総説

化学修飾プライマーを使ったPCRモニタリングシステム

武井 史恵

大阪大学・産業科学研究所・精密制御化学研究分野

要旨：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は酵素によりDNAを増幅する方法であり、バイオテクノロジーの分野で幅広く使われている。PCR法は極めて微量なDNAをテンプレートとして、特定の領域を温度コントロールだけで指数関数的に増幅する。単にDNAを増やすだけでなく遺伝子の配列解析にも使用される。この総説ではPCRで使われるDNA断片（プライマー）に着目し、目的に合わせた様々な修飾プライマーを使ったPCRについてまとめる。更に得られた増幅産物の解析にも注目し、修飾プライマーを使ったPCRからそのモニタリング法についてPCRを化学の視点から眺め、総合的に紹介する。

キーワード：ポリメラーゼ連鎖反応、一塩基多型、ヘアピンプライマー、蛍光分子、DNA

はじめに

一塩基多型（Single nucleotide polymorphisms: SNP）とはDNAの塩基配列の個人差（遺伝子多型）の一種で、ゲノム中の一塩基が変異した多様性をもつことである。SNPの解析により、個人別のテラーメイド医療や予測医療への可能性が広がると期待されている（Wang et al. 1998）（Figure 1）。SNPでは、野生型と呼ばれる従来からの塩基配列と、変異型と呼ばれる野生型から他の3種類の塩基に変異した配列が存在する。このSNPの配列の違いによって、病気になりやすさの違いや外見、性格等の表現系の違い、薬や食物に対する応答性の違いなどが現れる。SNPの解析方法は実験室レベルでは数多く報告されているが、実用化されたものは数少ない。実際の医療現場においては、得られる遺伝子の量はごく微量であるため、得られた遺伝子をそのまま使ってSNP解析することは不可能に近い。そこでDNAポリメラーゼと呼ばれる酵素を使ったポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction）を使ってあらかじめ遺伝子を増幅し、解析する方法がとられている。PCR法は1980年代半ばに発見され、現在ではバイオテクノロジーに欠くことのできない手法となっている（Mullis et al. 1987）。PCR

法は極めて微量なDNAをテンプレートとして特定の領域を温度コントロールだけで指数関数的に増幅する方法である。標準的なPCRを説明すると、PCR溶液中に標的となるDNA、プライマーと呼ばれる特定領域を増幅するためのDNA断片4種類のヌクレオチド三リン酸（dNTPs: NはA, T, C, G）、そしてDNAの増幅酵素を混合し、温度制御を行

遺伝子の多様性

遺伝子の働きの質的、量的な違い

例えば表現系の違い（外見）、病気になりやすさ、
薬剤に対する応答性の違い

Figure 1. 一塩基多型（Single nucleotide polymorphisms: SNP）

Correspondence: Fumie Takei, f-takei@saneken.osaka-u.ac.jp

武井 史恵：〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘8-1

大阪大学産業科学研究所

掲載受理日：2013年10月25日

う。まずは高温（95℃）にして標的となる二重鎖DNAを一本鎖DNAとし、次に温度を下げてプライマーをそのテンプレートに結合させる。続いて酵素の至適温度（95℃）まで溶液の温度を上げ、酵素を使ってプライマーを伸長させる。この操作で得られた二重鎖DNAを再びテンプレートとして高温で一本鎖にし、再びプライマーを用いて複製する（Figure 2）。この操作を繰り返すことでDNAの効率的な増幅ができる。PCR法によって得られた増幅産物は、DNAに結合する蛍光分子を使った方法や、ポリアクリルアミドゲルを使った電気泳動（Patton 2002）、TaqManプローブ（Heid et al. 1996）やモレキュラービーコン（Kostrikis et al. 1996）と呼ばれる配列特異的なプローブDNAを用いた検出法により、目的とする遺伝子の有無が調べられている。これらの一塩基の配列分析にはテンプレートとプライマー（あるいはプローブ）のマッチ、ミスマッチ配列のわずかな違いを検出するために、高度に最適化されたDNAプローブやプライマーの設計が必要となっている。また必要に応じて増幅酵素の改変も行われ、より配列認識能が高い酵素が開発されている（Summerer et al. 2005）。

