

- 本当は怖いリアルタイム PCR -

農学研究院 研究教育支援センター 鶴木（加藤）陽子

【はじめに】 リアルタイム PCR は、遺伝子の発現量を簡便・迅速・正確に定量できる方法として近年急速に普及しています。しかし、感度が高い事もあり、サンプルの調製やその扱い方、また得られたデータのまとめ方などによって間違った結果になる危険性も高いのです。本発表では、私が実際に経験したリアルタイム PCR での怖い体験をご紹介します。

【怖い体験】 6つの異なる条件で飼育した魚各6尾で、ある遺伝子の発現量に差があるのか？という実験を行いました。1サンプル3wellで行うとサンプル数が多くなり、測定は2プレート（2回）に分かれました。プレート間の測定誤差をなくすため、検量線作成用の standard template（目的遺伝子既知量）をそれぞれのプレートに設け、また、始めのプレートと同じサンプル1つ（3well）を2プレート目にも設けました。測定後、それぞれのプレートで得られたデータを①～③の方法でまとめました。①プレート間の補正なし：各プレートに設けた standard template によりそれぞれの検量線を作成して目的遺伝子を定量し、得られたデータをそのまま利用したもの。② standard template で補正：2プレート目の検量線が1プレート目のそれと互換性が取れるようにしたもの。③ plate 間に設けた同じサンプルで補正。すると、困った事にそれぞれ異なるグラフになりました（Fig. 1）。やり方としては実はどれも間違っていないが、一体どれが本当の結果なのでしょう？そこで、1サンプル1wellにして

すべてを1枚のプレートに納め、再測定しました。結果は③のグラフに近似しました。問

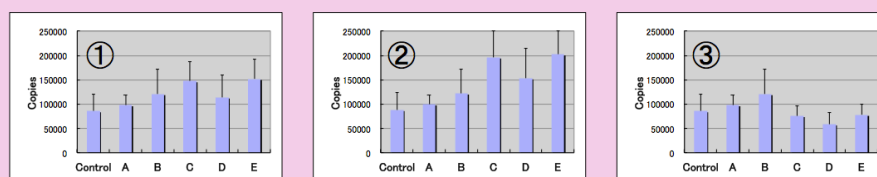


Fig. 1

題は standard template にあったようです。よく見れば増幅曲線の立ち上がりは1プレート目よりもわずかに遅れていた事などから、既知量入っているはずの standard template が、2プレート目を準備しているわずか2時間の間におそらく容器壁面への吸着などにより減少したためと推測されます。この問題の具体的対策として、シリコナイズしたチューブを用いる事や、容器への吸着を阻害しサンプルを安定に保つ専用の希釈 buffer（Easy Dilution Buffer (Takara Bio 社)など）を用いる方法などがあり、現在演者は後者を使用することにより安定した結果を得る事ができるようになりました。

しかし、この事件の最も恐ろしい点は、3つの解析方法を試さなければもしかしたらこの問題に気づかなかつたかもしれない事です。同様な解析を行う方々におかれましては、本発表によりリアルタイム PCR の怖さを実感していただけるのではないかと期待します。また、リアルタイム PCR に限らず、他の測定方法や他分野の実験においても今回のような予測できない問題は潜んでいると思います。その事に気づく事ができるのかどうか、また、best な結果を得るためにどのような実験を組んだらいいのか等、本発表が皆様の日々行う業務で何かしらの参考になりましたら幸いです。

References

- Bustin, S. A., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.
- Bustin, S. A., et al. (2013). The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nature Methods*, 10(11), 1063-1067.