

## キャピラリーPCR 法による遺伝子の定量および変異解析

酒井栄一<sup>1</sup> 田中努<sup>2</sup> 森光子<sup>1</sup> 中川原寛一<sup>1</sup>

1; 株式会社日本遺伝子研究所 遺伝子部

〒983-0034 宮城県 仙台市 宮城野区 出花 2-11-3

TEL : 022-388-7385 FAX : 022-388-7022

e-mail : lightcycler@ngri.co.jp

2; ロシュダイアグノスティックス株式会社 バイオケミカル部

〒105-0014 東京都 港区 芝 2-6-1 日本ロシュビル

TEL : 03-5443-5287 FAX : 03-5443-7098

e-mail : tsutomu.tanaka@roche.com

はじめに

遺伝子発現の定量法には大別すると、以下の5種類がある。

1. ノーザンおよびドットハイブリダイゼーション
2. RNase プロテクション アッセイ
3. RT-PCR(内部標準を使用)
4. competitive RT-PCR(competitor を使用)
5. リアルタイムモニタリングによる PCR

このうち3,4,5はPCRを使用しており、3,4は指数増殖期において定量する方法であるが、5は指数増殖期に入る直前、いわばPCR産物の検出限界を超えるPCRサイクル数を用いて定量する点が異なっている。最近、このリアルタイムモニタリングによる定量が注目を浴びている。この方法は、事前に指数増殖期のサイクル数を確認しておく必要がないだけでなく、指数増殖期において定量する方法と比較して、幅広い定量域を持つことなど多くの利点がある。本稿ではリアルタイムモニタリングを行うことができる装置としてライトサイクラー™システム(ロシュダイアグノスティックス社)を紹介する。

ライトサイクラー™システムの原理と特徴

ライトサイクラーはPCRを短時間で終了すると同時に、PCR産物の増幅をリアルタイムかつオンラインでモニターできるよう設計されている。図1でシステム概要を示し、いかにしてこのようなことができるのかを説明する。温度のサイクルは加熱された空気と室温空気を使い分けることで実現している。形状がない空気は通常のヒートブロックやウォーターバス方式と比較し、温度変化のサイクルプロセスを著しく速めることができる。空気はサーモチャンバー内の加熱コイルで温められ、熱電対で制御される。このようにしてプログラムされた温度に対し $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ の精度を保証している。チャンバー内の温度は1秒間に $20^{\circ}\text{C}$ という極めて速い熱伝導により、2~3秒で設定温度に達する。反応容器であるプラスチック/ガラス合成キャピラリーは容量に対する表面積の比が高いため、空気と反応液の温度平衡はほぼ同時に達成する。反応容器としてのキャピラリーの材質はホウケイ酸製で $20\mu\text{l}$ の反応系で反応させる。

キャピラリーのガラス光学的特性は、蛍光測定用キュベットとして最適で、蛍光が持つ特性としてシグナル強度はPCR産物量に比例するため、PCR反応中に同時にモニターすることが可能となる。ライトサイクラーにはキャピラリーの先端から蛍光を測定する光学ユニットがあり、シグナルは光ファイバーと同様な方法でキャピラリーの先端に導かれるため、先端には強い蛍光シグナルが集束することになる。

光学ユニットは3種類の検出チャンネルと1種類の光源(発光ダイオード;LED)で構成されている。LEDからの青色光(470nm)はそれぞれのキャピラリーの先端に焦点が合わされ、それにより蛍光色素が励起される。蛍光色素から放出された蛍光はフィルターとミラーにより、3種類のチャンネル(チャンネル1; 530nm, チャンネル2; 640nm, チャンネ

ル 3; 710nm)で検出される波長に分光される。各チャンネルで測定されたシグナルは直ちに画面上にプロットされるため、モニタリングはリアルタイムかつオンラインで実行される。

#### ライトサイクラーの蛍光フォーマット

##### 1. SYBR<sup>®</sup>Green

SYBR<sup>®</sup>Green は dsDNA の minor groove に結合し、dsDNA に結合しているときのみ、蛍光を発する点で特異性が高い。したがって、dsDNA の量に応じた異なる蛍光強度を検出できる(図 2)。