この総説では、PCRを使った遺伝子検出法、SNPタイピング法に注目し、数ある方法の中でも特に化学修飾されたプライマーを使った遺伝子検出法について紹介する。主に既知の変異塩基配列に相補的なプライマーを用いて行うアレル特異的PCR（Allele specific PCR）を使ったSNPタイピングに焦点を絞って紹介する（Newton et al. 1989）。

1. 化学修飾したプライマーを使ったPCRモニタリング法

PCRを行う際にはプライマーと呼ばれるDNA断片が必要となる。このプライマーの5'末端を化学修飾し、PCRの進行のモニタリングに使用する。化学修飾したプライマーは、その使用目的によって次の2種類に大別される。1つは遺伝子の増幅産物の単離、洗浄などの分離に利用されるアフィニティー-キャプチャー（Affinity-capture: AC）としての利用（Bevan et al. 1992）、もう1つは遺伝子検出の際に、化学修飾部をシグナル源として使う方法である。

Figure 2. PCRの概要。(a) PCR溶液の組成、(b) 遺伝子増幅の際のPCRの温度変化、(c) PCRの温度変化による増幅反応の詳細

Figure 3. アフィニティーラベルプライマーを使ったPCR。(a) ビオチン-アビジンによるPCR増幅産物の分離、(b) 金-チオールの相互作用を使ったPCR増幅産物の解析

Figure 4. (a) *L*-DNAタグを持つプライマーを使ったPCR、(b) *L*-DNAを固定化した基盤を使ったSPRによるSNPタイピング、(c) G/Gホモ接合体、(d) G/Tヘテロ接合体、(e) T/Tホモ接合体

1) アフィニティーラベル-プライマーを使ったモニタリング法

ACは、ホスト分子（キャプチャー分子）と親和性を持つアフィニティー分子同士の強い相互作用を使った分子の固定化法で、アフィニティータグを持つプライマーを使ってPCRを行うと、キャプチャー分子との親和性によって、PCR増幅産物のみの単離、精製、そして解析が簡単に行える。例えば、ビオチン修飾されたプライマーを用いてPCRを行い、得られた増幅産物とアビジンで被覆されたビーズとを混合すると、ビオチン修飾された増幅産物のみがアビジンに選択的に結合する。この結合は強固なため、得られたDNAをビーズ上で一本鎖DNA (ssDNA) に変成し、精製することで、5'ビオチンラベル一本鎖DNAのみを単離できる (Mitchell et al. 2009) (Figure 3)。

チオールもまたアフィニティータグとして使われる。チオールラベルプライマーを使ったPCRの増幅産物は、金をキャプチャーとした金-チオール相

互作用によって精製可能である。更にPCRが進行しているか否かも、金ナノ粒子の凝集に伴う色の変化によって簡単に判別できる。チオール基を5'末端に持つテンプレートと相補的なプライマーを使ってPCRを行い、増幅産物と金ナノ粒子を混合すると、増幅産物上のチオールと金ナノ粒子の結合により金ナノ粒子がDNAに覆われて、金同士の凝集が妨げられ、溶液は赤色を示す。一方、3'末端がテンプレートと非相補的な配列のプライマーではPCRが進行せず、金ナノ粒子は凝集して青色となる。このように肉眼でも識別可能な溶液の色の変化によって、PCRの進行を簡単にモニタリングすることが可能になった。(Jung et al. 2011)。

一方、有機分子や相補的な核酸塩基と相互作用を示すDNAもしくはRNAもまた、核酸同士の親和性を利用したACとしても使用可能である。我々が普段DNAと呼んでいる天然型の*D*-DNAは配列認識特異性、分子間相互作用が高いことが知られている。*D*-DNAと鏡像異性体である*L*-DNAもまた、

