リアルタイム PCR の基礎知識

１．リアルタイム PCR の用途

リアルタイム PCR 法は、遺伝子発現解析の他に、SNPs タイピング、遺伝子組み換え食品の検査、ウイルスや病原菌の検出、導入遺伝子のコピー数の解析などさまざまな用途に応用されている。遺伝子発現解析のような定量解析は、まさにリアルタイム PCR の得意とするところであるが、プラス／マイナス判定だけの定性的な解析にもその威力を発揮する。これは、リアルタイム PCR が反応後に電気泳動で増幅産物の確認を行う必要がないので、簡便・迅速に結果が得られ、コンタミネーションのリスクが低いといった長所も持つためである。近年、従来の PCR 法で行われていた遺伝子検査をリアルタイム PCR で実施しようとする試みが盛んになされている。

定性解析におけるリアルタイム PCR の利点

- 操作が簡便で迅速に結果が得られる
- コンタミネーションのリスクが低い

定量解析におけるリアルタイム PCR の利点

- 操作が簡便で迅速に結果が得られる
- コンタミネーションのリスクが低い
- 広いダイナミックレンジで正確な定量ができる

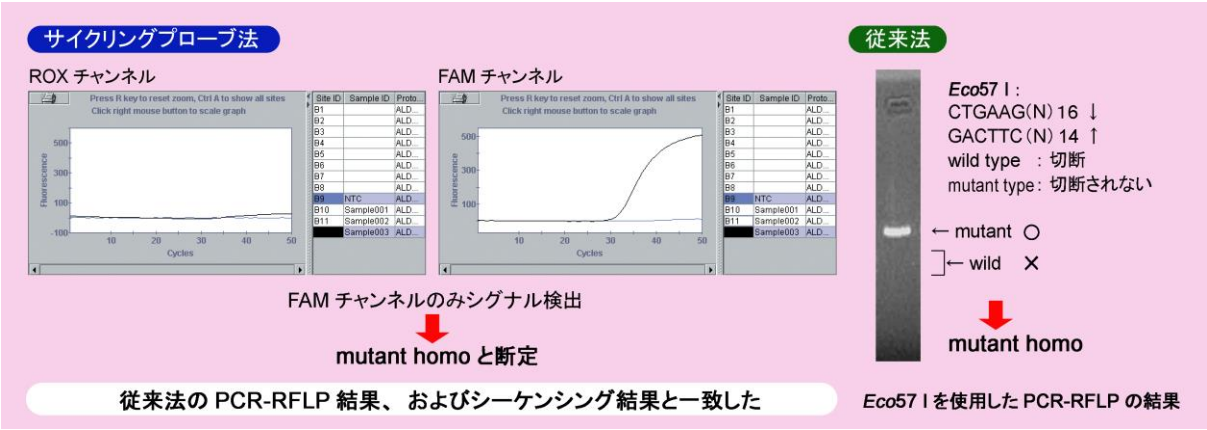
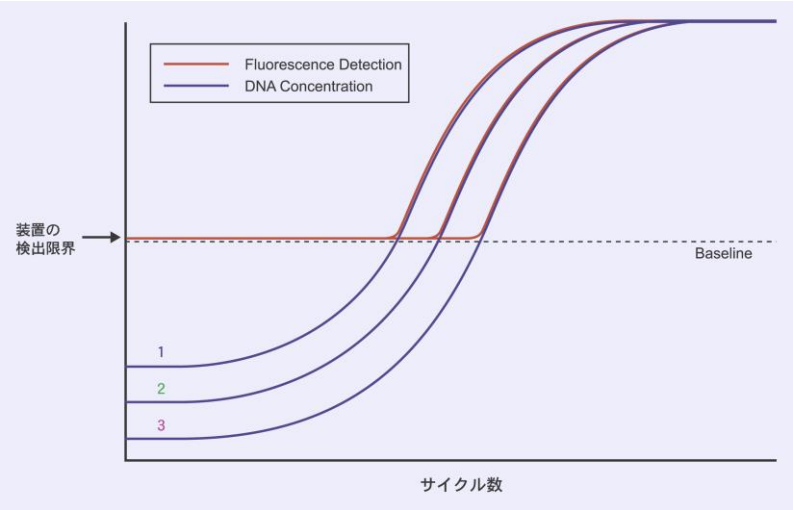