DNA は熱変性で 1 本鎖になる(パネル a)。このとき、SYBR<sup>®</sup>Green は結合していない。アニーリングではプライマーにより短い部分的な 2 本鎖ができ、ここに SYBR<sup>®</sup>Green が結合し蛍光を発する(パネル b)。伸長反応時にはプライマーは伸長され、より多くの SYBR<sup>®</sup>Green が結合する(パネル c)。伸長反応の終了時に DNA は 2 本鎖になり、最大量の SYBR<sup>®</sup>Green が結合した状態になる(パネル d)。蛍光(チャンネル 1 で測定; 530nm)は伸長反応の最後に記録され、サイクルごとの PCR 産物の増加をモニターすることができる。欠点としては SYBR<sup>®</sup>Green はすべての 2 本鎖 DNA に結合するため、プライマーダイマーも検出してしまい、PCR 産物の検出の特異性が落ちる場合があることである。

##### 2. ハイブリダイゼーションプローブ

ハイブリダイゼーションプローブは PCR 産物の検出を配列特異的に行うため、PCR 産物の同定において最大の特異性が得られる(図 3)。

ハイブリダイゼーションプローブは 2 種類の配列特異的なオリゴヌクレオチドを使用する。1 種類は 3' 末端がフルオレセインで標識され、もう一方は 5' 末端が LCRED640 で標識され、3' 末端がプライマーとして働かないように、リン酸化されている(パネル a)。アニーリングで 2 種類のプローブが PCR 産物にハイブリダイズする。フルオレセインは LED で励起され、少し長波長側の緑色の蛍光を放出する。2 種類の蛍光色素が近づいたとき、この放出されたエネルギーは LCRED640 を励起し、少し長波長側の赤色の蛍光を放出する。この蛍光(チャンネル 2 で測定; 640nm)はアニーリングの最後に記録される(パネル b)。アニーリング後、温度は上昇し、ハイブリダイゼーションプローブは Taq DNA ポリメラーゼにより、除去される(パネル c)。伸長反応の終わりでは、PCR 産物は 2 本鎖であり、ハイブリダイゼーションプローブは離れ過ぎた状態にある(パネル d)。

#### ライトサイクラーの使用目的

1. PCR 産物の同定
2. 遺伝子発現の定量
3. 遺伝子増幅の定量
4. 遺伝子欠失の検出(LOH)
5. 遺伝子多型の検出(single nucleotide polymorphism)

ここでは使用目的としては最も多い定量を中心に述べることにする。

図 4 は段階希釈した  $\beta$ -グロビンをクローニングしたプラスミドをスタンダードとして  $\beta$ -グロビンの増幅の検出を示しているが、どのようにハイブリダイゼーションプローブによるシグナルが上昇していくかを示している。初期濃度に依存して、シグナル強度の上昇は異なるサイクル数で始まっている。ハイブリダイゼーションプローブを用いると鑄型が全くないときにはシグナルは記録されることはなく、たとえプライマーダイマーができたとしても、配列特異的なハイブリダイゼーションプローブで検出されることはない。対数直線性領域のシグナルがバックグラウンドシグナルと区別できるようなサイクル数を同定することで、各サンプル中のターゲットの濃度を比較することができる。PCR を完了した後、ライトサイクラーソフトウェアは測定データを標的分子のコピー数へ変換する。最初のステップでは蛍光レベルにノイズバンド(閾値)を設定し、PCR が対数直線増幅期にあることを示す蛍光シグナルの増加地点を定義する。次にソフトウェアが、このノイズバンドを超えているすべてのデータポイントに対して、蛍光強度を計算する(図 5a)。この閾値を超えるデータポイント(ユーザーが定義した個数分)を通る直線を近似計算することにより、すべてのスタンダードに対して、ノイズバンドと蛍光強度の対数値が交差する点(ソフトウェア上では crossing point (サイクル数で表示)と呼ぶ)が得られる。crossing point と濃度(log 値表示)をプロットすることによって検量線が得られ(図 5b)、未知濃度サンプル中の目的配列の濃度は、crossing point を求め、検量線に当てはめることにより得られる。この例ではスタンダードは  $10^6$  コピーから  $10^3$  コピーのプラスミドの範囲で、ソフトウェアで計算された試料の濃度は図 5c に示した。

ライトサイクラーを使用して定量 PCR を行うときには外部標準(スタンダードとサンプルを別々のキャピラリーで分析する)が必要となるが、これには以下に述べるような重要な長所がある。(1)各反応液中で 1 組のプライマーと 1 組のハイブリダイゼーションプローブしか使用しないため、複雑さが軽減されている。(2)スタンダードの相対濃度と標的配列のどちらによっても変わることはない。(3)外部標準を用いることによって 1 回の反応で幅広いダイナミックレンジで計測できる。

