

デジタル PCR

デジタル PCR の説明の前提として、開発の時系列の関係で PCR とリアルタイムの説明が必要になる。PCR については説明用語に入っているなのでそこで参照して欲しい。PCR に定量性を求めた場合、その問題としては反応回数が多いと反応がプラトーに達するため定量的に確認することができない。さらに、増幅が指数関数的に起こるためどの反応回数でその判断をできるかの予想も困難である。そこで、リアルタイム PCR が開発された。DNA が二本鎖になった時に反応する蛍光物質を反応液に入れてリアルタイムに蛍光強度を測定する。PCR は指数関数的に当該遺伝子の DNA を増幅するため、蛍光強度を検出するには測定可能な範囲内に入り、立ち上がり部分の一次関数に近いところで定量性を判断する。その定量には内部標準としてはアクチンなどハウスキーピング遺伝子を用いるか予めコピー数や増幅性が分かっている遺伝子を反応させて検量線を作成して比較する。つまり、測定は相対定量であるため、標準遺伝子や DNA により結果が変化してしまう場合もありうる。そのため、絶対定量ができる定量 PCR が必要となった。

デジタル PCR はスタート時に多数のウェルに反応液を分散させて PCR を行う。その際に二本鎖 DNA に反応する蛍光物質を入れておくとウェル内にターゲットが入っていれば発色、無ければ無色となり、その数をカウントすることで絶対的な定量が可能となる。もちろん、リファレンスなどは必要とならない。さらに、試料由来の DNA を少量で分散して反応させるため阻害物質による反応の妨げも防げる。また、結果は一次関数的なため少ない増幅量の変化も検出が可能であり、結果、感度を上げることも可能である。

この技術により、ウィルスや遺伝子の絶対定量、希少遺伝子の検出、次世代シーケンサーのためのライブラリーの絶対定量などリアルタイム PCR に対しての利用の幅が広がるとともに正確性が高い手法である。

(内野 昌孝)