図　リアルタイム PCR による SNPs タイピングの例

２．リアルタイム PCR による定量の原理

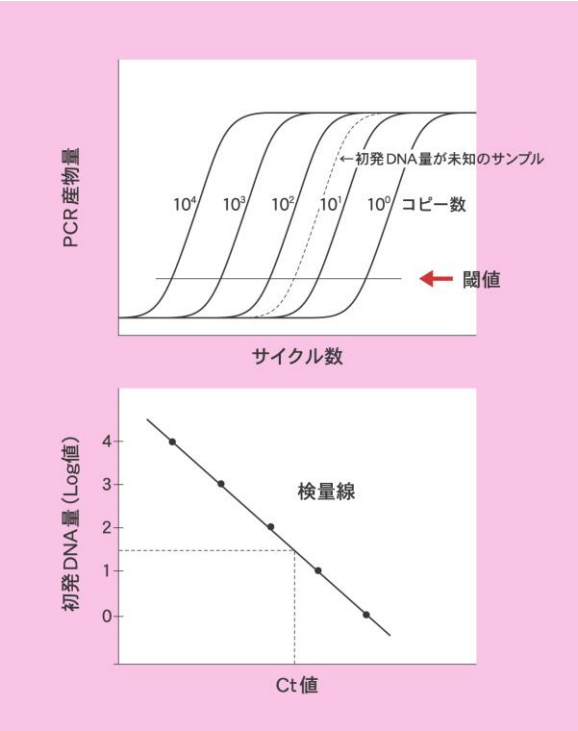
リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングするため、指数関数的増幅域で正確な定量を行うことができる。これは、エンドポイントで解析する従来の RT-PCR 法などとは大きく異なる点である。以下、その定量の原理について簡単に解説する。

PCR では、1 サイクルごとに DNA が 2 倍、2 倍、・・と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達する。この増幅の様子をリアルタイムモニタリングした図が増幅曲線である。下の模式図では、DNA 濃度（実際の増幅産物量）を青線で示し、それを蛍光により検出したシグナル強度を赤線で示した。PCR 増幅産物量が蛍光検出できる量に達すると増幅曲線が立ち上がり始め、指数関数的にシグナルが上昇した後、プラトーに達する。



初発の DNA 量が多いほど、増幅産物量は早く検出可能な量に達するので、増幅曲線が早いサイクルで立ち上がる。よって、段階希釈したスタンダードサンプルを用いてリアルタイム PCR を行うと、初発 DNA 量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が得られる。ここで、適当なところに閾値（Threshold）を設定すると、閾値と増幅曲線が交わる点：Ct 値（Threshold Cycle）が算出される。

Ct 値と初期鋳型量の間には直線関係があり、右図のような検量線を作成することができる。未知サンプルについてもスタンダードサンプルと同様に Ct 値を算出し、この検量線に当てはめれば、初期鋳型量を求めることができる。



◎ スタンダードサンプルを用いて検量線を作成し、未知サンプルを定量する。

Ct 値とは、PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数である。

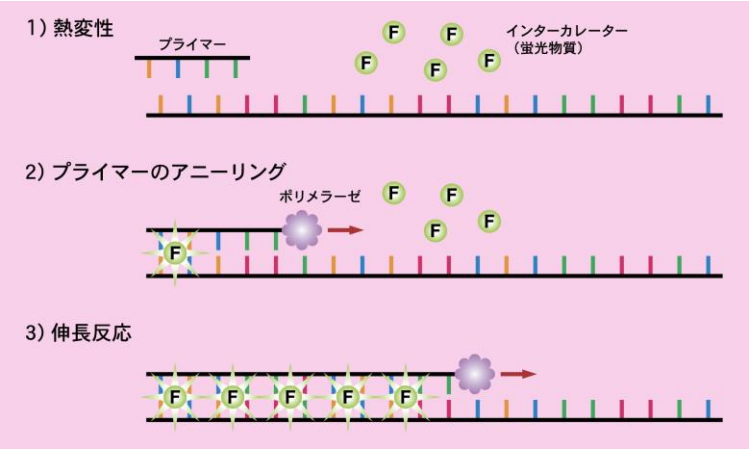
３．蛍光検出方法

【蛍光検出の原理】

リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物を蛍光により検出する。蛍光検出方法には、インターカレーターを用いる方法と蛍光標識プローブを用いる方法の 2 種類がある。

