

## 液槽式回転型定量 PCR 装置の開発

Development of a liquid- rotary style quantitative PCR system

香川 直己<sup>1</sup>, 村上 竜二<sup>1</sup>, 臼居 美佳<sup>2</sup>, 徳地 千佳<sup>2</sup>, 山口 泰典<sup>2</sup>

Naoki Kagawa<sup>1</sup>, Ryuji Murakami<sup>1</sup>, Mika Usui<sup>2</sup>, Chika Tokuchi<sup>2</sup>, Yasunori Yamaguchi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>福山大学 工学部

<sup>1</sup>福山大学 生命工学部

<sup>2</sup>Department of Electronic and Electrical Engineering, Fukuyama University

<sup>2</sup>Department of biotechnology, Fukuyama University

Abstract: Polymerase-chain-reaction (PCR) method amplifies and reproduces a part of DNA artificially by using enzyme polymerase. This technique is used for the identification of a harmful virus and for monitoring the curative effect for disease-causing germs, etc. Thus the method carries an extremely important role in the field of the dealing with DNA. However, most of the conventional systems process many specimens together simultaneously and this is inconvenience. Therefore, we developed a liquid- rotary style quantitative PCR system. In this report, we performed measurement accuracy evaluation of the system, and comparison of the amplification curve and amplification efficiency with a conventional system.

### 1. まえがき

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR: Polymerase Chain Reaction) 法は DNA を複製させる酵素ポリメラーゼを用いて、人工的に DNA の目的の部分を増幅させるものである。この手法は有害なウイルスの同定や、病原菌に対する治療効果などの定量に用いられ、DNA を扱う分野全般で極めて重要な役割を担っている。

しかし、既存の装置は多検体を一斉処理する方式であるため利便性が悪い。そこで利便性を向上させるために、液槽式回転型定量 PCR 装置を開発した。本稿では開発した装置の計測精度評価を行い、増幅曲線の再現性、増幅効率を既存の装置と比較したのでその結果を報告する。

### 2. システムの概要

#### 2.1 定量 PCR 法

PCR は DNA の 2 本鎖と DNA 合成酵素が特定の温度の熱サイクルで熱変性、アニーリング、伸長の 3 つの反応を起こすことを利用して、DNA の目的の部分を 2 倍に増幅する。各反応の代表的な温度は、それぞれ 95℃、50℃、72℃である。この熱サイクルを正確に繰り返すことで DNA の目的の部分が 2 のべき乗で増幅を利用し、任意の熱サイクル後の DNA 量から検体に含まれる初期の DNA 量を定量するものが定量 PCR 法である<sup>[1]</sup>。

#### 2.2 液槽式回転型定量 PCR 装置の概要

既存の装置の多くは、多検体を一斉に処理するため、1 検体でも測定を始めたなら測定が終わるまで、次の検体を投入することが出来ない。それに対して液槽式回転型定量 PCR 装置は多検体を順送り処理する方式であるため、いつでも測定の開始でき、任意のサイクル数で終了させることが出来るため大幅な利便性の向上が期待できる。

また、既存の定量 PCR 装置が概ね採用する、検体容器をペルチェ素子で加熱冷却する方法では、その速度は 5℃/秒である。そのため、熱サイクル以外の温度に検体が長時間さらされ、DNA 増幅効率の低下や不必要な副反応物の生成を招いている。それに対し、液槽式回転型定量 PCR 装置は液槽を隔壁で 3 つに区切り、PCR 反応の所望する温度の液体を水槽内に満たし、その中を検体が移動する構造にすることで 20℃/秒という急峻な温度変化を実現した。

液槽式回転型定量 PCR 装置の光学計測系は、出射系と受光系の配置により励起光が直接受光素子へ透過することを防ぎ、セルのずれによる受光量の変化を少なくしている。また、液中計測であるが、温水による受信光の擾乱を極力抑えるようにしている。

