

## 遺伝子検査用語集

五十音順

### アニーリング:

相補的な配列の一本鎖のDNA同士が二本鎖を形成すること。PCRにおいては、熱変性により一本鎖になったDNAにプライマーを結合させる反応のことを言う。

アルカリ熱抽出法: 簡易的なDNA抽出法のひとつ。アルカリ条件下で熱処理を行い、中和後、遠心上清を回収する。

### 鋳型[Template]:

PCRにおいては、PCR増幅の元となるDNAを意味する。RT-PCRにおいては、cDNA合成(逆転写反応)の元となるRNAを意味する。

### 遺伝子:

遺伝情報の最小単位を表す概念的な用語。例えば、生体内で働く酵素には、それぞれに対応する遺伝子が存在する。

### 遺伝子検査:

ある生物種に固有の塩基配列(遺伝子)を検出する検査法。検出技術としては、PCR法などがよく用いられる。培養法に比べ、迅速に結果が得られ、検出感度が高いことが特長として挙げられる。

### インターカレーター法:

リアルタイムPCRにおける蛍光検出法のひとつ。二本鎖DNAに結合することで蛍光を発するインターカレーターを反応液に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法。

PCR産物の増加に伴い蛍光強度が上昇する。

### インターナルコントロール(IC):

PCRにおいては、PCR阻害の有無を判別するために使用する。試薬にインターナルコントロールが添加されている系では、インターナルコントロールの増幅が認められた場合には、PCR阻害はなかったと判断される。ターゲット、インターナルコントロールともに増幅が認められなかった場合には、偽陰性の疑いがある。

### エアロゾル:

物質が微粒子となって空気中に浮遊した状態。PCRにおいては、DNA溶液のエアロゾルが発生し、コンタミネーションの原因となることがあり、高濃度のDNA溶液の取扱には注意を要する。

### エチジウムブロマイド[エチブロ(通称)]:

二本鎖のDNAに結合するインターカレーターの一つ。電気泳動でDNAを検出する際に用いられる。発癌性があるので、取扱に注意を要する。

#### **エリア分け:**

PCR実験の際に、コンタミネーション対策として、実験エリアを区分すること。PCR反応液調製、検体からの鋳型DNA調製、PCR反応液への鋳型の添加、電気泳動のための場所をそれぞれ別にし、機器、器具等も部屋ごとに用意する。実験設備内で試料の流れを一方方向にすることで、反応液への増幅産物の混入を防ぐことができる。

#### **塩基:**

核酸(DNA、RNA)を構成する物質。DNAはA(アデニン)、G(グアニン)、C(シトシン)、T(チミン)の4種類、RNAはA、G、C、U(ウラシル)の4種類の塩基で構成されている。

**核酸:** DNAやRNAを示す。

#### **塩基配列[DNA配列]:**

DNAを構成する塩基(A、G、C、T)の並び方のこと。塩基配列を解析することを「シーケンス解析」と呼ぶことがある。

#### **逆転写反応[RT反応]:**

RNAはDNAポリメラーゼの鋳型とはならないため、PCRで増幅するには、まずRNAをDNAに変換する必要がある。DNAからRNAへの変換を転写と呼ぶのに対し、RNAからDNAへの変換は逆転写(Reverse Transcription)と呼ばれる。

#### **クエンチャー:**

リアルタイムPCRに用いる蛍光検出用プローブにおいては、蛍光物質の蛍光を抑制する物質のことを言う。日本語では消光物質と訳され、蛍光を抑制する作用は「クエンチング」と呼ばれる。

#### **ゲノム:**

ある生物が持つ遺伝情報全体を表す用語。ゲノムはDNA(あるいはRNA)という物質で構成されている。ゲノムが概念的な用語であるのに対し、DNAは実体を表す用語。

#### **コンタミネーション:**

PCRにおいては、コンタミネーションと言えば、PCRの鋳型となり得るDNAの混入のことを指す。PCRは非常に高感度な検出法であるため、微量DNAの混入でも、それが増幅され判定結果に大きな影響を及ぼすことがあり、十分注意する必要がある。

