかによって、検査サンプル中の目的核酸の量のある程度推計することが可能です。少ない PCR サイクル数で Threshold 蛍光まで達したサンプルの方が、たくさん目的核酸を有することを示します。図 1 に示した例では、A サンプルの方が B サンプルより目的の核酸をたくさん含むことになります。このようにリアルタイム PCR では目的核酸を定量することが可能なので、別名、定量的 PCR (quantitative PCR : Q-PCR / qPCR) とも呼ばれます。

リアルタイム PCR での反応過程を蛍光として検出する為、表 1 に挙げたような種々の方法が確立されています。一般的には、インターカレーション法とハイブリダイゼーション法がよく用いられます。インターカレーション法では SYBR Green 等の二本鎖

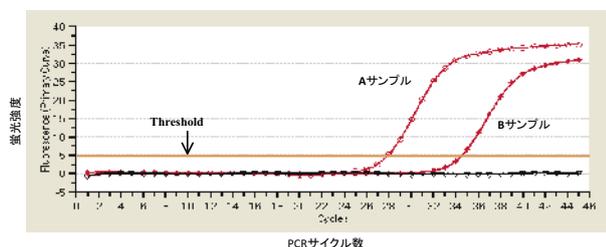


図 1. リアルタイム PCR における蛍光強度の推移 (インターカレーション法)

DNA を識別する蛍光物質が、増幅された DNA に取り込まれ発光することを利用します (図 2)。この反応はメカニズムが単純でリアルタイム PCR を手軽に行うことが可能ですが、非特異的 DNA の増幅でも蛍光を発する為、特異的な反応系を構築すること、PCR 終了後に、PCR 産物の特異性を解析するステップ (融解曲線解析) が必要です。これに対してハイブリダイゼーション法は PCR 産物と特異的に結合する蛍光色素標識プローブを用います。TaqMan プローブ法では、プローブに蛍光物質とクエンチャー (蛍光を消光させる物質) の両方を標識し、ハイブリダイズしないプローブは蛍光を発せず、プローブが結合し DNA 合成の過程でそのプローブが分解されることにより蛍光を発します (図 2)。

このように核酸の検出・定量が可能なリアルタイム PCR は、遺伝子発現の解析等の研究手法として欠くことが出来ないと同時に、病原体の遺伝子を検出する診断法として種々の家畜疾病に広く応用されています。特に、ヨーネ病、鳥インフルエンザ、牛白血病等の重要疾病の診断には必須の方法となっています。また、リアルタイム PCR は感度や特異性が高いだけでなく、遺伝子増幅と検出・判定を全て閉鎖系で行う為、電気泳動を行う従来の PCR 検査法に比べ、コンタミネーションの可能性を大幅に低減できるという、診断法としての重要な長所があります。

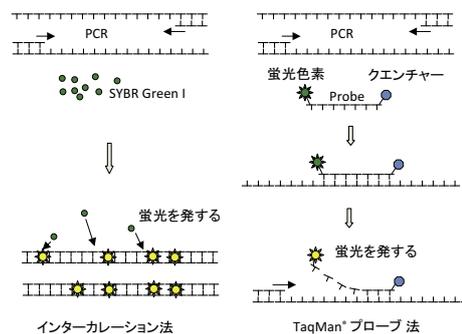


図 2. リアルタイム PCR の原理

表 1. リアルタイム PCR 法

反応原理	名称、使用色素等	特徴
インターカレーション法	SYBR Green I 等	反応系がシンプル、融解曲線解析が必要
	TaqMan プローブ法	代表的プローブ法、市販キットも多い
ハイブリダイゼーション法	Molecular Beacon 法	プローブの設計がやや複雑
	FRET プローブ法	2 種の標識プローブを用いる
	サイクリングプローブ法	DNA と RNA のキメラプローブを用いる
蛍光標識プライマー法	LUX プライマー法	ヘアピン構造を有する標識プライマーを用いる