□ インターカレーター法

インターカレーターは、PCR によって合成された二本鎖 DNA に結合し、励起光の照射により蛍光を発する。この蛍光強度を測定することにより、増幅産物の生成量をモニターできる。



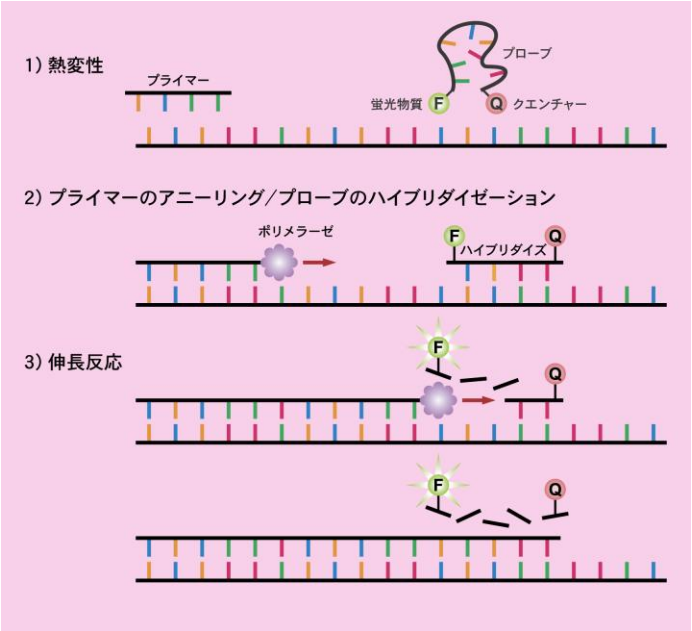
□ 蛍光標識プローブ法

蛍光標識プローブには多くの種類があるが、ここでは、タイプの異なる 2 種類のプローブ検出法を紹介する。

A. プローブ検出　(5'-ヌクレアーゼ法)

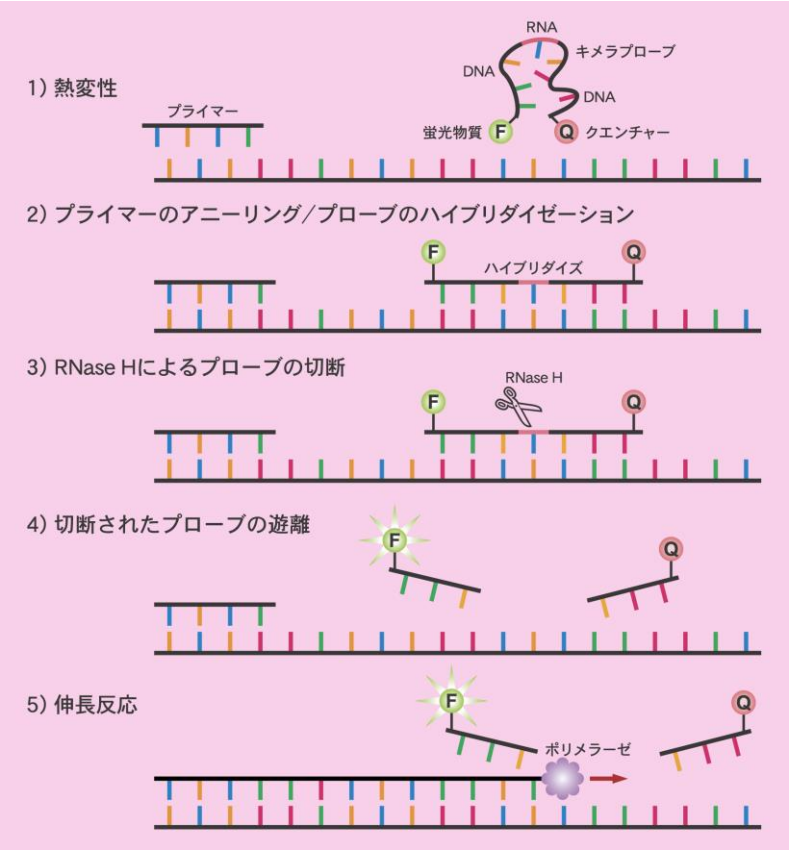
5'末端を蛍光物質で、3'末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる。