#### **サイクリングプローブ:**

リアルタイムPCRにおける蛍光検出法のひとつ。サイクリングプローブは、RNAとDNAからなるキメラオリゴヌクレオチドで、片方の末端が蛍光物質で、もう一方の末端がクエンチャー物質で修飾されている。インタクトな状態では蛍光を発しないが、PCR増幅産物とハイブリッドを形成すると、反応液中に含まれるRNase HIによりRNA部分が切断されて蛍光を発する。サイクリングプローブのRNA付近にミスマッチが存在するとRNase HIによる切断は起こらないので、非常に配列特異性の高い検出が可能であり、SNPsタイピングなどに最適である。

**サーマルサイクラー：** PCRを行うための装置。

**伸長反応：**

PCRにおいて、プライマーのアニーリング後、DNAポリメラーゼによりDNAの相補鎖を合成する反応。

**増幅曲線 (amplification plot)：**

リアルタイムPCRにおいて、PCR増幅の過程を蛍光物質を用いてモニタリングし、横軸にサイクル数、縦軸に蛍光強度を取ってグラフ化した曲線。

**増幅産物：**

PCRにおいては、PCRで増幅されたDNAのことを意味する。アンプリコン (Amplicon) とも言う。

**定量PCR：**

PCRによって定量的に検出すること (一般的にリアルタイムPCR装置を用いて行う)

**デオキシリボ核酸：** DNA

**電気泳動：**

PCRで増幅したDNA等をアガロースゲルなどを用いて増幅サイズに応じて分離する分析法。電気泳動度は、エチジウムブロマイド等で染色してDNAをバンドとして可視化する。

**熱抽出法：**

熱処理によりDNAを抽出する簡易的な方法。主にグラム陰性菌に用いられる。(真菌やグラム陽性菌では、十分な量のDNAが得られないことが多いため、この手法は適さない。)

**熱変性：**

PCRにおいて、鋳型となる二本鎖 DNAに熱をかけて一本鎖DNAに解離させることを言う。あるいは、一般的に二本鎖 DNAを熱処理により一本鎖 DNAに解離させることを言う。

**微生物推定解析：**

rRNAの一種である16S rRNAや18S rRNAは、多様な生物種で配列情報の解析がなされており、それらの配列を集めたデータベースが構築されている。現在では、細菌等からゲノムDNAを調製して、16S rRNAに該当する領域の塩基配列を解析すれば、このデータベースを利用して種を推定することが可能となっている。

**プライマー：**

PCRで使用する鋳型DNAに相補的な塩基配列を持つ合成オリゴヌクレオチド (短い一本鎖 DNA)。増幅したい領域を挟むように2か所に設計する。このペアをForward/ReverseあるいはSense/Antisenseと呼ぶことがある。

**プライマーダイマー：**

PCRの際に、プライマーを鋳型として合成される目的外の増幅産物。プライマー同士で相補する配列が存在する場合に、その部分がアニーリングし、通常のPCRと同様に指数関数的に増幅する。増幅サイズが短いので、目的の増幅産物よりも増幅効率が高いことがあり、検出感度の低下を招くやっかいなもの。

**マイクロピペット:**

少量の液体の分取等に使用する器具。扱う液量に応じて、適切なサイズのものを使用する(20 $\mu$ l用、200 $\mu$ l用、1000 $\mu$ l用等)。マイクロピペットの先端には使い捨てのチップを取り付けて使用する。PCR実験においては、エアロゾルによるコンタミネーション防止のため、疎水性フィルター付きチップの使用が望ましい。

**マスターミックス:**

PCRにおいては、まとめて調製した反応液のことを指す。反応液を調製する際に、1反応分ずつ混合するのは操作性が悪く、正確性にも欠けるので、鋳型以外の反応液(マスターミックス)をまとめて調製すると良い。

**マルチプレックスPCR:**

複数のターゲット領域を同一の反応液中で同時に増幅すること。増幅産物を電気泳動で分析する場合には、各ターゲットを増幅サイズにより区別して検出する。リアルタイムPCRでは、ターゲット毎にプローブの蛍光標識物質を変えることにより区別して検出することができる。

**融解曲線(melting curve, dissociation curve):**

インターカレーター法によるリアルタイムPCRにおいて、PCR増幅産物の $T_m$ 値を確認する方法。融解曲線分析では、PCR反応後、反応液の温度を60 $^{\circ}$ Cから95 $^{\circ}$ Cまで徐々に上昇させ蛍光値をモニタリングする。PCR産物が二本鎖を形成している状態では強い蛍光が検出されるが、ある一定の温度( $T_m$ 値)に達すると一本鎖に解離し蛍光値が急激に低下する。 $T_m$ 値はPCR産物の長さやGC含量により異なるので、目的の増幅産物とプライマーダイマーのような短い増幅産物を区別することができる。

