

競合的PCRにおけるバイアス発生メカニズム

まがりやまゆきお
曲山幸生

食総研

目的 競合的PCRは、同じ反応容器中で標的となる核酸（ターゲット）と同時に濃度が既知の参照用核酸（スタンダード）を競合的にPCR増幅させ産物量の比から初期ターゲット濃度を見積もるという方法で、極微量しか存在しない特定の核酸の定量をおこなう際に用いられる。リアルタイムPCRの場合はサイクルごとに産物量を定量するのに対して、競合的PCRは最終産物量だけを定量すればよいので、必要な装置が簡単で低価格になるという利点を持っている。しかし、条件によってはターゲットとスタンダードの濃度比がPCRの前後で異なる（バイアスが生じる）ことがあると報告されており、競合的PCRの定量性は現状では疑問視されている。この研究の目的は、競合的PCRにおけるバイアス発生のメカニズムを第一原理に基づいて理論的に解析し、その結果から信頼できる定量性を持たせるための方策を提案することである。

方法 従来理論ではサイクルごとの増幅効率を仮定することから出発しているのに対して、この研究では化学反応速度論に基づいて解析をおこなった。考慮した反応は、核酸（ターゲット、スタンダード、プライマー）の結合・解離、複製酵素の結合・解離、DNAの伸長である。それぞれの反応速度を反応物濃度、生成物濃度、温度の関数としてあらわした。これにより時間に関する連立微分方程式が得られたので、その解を差分法により数値的に求めた。Microsoft Excel 2002 VBA を用いて計算および結果の記録・表示をおこなった。

結果と考察 従来理論では最大増幅効率を仮定していたが、この理論では速度定数や温度サイクルのパラメーターから決定することができた。蔵田らが示した温度サイクルの条件の違いがバイアスに影響を与えるという現象（論文準備中）も説明することができた。さらに、1サイクルの間の分子数の変化を予想することもできた。これらは従来の理論では本質的に説明不可能なことである。

この理論によれば、ターゲットとスタンダードの濃度が異なるだけでバイアスが生じる。したがって、複数のスタンダード濃度に対して同じ条件で競合的PCRをおこない、それらのデータからスタンダード濃度とターゲット濃度が等しくなる点を回帰的に求め、初期ターゲット濃度を見積もるという方法を推奨する。

謝辞 本研究のきっかけを与えてくださった金川貴博博士と蔵田信也博士に感謝します。

曲山幸生 (maga@affrc.go.jp)