プローブは、アニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズするが、プローブ上にクエンチャーが存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制されている。その後の伸長反応ステップで、*Taq* DNA ポリメラーゼのもつ 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にハイブリダイズしたプローブが分解されると、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光を発するようになる。



B. サイクリングプローブ検出（CycleavePCR 法）

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 RNase H 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 H 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。



【蛍光検出方法の選択】

インターカレーター法は、二本鎖 DNA をすべて検出するため、ターゲット遺伝子ごとにプローブを用意する必要がない。実験コストが安く反応系の構築も容易なのが長所だが、検出特異性はあまり高くない。一方、蛍光標識プローブを用いる方法は、プローブ設計のための専用ソフトが必要でコストも高いが、検出特異性が高いというメリットがある。相同性の高い配列同士を区別する場合や SNPs タイピングのようにマルチプレックス検出が必要な場合には、蛍光標識プローブがその威力を発揮する。

蛍光検出方法は、実験用途に合わせて選択する。高い特異性が求められる実験には蛍光標識プローブを、それ以外の場合には簡便なインターカレーター法を用いるのが良い。

◎ 簡便でコストのかからないインターカレーター法がお勧め。
　特異性を上げたいときは蛍光標識プローブを用いる。

参考

蛍光物質に関する基礎知識　・・・・

蛍光標識プローブを用いたリアルタイム PCR では、プローブの種類だけでなく蛍光色素の種類も重要である。ほとんどの蛍光標識プローブでは、蛍光物質とクエンチャーを組み合わせ、FRET の原理を利用して検出している。蛍光物質とクエンチャーにはさまざまな種類があり、使用するリアルタイム PCR 装置の励起および検出波長に合ったものを選択する。また、マルチプレックスのリアルタイム PCR を行う際には、各蛍光がクロストークしないように組み合わせに留意する。

蛍光物質は、ある特定の波長の光を吸収して励起状態となり、もとの基底状態に戻るときに吸収したものとは異なる波長の光を放出する。クエンチャーは、蛍光物質から光エネルギーを受取り、それを光あるいは熱エネルギーとして放出する分子である。エネルギーを光で放出するクエンチャーとしては TAMRA が、熱で放出するクエンチャー（ダーククエンチャー）としては Eclipse や BHQ、DABCYL がよく用いられている。

参考

FRET とは？　・・・・

ドナー（蛍光物質）とアクセプター（クエンチャー）の間で生じるエネルギーのトランスファー現象。

ドナーとアクセプターが近接していると、両者の間で FRET が起こる。このとき、ドナーのエネルギーはアクセプターに移動し、ドナーは基底状態に戻る。アクセプターは励起状態となり、アクセプターが発する蛍光シグナルが検出される。ドナーとアクセプターの距離が離れると FRET は起こらず、アクセプターからの蛍光シグナルは検出されない。

４．リアルタイム PCR 装置

リアルタイム PCR を行うには、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化したリアルタイム PCR 専用装置が必要である。サーマルサイクラーで DNA を PCR 増幅しつつ、分光蛍光光度計でその増幅産物をモニタリングする。さまざまな種類のリアルタイム PCR 装置が販売されており、高速でPCR反応が行えるように工夫されたものや96ウェルのプレート単位で反応できるものなど、それぞれ特性を備えている。解析規模や実験者の人数に合わせ、大規模解析に適した機種あるいは中規模～小規模解析に適した小回りの利く機種を選択するとよいだろう。また、装置によって検出できる蛍光色素の種類が異なるので、複数種類の蛍光色素を使用する実験を行う場合には、その点にも注意が必要である。さらには、複数種類の蛍光色素が検出できる装置でも、それらの蛍光色素間でクロストークがあると、同時に正確な検出を行うことはできない。同時検出する蛍光色素について、クロストークがないことも確認しておく。

◎ 使用目的に適した装置を選ぼう。検出可能な蛍光色素の種類にも要注意。

小回りの利く機種（48 ウェル）

Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*　（製品コード TP700）

（タカラバイオ）

標準的な機種（96 ウェル）

Thermal Cycler Dice® Real Time System III　（製品コード TP950）

（タカラバイオ）