ライトサイクラーには高い再現性での測定を保證するいくつかの特徴が備えられている。ポジショニングのためのメカニクスはほとんどないものの、非常に精密な可動部分(誤差  $1\mu\text{m}$  以内でのキャピラリーのポジショニングが可能)がある。また、均一な温度分布が可能なサーマルチャンバーを採用することにより、各キャピラリーに対しての同一の PCR 条件が保證されている。システムにおける誤差(ピペティング誤差、ポジショニングのばらつき、キャピラリー内のばらつき)は、LCRED640 のシグナル(F2)をフルオレセインのシグナル(F1)で割り算することで最小限に抑えることができる。したがって、定量する際のキャピラリー間でのばらつきは極端に少なく、再現性のあるデータが得られることがわかる。

## ライトサイクラーの実際の応用例

ここでは当研究所で行った ACE(アンギオテンシン変換酵素)の多型解析について述べる。

目的：ACE(アンギオテンシン変換酵素)の多型として第 16 イントロンにおける Alu 配列の I(insertion)/D(deletion)により、多型が存在する。通常の PCR では 490bp と 190bp のバンドが電気泳動上、検出される。これらの PCR 産物を  $T_m$  値の違いにより検出する。

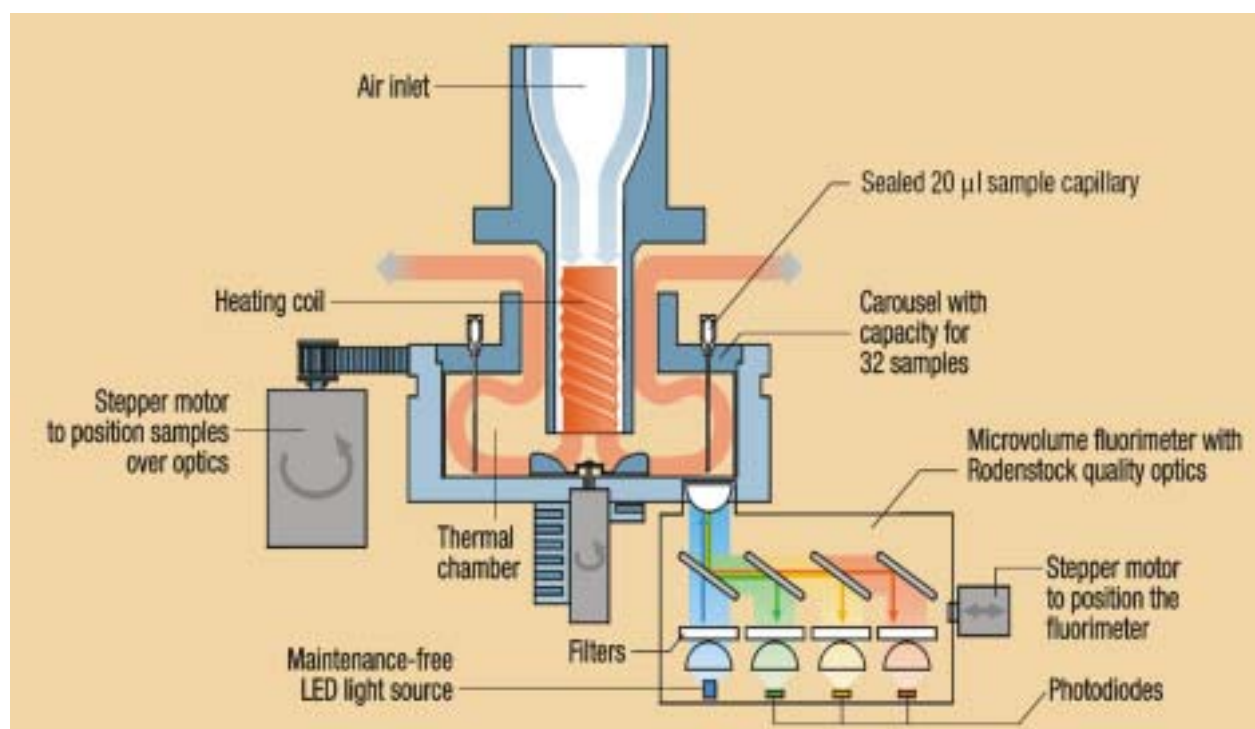
材料：糖尿病性腎症の患者由来の末梢血から抽出した DNA(50ng/ $\mu$ l)

