

PCRの基礎□～PCRの基本からピペットの使い方～

◎東 友子¹⁾
金沢大学附属病院¹⁾

【はじめに】PCR (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応) は、DNA 配列上の特定の領域を 1 対のプライマーと耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて増幅する方法である。プライマーは自由に設計することができ、微量な検体 (血液、組織、細菌、ウイルスなど) に含まれるわずかな DNA から特定の配列だけを増やし、目的の微生物 (結核菌やコロナウイルスなど) や遺伝子配列 (融合遺伝子 BCR::ABL など) が検出可能であるため様々な分野で利用されている。

【PCR法の原理】DNA (deoxyribonucleic acid: デオキシリボ核酸) の構造は熱を加えると二本鎖が一本鎖になり、冷やすと二本鎖として元の配列同士が結合する特性があり、PCRはこのDNAの特性を利用して行う。

ステップ1 (熱変性) : DNAに熱を加え (95°C程度) 二本鎖を分離させる。

ステップ2 (アニーリング) : 温度を下げ (55~65°C程度) ターゲット部分にプライマーを結合させる。

ステップ3 (伸長) : 再度温度を上げ (72°C程度) DNAポリメラーゼの作用で新たなDNAが合成される。

この1組の二本鎖DNAから2組の二本鎖DNAができるサイクルを繰り返し、約20サイクル後には100万倍に目的DNAが増幅し、検出が可能となる。

PCRの長所として①簡便かつ迅速にDNA配列の増幅が可能、②一度に多量のサンプルが処理可能、③少量のDNAでPCR施行可能、④再現性が高い、などがある。

PCRの短所としては①プライマーで挟まれた領域のDNA以外は増幅できない、②校正機能がない、目的DNA配列とは塩基配列の異なる産物が増幅される場合がある。③定量性がない。④コンタミネーション (異物混入・汚染) したDNAにプライマーが結合できる領域があるとそのDNAまで増幅してしまう、などである。

【ピットフォール】PCRは1個の分子でも増幅が可能であり、ごく微量のDNA夾雑物でも誤って増幅され擬陽性となり得る。

コンタミの発生原因として①実験室のベンチや機器、ピペッティング装置のDNA調整物やプラスミドDNA、制限酵素断片などによる汚染、②サンプル間のクロスコンタミネーション汚染源由来のコンタミネーション、③前回検査のPCR増幅反応由来産物がある。

コンタミを防止する対策としては実施エリアを物理的に分ける、装置は各エリア内に制限する。PCRの使用試薬は別々に調整し、使用該当エリアに保管する。ピペットなどの使用物品も各実施エリアに専用のものを用いる。開始前の実験台の清拭、サンプル調整などにはエアロゾルフィルター付ピペットチップを用いる。DNaseFreeなどの薄壁PCRチューブを用いる。PCR実験後エリアで使用した試薬、装置、ピペットを実験前エリアに持ち込まない。など基本的な事項を遵守することが正確な検査を行うために大切である。

【注意点】ピペッティング操作はPCRの精度や再現性に大きく関与する。基本的な操作には、チップを浸す深さ、角度、チップのプレリンス、ピペッティングリズムとスピード、吐出などがある。また温度環境やチップの容量対範囲、マクロメーターの設定にも注意が必要である。

【おわりに】遺伝子検査の用途が広がるなか、初心者からベテランまで基本を学ぶことで今後の遺伝子検査の精度向上の一助になれば幸いである。

金沢大学附属病院検査部 076(265)2000(内線 7161)