Figure 5. *L*-DNAタグを持つプライマーを使ったPCRとその増幅産物の蛍光検出

Figure 6. SPRのセンサーチップ上にNCDを固定化した基盤を使ったPCR増幅産物の解析. (a) グアニン-NCD複合体、(b)、(c) 10回繰り返しのTGGリピート配列タグを持つプライマーを使ったPCRとSPRを使ったSNPタイピング。

DNAの配列特異性認識能や二重鎖形成能を持つ。しかし、*D*-DNAを増幅する酵素は*L*-DNAを認識できない。この性質を利用すれば*L*-DNAをタグとする*D*-DNAをプライマーとしてPCRを行うと、PCRが進行したか否かをタグとなる*L*-DNAの性質を用いて簡単に識別できる (Figure 4a)。*L*-DNAをタグとする2種類のアレル特異的*D*-DNAプライマーを用意してPCRを行い、得られた増幅産物を表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance: SPR) によって解析した。その結果、DNAの増幅に使われたプライマーの*L*-DNAタグとSPRセンサーチップ上の*L*-DNAアレイが相補的な場合のみ、選択的に増幅産物の検出が可能であった (Figure 4b) (Hayashi et al. 2007)。また*L*-DNAタグを持ったアレル特異的プライマーを用いると、ホモ接合体 (T/T及びG/G) のみならずヘテロ接合体 (T/G) も検出できることが明らかとなった (Figures 4c-4d) (Hayashi et al. 2008)。

またこの*L*-DNAタグを持つPCR増幅産物は蛍光でも検出できる。Hauserらは、5'末端に*L*-DNAタグを持つSNPサイトから一塩基上流までのプライマーを用意し、デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) の代わりに蛍光ラベル化したジデオキシヌクレオチド三リン酸ddNTPを使ってPCRを行い、SNPサイトの相補的な塩基として蛍光修飾された塩基を導入し、その蛍光によって遺伝子検出を行った (Figure 5)。この方法では、プライマーそれぞれに異なる配列の*L*-DNAタグを付け、また検出

チップ上にもプライマーのタグの配列に相補的な*L*-DNAアレイを使うことによって、遺伝子の多数同時検出が可能となった (Hauser et al. 2006)。

また、DNA特殊構造に特異的に結合する分子もまた、ACとして利用できる。ナフチリジンカルバメートダイマー (NCD) がグアニン-グアニン (G-G) ミスマッチに特異的に結合する性質を使い (Nakatani et al. 2005) (Figure 6a)、10回繰り返しのTGGリピート配列のタグを持つプライマーを使ってPCRを行うと、PCR前にはG-Gミスマッチ配列にNCDが結合するが、PCRが進行するとG-Gミスマッチの部分には相補的な配列、シトシンが導入されるためにG-Gミスマッチを形成できない (Figure 6c)。SPR上にNCDを固定化したチップを使い、PCR前後の溶液を分析すると、シグナルに大きな変化が見られ、この方法でもPCRのモニタリングが可能であることが示唆された (Peng et al. 2006) (Figures 6b, 6c)。

2) 蛍光を使ったPCRモニタリング法

今まで述べたACを使った方法では、PCRが進行しているか否かを判断するために、ポリアクリルアミドゲルを使った電気泳動や、キャプチャー分子の基板への固定化が必要であり、分析に手間と時間がかかる。そのため実用化を目指す場合、操作の煩雑さから、均一系を使うのが理想的である。特に蛍光はその検出感度の高さ、簡便さから最も使われている検出法である。この蛍光を使った検出法は、

Figure 7. 蛍光分子を共有結合によりDNA上に導入したプライマーを使ったPCR (a) ヘアピン型プライマー、(b) ユニバーサルなヘアピンプライマーとタグを持つプライマー、(c) cyclicon プライマー、(d) フォワードとリバースプライマーそれぞれに蛍光分子を結合させたプライマーを使ったPCR。

