

PCR の迅速化

病理部門

The shortening of time for PCR

Division of Pathology

Abstract

To shorten time for PCR, we found new condition using the equipment and reagent provided as usual. The reaction finished in less than half in compared with previous method. Fast PCR is useful means for the quick and accurate diagnosis.

Key Words : fast polymerase chain reaction (fast PCR) 迅速ポリメラーゼ連鎖反応

1 はじめに

疾病診断や保菌検査等のスクリーニング検査において、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) は従来の培養法と比較し、検査に要する労力や時間を大幅に節約することが可能である。そのため、当所において PCR の重要性が増している。

PCR の反応条件は、特異性や収量を上げるように設定され、当所で用いられている条件の多くは、2 時間前後で終了する。当所では、と畜検査員は午前中現場検査を行うため、細菌検査等の精密検査は午後から行っている。そのため、解体頭数が多い場合や保留と畜が多い場合には、精密検査に充てられる時間が短くなったり、サーマルサイクラーの使用が重複したりすることにより、精密検査の判定が遅れる場合がある。

近年、PCR の反応時間を従来の半分以下に短縮するためのプロトコル (fast PCR) に適した機器や試薬が販売されている。これらの機器や試薬はランプ速度の上昇や各工程の反応時間を短縮することで、反応時間の短縮を可能としている。しかし、これらの特別な機器や試薬を使用しなくても、反応条件を変えるだけで、fast PCR が可能であるという報告がされている⁽¹⁾。

そこで、今回、当所において、疾病の補助診断として PCR を行っているサルモネラ菌、抗酸菌、牛白血病、豚丹毒菌及び豚赤痢菌並びに保菌検査等スクリーニング検査として PCR を行っているカンピロバクター菌を検体とし、fast PCR を試みた。

2 材料及び方法

当所で分離されたサルモネラ菌、抗酸菌、牛白血病ブドウウイルス、豚丹毒菌、カンピロバクター菌及び豚赤痢菌を検体として用いた。プライマーの配列、GC 含量、融

解温度 (melting temperature ; Tm) 及び増幅産物の長さを表 1 に示した。Tm は Breslauer ら (1986)⁽²⁾ 及び Rychlik ら (1990)⁽³⁾ に従い算出した。PCR 反応は DNA Engine PTC-200 (BIO-RAD) を使用し、ポリメラーゼには Takara ExTaq (TaKaRa) を用い、当所で従来使用されている条件 (従来法) 及び fast PCR (98°C で 30 秒間インキュベート後、92°C で 1 秒間及び 70°C で 15 秒間を 35 サイクル、その後 72°C で 1 分間) を行い、増幅の有無を確認した。増幅されなかった検体については条件の最適化を Sullivan ら (2006)⁽¹⁾ に従って行った。

3 結果

今回、調査に供した検体すべてにおいて時間の短縮が可能であり (表 2)、豚丹毒菌を除くと、1 時間以上の短縮が可能であった。特に、検査に nested PCR を必要とする牛白血病では、検査時間を 2 時間以上短縮することができた。

4 考察

通常の PCR は、熱変性、アニーリング及び伸長反応の三つの工程 (three-step PCR) から構成される。しかし、多くのプライマーに適したアニーリング温度 (55-70°C) において、大半のポリメラーゼは高度に活性化しているため、アニーリング及び伸長反応工程を一つにまとめ、二工程 (two-step PCR) にすることが可能であることが多い⁽¹⁾。three-step PCR から two-step PCR にすることで、大幅に時間を短縮することができる。また、各工程の反応時間を短くし、工程間の温度差を小さくすることで、さらに時間の短縮が可能である⁽¹⁾。今回の調査では、既存のプライマー、機器及び試薬を用いて、fast PCR の最適な条件を検討した。