**リアルタイムPCR[定量PCR、qPCR](real time PCR, quantitative PCR):**

PCR反応液の中にあらかじめ蛍光標識プローブあるいは蛍光色素を添加し、リアルタイムで目的遺伝子の増幅をモニタリングする方法。電気泳動が不要であるため迅速かつ簡便で、定量的な解析が可能というメリットがある。

アルファベット順

**Amplification plot:** 増幅曲線

**Ct値[Cq値](Threshold Cycle):**

リアルタイムPCRにおいて、増幅曲線と閾値(Threshold)が交差するサイクル数のこと。Ct値は、PCR増幅産物がある一定量(閾値)に達したときのサイクル数を表し、初期鋳型量が多い程小さく、初期鋳型量が少ない程大きくなる。このようにCt値と初期鋳型量の間には相関関係があり、検量線を作成し未知サンプルの定量を行うことができる。

**DNA[デオキシリボ核酸](deoxyribonucleic acid):**

DNAは、二本の鎖がからまった二重らせん構造となっており、それぞれの鎖はA、G、C、Tの4種類の物質(塩基と呼ぶ)が連なった重合体で構成されている。

**DNA配列:** 塩基配列

**EMA-PCR**

PCRにより生菌由来DNAを選択的に検出する方法。EMA(Ethidium monoazide)は、DNAに結合するインターカレーターの種類で、可視光の光照射によりDNAに共有結合する。細菌に対してEMA処理を行うと、生菌では細胞膜に阻まれてEMAは菌内部に浸透しないが、細胞膜が損傷している死菌ではEMAが菌内部に浸透する。細菌内に浸透したEMAはDNAに結合し、その状態で光照射を行うとEMAがDNAに共有結合する。

**GC含量:** 塩基配列中のGとCの割合(G+C/全塩基)。%で表す。

**IC:** インターナルコントロール

**PCR(polymerase chain reaction):**

DNA鎖の熱変性、プライマーのアニーリング、ポリメラーゼによる相補鎖の合成を繰り返し行うことによりDNAを増幅する方法。1サイクルごとにDNAが2倍、4倍、8倍・・・と指数関数的に増幅する。この方法を用いると、DNAを数時間で100万倍に増幅できる。

**qPCR:** リアルタイムPCR

**RNA(ribonucleic acid):**

RNAは、DNAとは異なり一本鎖構造で、A、G、C、Uの4種類の塩基で構成される。RNAには、遺伝情報の伝達を担うmRNA(messenger RNA)の他、rRNA(ribosomal RNA)やtRNA(transfer RNA)と呼ばれるものが存在する。

**rRNA(ribosomal RNA):**

rRNAは、タンパク質の合成の場であるリボソームに含まれるRNAで、細胞内に非常に多コピー存在している。遺伝子検査においては、DNAよりコピー数が多く高感度検出に有利なため検出の標的とされることがある。

**RT反応:** 逆転写反応

**RT-PCR:**

RNAはDNA Polymeraseの鋳型とはならないため、PCRで増幅するには、まずRNAをDNAに変換する必要がある。DNAからRNAへの変換を転写と呼ぶのに対し、RNAからDNAへの変換は逆転写と呼ばれる。逆転写酵素によりRNAから変換されたDNAはcDNA (cはcomplementary、相補的の意味)と呼ばれ、PCRの鋳型となり得る。逆転写反応 (RT; Reverse Transcription) に続いてPCRを行う方法がRT-PCRであり、RNAをPCRで増幅する手法である。

**Template:** →鋳型

**Tm値:**

Melting temperatureの略語で、融解温度と訳される。DNAにおいては、二本鎖DNAの半分が変性し、一本鎖DNAの状態になる温度のことを言う。プライマーのTm値はPCRのアニーリング温度を設定する際の参考になる。

**UNG (uracil-N-glycosylase):**

PCR 増幅産物のキャリアオーバーによる偽陽性を抑制するのに使用する酵素。

UNG を使用する場合は、まず、dTTP の代わりに dUTP を含む基質を用いて PCR を行い、増幅産物にウラシル塩基を取り込ませる。この PCR 産物に対して UNG 処理を行うと、ウラシル塩基の部分で加水分解され、キャリアオーバーを防止できる。