計測系においては、EMI 対策を十分に施し、同期検波方式、デジタルフィルタにより雑音低減を図った<sup>[2]</sup>。

### 3. 測定実験と性能評価

2倍希釈した5種類のDNA濃度の試料を用いて、同じDNA濃度の検体を各3本、計15本の検体で、液槽式回転型定量PCR装置では、1サイクル60秒として測定を行った。測定結果の横軸をサイクル数、縦軸を蛍光量で規格化し対数表示したのが図1である。蛍光量がDNAの増幅に追従している範囲で、実線で示した理論値と測定値の最大の誤差を生じた場合でも88%、平均で97%の測定確度があり、再現性を確認することができた。

また比較対照としてR社のPCR装置を用い、1サイクル90秒で測定を行った。増幅曲線から1サイクルあたりのDNA増幅の倍率を求め、同じ初期DNA濃度の平均増幅率を表1に示す。原理的には1サイクルあたりDNA増幅率は2倍である。結果より同じ初期DNA濃度であれば、液槽式回転型定量PCR装置とR社のPCR装置は等しい増幅率が得られた。原液をDNA濃度1/1とした場合のDNA初期濃度1/65536の検体では両装置とも増幅率が減少しているが、試料の配合や作製時の環境の影響を受けていると考えられる。

### 4. むすび

本稿では、液槽式回転型定量PCR装置の測定確度評価と、既存の装置と増幅率の比較を行った。液槽式回転型定量PCR装置の性能評価結果から、最大誤差が生じた場合で88%、平均で97%の測定確度があり、再現性を確認することができた。また、R社のPCR装置との比較結果からDNA濃度1/65536の検体以外の増幅率は原理的な2倍に近く、同じ初期DNA濃度の検体からは、両装置とも等しい増幅率が得られ、既存の装置と同等の性能が確認できた。以上のことから液槽式回転型定量PCR装置は定量PCR測定に十分な性能を有すると判断することができ、利便性の向上が期待できる点を加味すると優位性があると言える。

### 参考文献

- [1]林 健志：『PCRの最前線』,羊土社,(1996)
- [2]香川 直己ほか：“定量的ポリミラーゼ連鎖反応法のための微弱蛍光検出系の開発”,第14回計測自動制御学会中国支部学術講演会論文集 ,pp.204-205(2005)

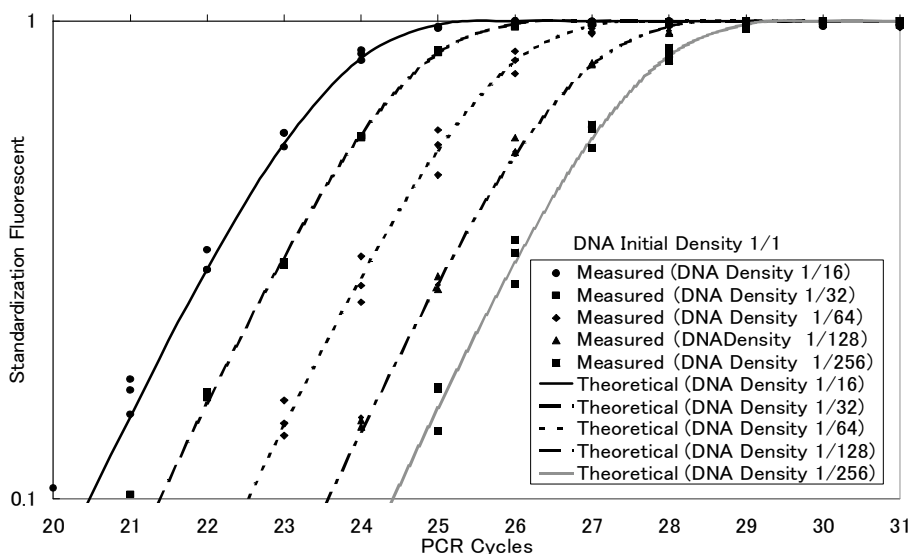


Fig.1 Amplification curves for different density of DNA samples

Table 1. The amplification efficiency of each PCR system.

| DNA Density | Quantitative PCR device<br>amplification efficiency | R company's PCR device<br>amplification efficiency |
|-------------|---|--|
| 1/8192      | 1.917   | 1.915  |
| 1/16384     | 1.863   | 1.883  |
| 1/32768     | 1.990   | 2.000  |
| 1/65536     | 1.776   | 1.783  |