使用した機器及び試薬は従来の PCR に汎用されている

表 1 プライマーの塩基配列, Tm, GC 含量及び増幅産物

	primer sequences	Tm	GC (%)	amplified product (bp)
サルモネラ菌	tatcgccacgttcgggcaa ⁴⁾	67.95	51	275
	tgcaccgtcaaaggaacc ⁴⁾	64.49	57	
抗酸菌	cagccagccgaatgtcatcc ⁵⁾	66.24	60	300, 1776*
	caactcgcgacacgttcacc ⁵⁾	65.16	60	
豚丹毒菌	agatccatagaaactggtg ⁶⁾	52.38	40	407
	ctgtatccgcataacta ⁶⁾	49.32	44	
牛白血病 (1st PCR)	tctgtccaagtctcccagata ⁷⁾	62.09	50	598
	aacaacaacctctgggaagg ⁷⁾	62.52	52	
牛白血病 (2nd PCR)	cccacaaggcggcgccggtt ⁷⁾	79.35	73	444
	gcgaggccgggtccagagctg ⁷⁾	74.61	76	
カンピロバクター菌	tattccaataccaacattagt ⁸⁾	47.85	28	491
	cttcgctaagtctaacc ⁸⁾	53.56	50	
豚赤痢菌	actaaagatcctgatgtattg ⁹⁾	50.51	31	354
	ctaataaacgtctgctgc ⁹⁾	49.28	44	

*1776bp の増幅産物は過去3年間に分離された抗酸菌から増幅されていないので、今回の調査では対象外とした。

表 2 従来法と fast PCR の所要時間, 短縮時間及び fast PCR の条件

	所要時間		短縮時間	熱変性 (°C)	アニーリング・ 伸長反応(°C)
	従来法	fast PCR			
サルモネラ菌	1:52:05	0:38:34	1:13:31	92	68
抗酸菌	1:53:04	0:40:29	1:12:35	94	68
豚丹毒菌	1:07:12	0:46:25	0:20:47	93	60
牛白血病 (1st PCR)	1:55:54	0:36:25	1:19:29	92	72
牛白血病 (2nd PCR)	1:48:57	0:36:25	1:12:32	92	72
カンピロバクター菌	1:52:05	0:45:30	1:52:05	92	60
豚赤痢菌	1:54:05	0:49:15	1:04:50	95	58

ものであり, fast PCR 用に最適化されたものではないが, 全ての検体において PCR の迅速化が可能であった(表 2)。Sullivan ら (2006) ⁽¹⁾ の報告どおり, 反応条件の変更のみで, 大幅な時間の短縮が可能であり, 感度についても, 従来法と同等であった。

fast PCR に用いるプライマーの最適な Tm は 70°C であり, 58°C 以上が推奨されている。今回, 病原菌の検出に用いたプライマーのうち, 豚丹毒菌, カンピロバクター菌及び豚赤痢菌検出用プライマーは, fast PCR に用いるプライマーとしては Tm が著しく低く, fast PCR に適していない。そのため, PCR の反応過程の温度差(熱変性温度とアニーリング温度・伸長反応温度)が大きくなり, 短縮時間も短かった。これらの病原菌では, 他の文献を

参照あるいは DDBJ などのデータベースを利用することにより, Tm が高いプライマーを設計し, より迅速かつ安定した PCR を行えるようにする必要があると考えられた。

fast PCR を行うことにより, DNA 抽出, PCR, 電気泳動までの一連の検査を 2 時間以内に行うことが可能であり, 当所の検査体制においても, 当日中に検査を行うことができると考えられた。また, 検出感度・特異性を大きく高めることができる nested PCR において, 大幅な時間の短縮が可能であることから, 迅速・正確な診断のために fast PCR は有用な手段であると考えられた。

5 参考文献

- (1) Sullivan D., Fahey B. and Titus D. : BioRadiations, **7**, 22-27 (2006)

- (2) Breslauer KJ., et al. : Proc Natl Acad Sci USA, **83**, 3746-3750 (1986)
- (3) Rychlik W., et al. : Nucleic Acid Res, **18**, 6409-6412 (1990)
- (4) 田栗利紹, 野口英太郎, 平山文俊 : 長崎県衛生公害研究所報, **48**, 43-56 (2002)
- (5) Nishimori K., Eguchi M., Nakaoka Y., et al. : J. Clin. Microbiol, **33**, 2102-2106 (1995)
- (6) Makino S., Okada Y., Murayama T., et al. : J. Clin. Microbiol, **32**, 1526-1531 (1994)
- (7) Fechner H., Blankenstein P., Ebner D., et al. : Virology, **237**, 261-269 (1997)
- (8) Fermer C. and Engvall E.. O. : J. Clin. Microbiol., **37**, 3370-3373 (1999)
- (9) Tom La, Nyree D. Phillips, and David J. Hampson : J Clin Microbiol, **41**, 3372-3375 (2003)