1) 蛍光分子を直接プライマーもしくはプローブに共有結合させ、PCRの進行に伴う蛍光変化を観測する方法と、2) 蛍光分子がDNAの配列、構造を認識して非共有結合でDNAに結合し、PCRの進行中のDNAの変化によってもたらされる蛍光強度変化を測定する方法が挙げられる。蛍光検出法では、Förster resonance energy transfer (FRET) という原理が使われる (Ranasinghe et al. 2005, Guo et al. 2012)。このFRETは近接した2個の発色団が互いに相互作用を起こし、発色団の間で励起エネルギーが直接移動する現象である。プライマーの5'末端にタグとしてヘアピン構造を持つ発色団 (蛍光分子Fと消光分子Qの両方が付いている) を導入したプライマーを使ってPCRを行うと、PCRの進行に伴い、この隣接した発色団を持つヘアピン構造は消失して二重鎖DNAとなる (Nazarenko et al. 1997) (Figure 7a)。この時、発色団同士の距離は広がり、消光剤Qによって消光されていた蛍光分子Fは蛍光を発し、結果として蛍光によるPCRのモニタリングが可能となる。シンプルなヘアピンプライマーを使った方法の他に、ヘアピン構造を持つプライマーをユニバーサルなプローブとして使う方法も報告されている (Nuovo et al. 1999) (Figure 7b)。この他にも2種類のDNAのそれぞれの5'末端が結合した

cycliconと呼ばれるプライマーを使った遺伝子検出法や (Kandimalla et al. 2000) (Figure 7c)、フォワードとリバースプライマーに結合した蛍光分子の距離がPCRによって縮まり、FRETをおこす方法などもある (Ahmad et al. 2007) (Figure 7d)。このようにFRETを使ったSNPタイピング法は数多く報告されている。

一方、蛍光分子がDNAの特殊構造に特異的に結合する性質を用いて、DNAとその蛍光分子でアレル特異的プライマーをラベル化しPCRの進行をモニタリングする方法もある。我々が開発したヘアピンプライマーPCR法 (HP-PCR法) は、蛍光分子がプライマーのタグに非共有結合し、PCRの進行に伴うプライマーの構造変化による蛍光変化をモニタリングする方法である (Takei et al. 2009)。N,N'-bis(3-aminopropyl)-2,7-diamino-1,8-naphthyridine (DANP) はDNAのシトシンバルジ構造に特異的に結合して複合体を形成する (Suda et al. 2005) (Figures 8a, 8b)。この複合体のUVスペクトルは、結合していないDANPのUVスペクトルよりも約30 nm長波長シフトし、約400 nm付近に最大吸収波長を示す。また蛍光波長も約30 nm長波長シフトする。この400 nmの最大吸収波長を使って、PCRの進行をモニタリングすることを考えた。則

Figure 8. (a) DNAのシトシンバルジ構造とDANPとシトシンバルジ構造の結合の模式図。(b) DANP、DANP-シトシンバルジ構造複合体のUVスペクトル。(c) HP-PCR法の概要：シトシンバルジ構造を持つプライマーにDANPが結合し、蛍光が増大する。PCRが進行するに従い、シトシンバルジ構造（DANPの結合部位）が消失する。DANPが遊離し、蛍光の強度が減少する

Figure 9. CPを使ったHP-PCR法。(a) HPがテンプレートと相補的でCPがテンプレートと非相補的な配列の場合、HPが消費されるため、PCRの進行に伴って蛍光強度は減少する。(b) HPがテンプレートと非相補的でCPがテンプレートと相補的な配列の場合、CPが消費されるため、PCR進行しても蛍光強度に変化は見られない。(c) Allele Cの検出におけるCPの影響。左：CP無し、右：CP有り。CPの存在によって2種類のアレル特異的プライマーを使用した時のPCRの蛍光強度に差が生じる。Y軸：蛍光強度、X軸：PCRサイクル数

ち、複合体を形成したDANPは400 nmで励起すると強い蛍光を示すが、結合していないDANPの蛍光は弱い。ヘアピン構造を使って、シトシンバルジ構造を形成するタグを5'末端に持つプライマーとDANPとを混合すると、DANPとDNAの複合体が形成され、400 nmで励起すると高い蛍光強度を示す。PCRの進行に伴いヘアピン構造が消失するため、複合体の量が減り400 nmで励起した時の蛍光強度が減少する (Figure 8c)。このHP-PCR法を用いて、チトクロムP450のサブタイプ2C9*3のSNP (A/C) タイピングを行い、この方法の有効性を実証した。テンプレートに対して相補的、非相補的な二種類のプライマーを使うと、マッチ、ミスマッチにより蛍光強度変化が起こるPCRサイクル数に差が生じ、HP-PCR法によって、アレル特異的PCRの進行がモニタリングできることが明らかになった。

