

静岡県微生物検査情報

静岡県環境衛生科学研究所

〒420-8637 静岡市北安東 4 丁目 27-2

TEL. 054 (245) 0201

ホームページ <http://www6.shizuokanet.ne.jp/eikanctr/>

Eメール kanbi@hq.pref.shizuoka.jp

第 23 巻第 4 号

2003 年 8 月発行

(平成 15 年)

real-time PCR 法の原理と応用

PCR 法は試料中に含まれる極めて微量な鋳型 DNA、RNA を容易に検出する方法として現在様々な分野で広く利用されているが、定量的に用いる場合、サイクル終盤で増幅産物がある限度を超えると増加が停止し初期鋳型量を反映できなくなる（プラトー効果）という問題を解決するため、これまで様々な方法が提案されてきた。この中の一つの方法として real-time PCR 法が注目され、各社から自動化された専用機器やキットが発売されてきている。real-time PCR 法は、従来のサーマルサイクラーに蛍光検知機能を一体化した装置を用い、PCR での増幅産物の生成過程をリアルタイムで追跡、その反応曲線を解析する方法で、近年、臨床分野での疾病診断や原因遺伝子の定量、遺伝子の塩基変異・置換解析など生物学、医学の様々な領域で利用されている。本法は、①オンラインで観察するため電気泳動が不要、②指数関数的な増幅領域で産物量を比較でき、より正確な定量が可能、③増幅過程を連続して観察でき、反応途中でも特定配列の検出が可能、などの利点があり迅速性と定量性に優れた方法である。最近では DNA のみならず RT (Reverse Transcription) PCR 法を用いた RNA 解析用のキットも発売されてきている。

real-time PCR 法における PCR 産物量の蛍光検出方法は各種あるが、代表的なものでは二本鎖 DNA に結合したときのみ蛍光を発する SYBR Green という色素を用いる方法や、互いに干渉しあう 2 種類の蛍光色素で標識した配列特異的なプローブを用いる方法がある。後者のうち、組換え DNA 技術応用食品 (GM 食品) の定量試験で用いられる TaqMan プローブによる蛍光検出の原理を下図に示した。real-time PCR 装置はこの蛍光強度を測定することで増幅産物量をモニターする。定量的に用いるときは既知試料における増幅曲線の指数関数領域で検量線を作成し、これをもとに検査試料の標的遺伝子量を推定する。

当研究所では、平成 13 年の米国での同時多発テロに係る炭疽菌迅速検出法として、及び同年の GM 食品の表示義務化に伴う、安全性審査済み GM 食品の定量検査法として本法が提示されたため real-time PCR 装置が導入された。この検査法はランニングコストが高いという欠点があるが、今後は食中毒事件での病原微生物や毒素遺伝子などの迅速検出、食品中の病原微生物の定量、ウイルス感染症の診断など様々な検査への応用が考えられる。(微生物スタッフ 有田世乃)