方法：DNA を 1 $\mu$ l(50ng)使用し、SYBR<sup>®</sup>Green のフォーマットを使用してライトサイクラーにかける。ライトサイクラーにおいては PCR のプログラムが終わった後に、 $T_m$  値の解析プログラムが引き続き行われる。

結果：図 6,7

## おわりに

ライトサイクラーは遺伝子の発現量、ウイルス、細菌数の正確で迅速な定量に効力を発揮する。また PCR 産物の  $T_m$  値など、電気泳動では得ることのできなかつた情報をも提供することができる。また今年の初めより、磁性体粒子を使用した自動核酸抽出機(MagNA Pure LC)が同社より発売されている。この抽出機は DNA, RNA, mRNA が可能なだけでなく、ライトサイクラーのキャピラリーに分注する機能もついており、ライトサイクラーとセットで使用することにより、定量や変異解析の HTS が可能となっている。従って、本システムは核酸の正確な定量、即時性を要する臨床検査への遺伝子検査の導入、簡便な変異および遺伝子型判定等、新たな遺伝子検査の可能性を広げることになると考えられる。



470 530 640 710

図1 ライトサイクラーの模式図

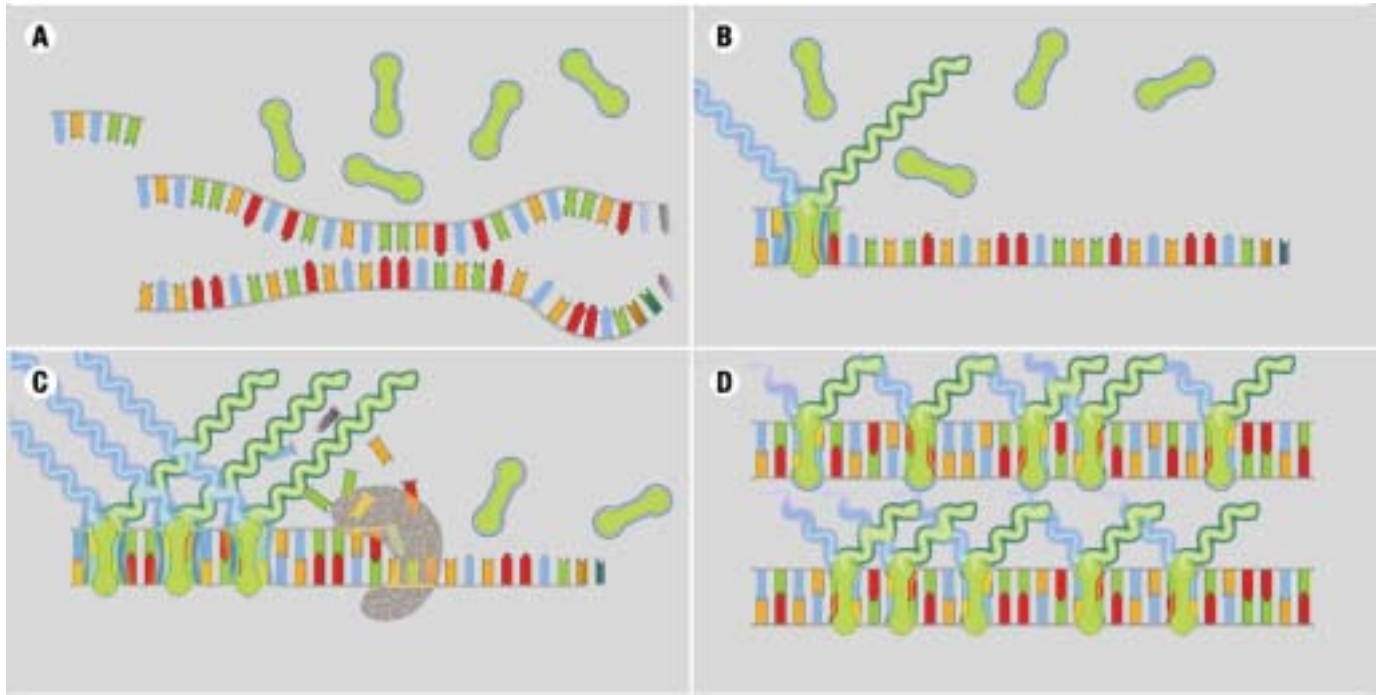


図2 SYBR<sup>®</sup>Green フォーマットの概略

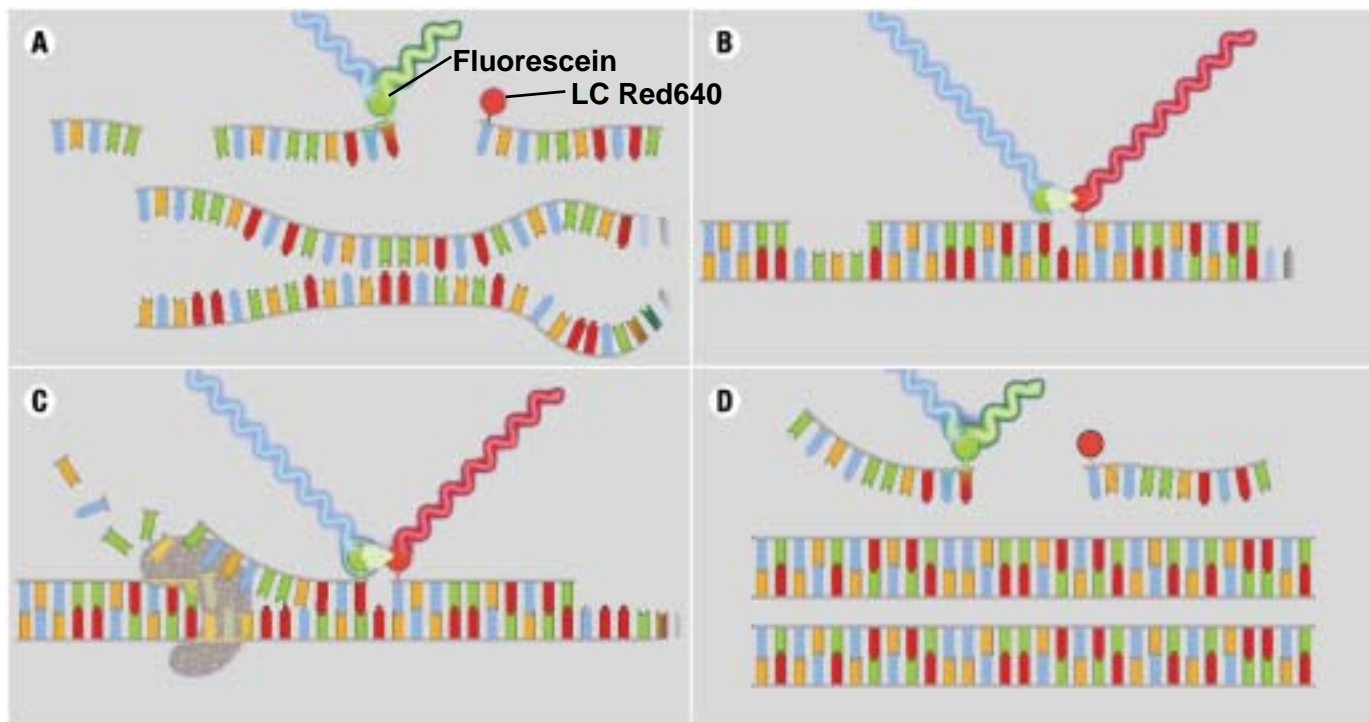


図3 ハイブリダイゼーションプローブフォーマットの概略



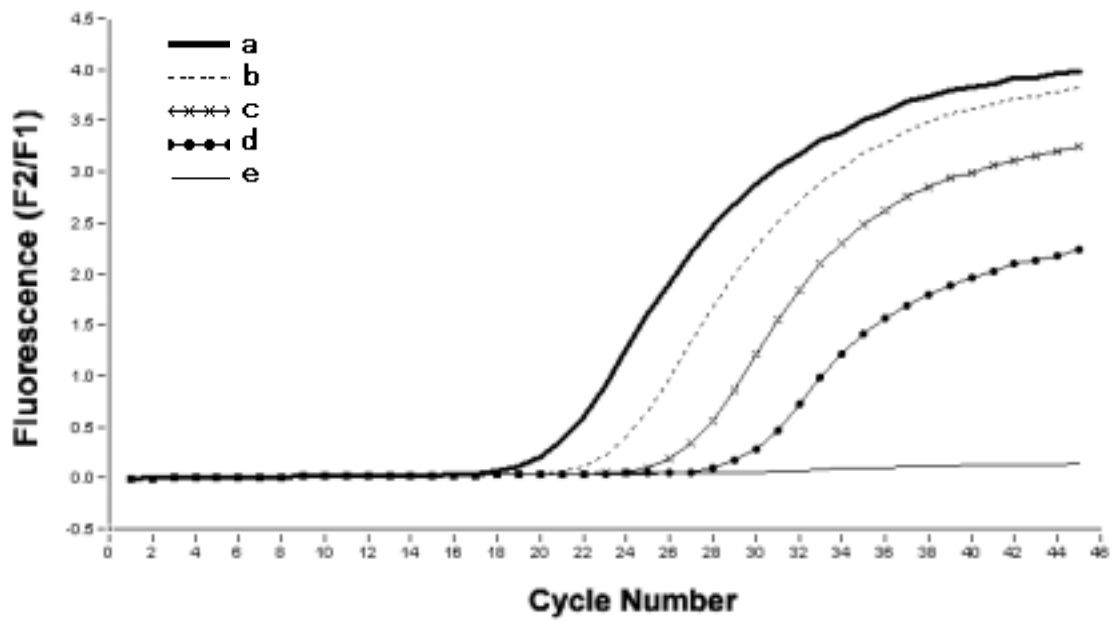
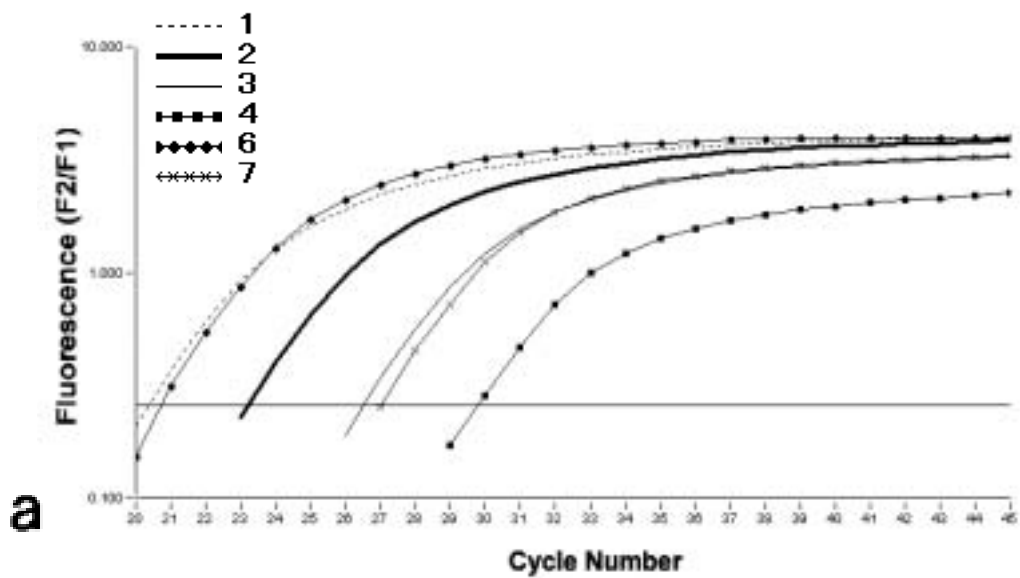
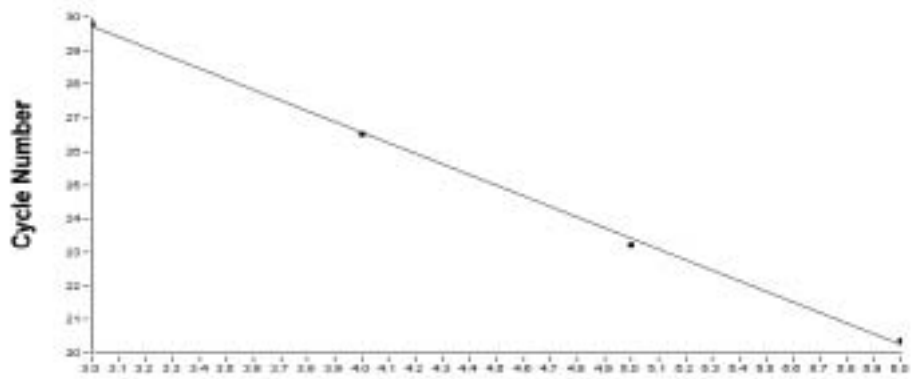