さらにこのHP-PCR法は簡単にアレル特異性を上げることが可能である。HP-PCR法はヘアピンタグに結合するDANPの蛍光強度を測定し、消費されるプライマーの量をモニタリングする方法である。そのため、ヘアピンタグを持たないプライマーが消費されても、蛍光強度変化は起こらない。そこで、ヘアピンタグを持たないコンペティタープライマー (CP) を共存させて、ミスマッチのプライマーが起こすミスリーディングを防ぐことを考えた (Figures 9a, 9b)。実際にCPを共存させてアレル特異的PCRを行うと、CPが存在していない場合に比べて劇的にアレル特異性が上がることが明らかとなった (Figure 9c)。またホモ接合体 (A/AまたはC/C) だけでなくヘテロ接合体 (A/C) の検出も可能であることが分かった (Takei et al. 2011)。

このHP-PCR法はその単純な原理のため、殆ど全てのPCR技術に応用可能である。現在ウイルス感染の確定診断は、ウイルス量が少なく検査ができないウィンドウ期間が短いPCR法が、世界保健機構 (WHO) により推奨されている。我々はHP-PCR法と蛍光分子を組み合わせ、高感度且つ簡便な感染現場で使用できるウイルス検出法の開発を目指した。現在、110ヶ国以上で風土病となっているチクングニア熱の検出をこのHP-PCR法で行った。RNAからDNAへの逆転写、そしてPCRを一本のチューブ内で行った結果、95%以上の確率で、感染患者からのウイルスを検出することができた。また、チクングニア熱以外のウイルスが夾雑していても、チクングニア熱ウイルスのみが検出された (Chen et al. 2013)。今まで行われている血清診断

や、抗体検査に比べて極めて短い時間で検出が行え、簡便、安価な診断方法としての実用化が期待できると同時に、他のウイルス検出にも適用できる可能性が示された。

おわりに

今まで述べてきたように、PCRは単に遺伝子を増やすだけではなく、生物、植物の遺伝子検出、またウイルス検出と非常に広範囲に渡って使われている。今回述べた、プライマーを目的に応じて化学修飾し、効率的にPCR増幅産物を単離、分析する方法は、タグとなる修飾部位に化学的な知見に基づいた修飾が施されている。今後も更にいろいろな化学結合、化合物の性質を使った高性能で実用的な修飾プライマーを使った遺伝子検出法の開発が行われ、これに伴う基礎化学の分野の発展にも期待が持てる。この総説がPCRを知る上で少しでも参考になれば幸いである。

謝辞

この総説中で私が行った研究は、大阪大学産業科学研究所 精密制御化学研究分野 中谷研究室で行われたものであり、中谷和彦教授をはじめとし、スタッフの皆さんそして学生の皆さんに厚くお礼申し上げます。

文献

- Ahmad AI and Ghasemi JB (2007) New FRET primers for quantitative real-time PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 2737
- Bevan IS, Rapley R and Walker MR (1992) Sequencing of PCR-amplified DNA. *Genome Res.* 1: 222-228
- Chen H, Takei F, Koay ES-C, Nakatani K and Chu JJ (2013) A novel DANP-coupled hairpin RT-PCR for rapid detection of Chikungunya virus. *J. Mol. Diagn.* 15: 227
- Guo J, Ju JY and Turro NJ, (2012) Fluorescent hybridization probes for nucleic acid detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 402: 3115-3125
- Hayashi G, Hagihara M, Kobori A and Nakatani K (2007) Detection of L-DNA-tagged PCR products by surface plasmon resonance imaging. *ChemBiochem* 8: 169-171
- Hayashi G, Hagihara M and Nakatani K (2008) Genotyping by allele-specific L-DNA-tagged PCR. *J. Biotech-*