図4 様々な初期量の  $\beta$ -グロビンをクローニングしたプラスミドを増幅した際のハイブリダイゼーションプローブを用いた検出  
 a ; 10<sup>6</sup>コピー b ; 10<sup>5</sup>コピー c ; 10<sup>4</sup>コピー d ; 10<sup>3</sup>コピー e ; H<sub>2</sub>O



a



b

Sample Information

Rotor Position	Sample Name	Rep. of ...	Sample Type*	Known Conc.	Calculated Conc. (Units)	Crossing Point
1	Standard 10e6		S	1,000,000	911,400	20.37
2	Standard 10e5		S	100,000	113,400	23.23
3	Standard 10e4		S	10,000	10,270	26.52
4	Standard 10e3		S	1,000	941.9	29.80
5	No Template		N			
6	Sample 1		U		703,700	20.72
7	Sample 2		U		7,157	27.02

c

\* P = Positive, U = Unknown, N = Negative, S = Standard, < > = De-Selected

図5 ヒトゲノム DNA 中の  $\beta$ -グロビンの定量

- ノイズバンドよりも大きい蛍光データポイントの表示(F2/F1)
- 対数直線領域(log-linear)の相関直線とノイズバンドとの交点(crossing point、サイクル数で表示)が各スタンダードの対数濃度に対してプロットされている。
- スタンダードとサンプルの算出された濃度

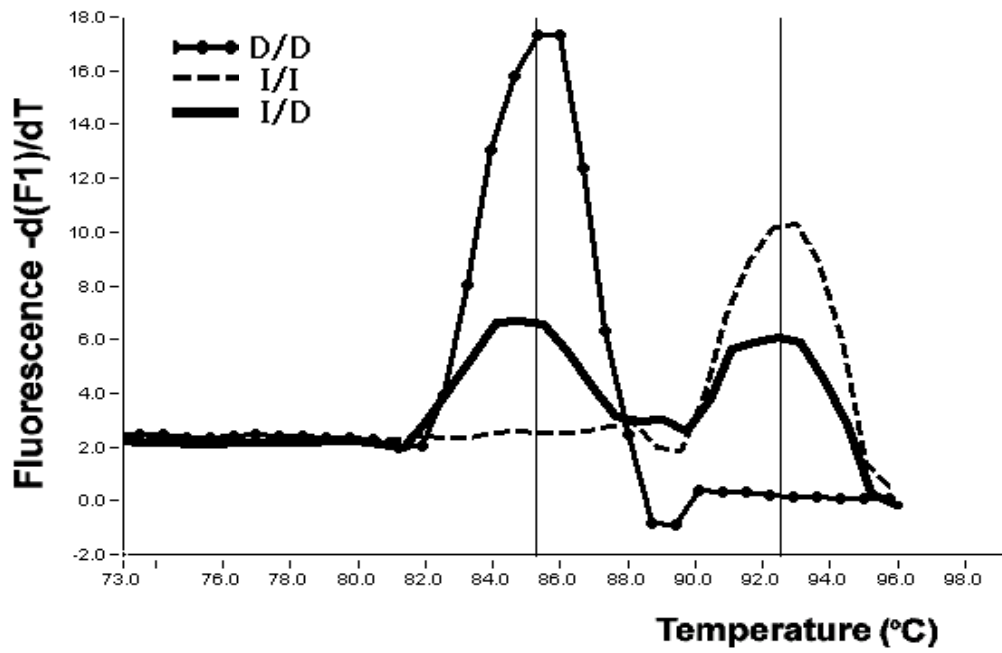


図6 ライトサイクラーの  $T_m$  値の解析  
 490bp(I)と 190bp(D)の PCR 産物では  $T_m$  値で約 7 の差がある。

M 1 2 3

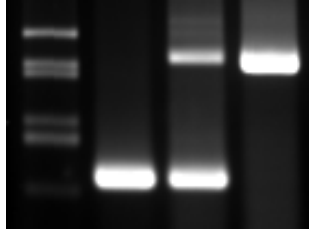


図7 PCR産物の電気泳動

M : 分子量マーカー (pUC18/Hae )

1 : D/D      2 : I/D      3 : I/I