- nol. 135: 157-160
- Hauser NC, Martinez R, Jacob A, Rupp S, Hoheisel JD and Matysiak S, (2006) Utilising the left-helical conformation of L-DNA for analysing different marker types on a single universal microarray platform. *Nucleic. Acids Res.* 34: 5101
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994
- Jung YL, Jung C, Parab H, Cho DY and Park HG (2011) Colorimetric SNP genotyping based on allele-specific PCR by using a thiol-labeled primer. *Chembiochem* 12: 1387-1390
- Kandimalla ER and Agrawal S (2000) Cyclicons' as hybridization-based fluorescent primer-probes: Synthesis properties and application in real-time PCR. *Bioorg. Med. Chem.* 8: 1911
- Kostrikis LG, Tyagi S, Mhlanga MM, Ho DD and Kramer FR (1998) Molecular beacons—Spectral genotyping of human alleles. *Science.* 279: 1228-1229
- Mullis KB and Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain-reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- Mitchell LG and Merril CR (2009) Affinity generation of single-stranded DNA for dideoxy sequencing following the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 81: 210-217
- Nakatani K, Hagihara S, Goto Y, Kobori A, Hagihara M, Hayashi G, Kyo M, Nomura M, Mishima M and Kojima C (2005) Small-molecule ligand induces nucleotide flipping in (CAG) (n) trinucleotide repeats. *Nat. Chem. Biol.* 1: 39
- Nazarenko IA, Bhatnagar SK and Hohman RJ (1997) A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic. Acids. Res.* 25: 2516-2521
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC and Markham AF (1989) Analysis of any point mutation in DNA—The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic. Acids. Res.* 17: 2503-2516
- Nuovo GJ, Hohman RJ, Nardone GA and Nazarenko IA (1999) In situ amplification using universal energy transfer-labeled primers. *J. Histochem. Cytochem.* 47: 273-279
- Patton WF (2002) Detection technologies in proteome analysis. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 771: 3-31
- Peng T, Dohno C and Nakatani K (2006) Mismatch-binding ligands function as a molecular glue for DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 5623
- Ranasinghe RT and Brown T (2005) Fluorescence based strategies for genetic analysis. *Chem. Commun.* 5487-5502
- Suda H, Kobori A, Zhang JH, Hayashi G and Nakatani K (2005) *N,N'*-Bis(3-aminopropyl)-2,7-diamino-1,8-naphthyridine stabilized a single pyrimidine bulge in duplex DNA. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 4507
- Summerer D, Rudinger NZ, Detmer I and Marx A (2005) Enhanced fidelity in mismatch extension by DNA polymerase through directed combinatorial enzyme design. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 4712-4715
- Takei F, Igarashi M, Hagihara M, Oka Y, Soya Y and Nakatani K (2009) Secondary-structure-inducible ligand fluorescence coupled with PCR. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48: 7822
- Takei F, Igarashi M, Oka Y, Koga Y and Nakatani K (2012) Competitive allele-specific hairpin primer PCR for extremely high allele discrimination in typing of single nucleotide polymorphisms. *Chembiochem* 13: 1409
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen NP, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M and Lander ES, (1998) Large-scale identification mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-1082

PROFILE

武井史恵 大阪大学産業科学研究所・助教
 〔経歴〕〈学歴〉平成5年3月東邦大学理学部化学科卒業（指導教員：山本育宏教授），平成12年3月学位論文提出により学位取得（博士（理学））（東邦大学）
 〈職歴〉平成5年4月大阪大学産業科学研究所機能分子科学研究部門（高橋成年教授）教務職員，平成19年4月大阪大学産業科学研究所機能分子科学研究部門（中谷和彦教授）助教，平成21年4月大阪大学産業科学研究所第3研究部門（部門名変更）助教，この間平成23年1月～4月ドイツ Konstanz 大学客員研究員（Prof. A. Marx）
 〔専門〕核酸化学，有機合成化学
 〔E-mail〕 f-takei@saneken.osaka-u.ac.jp

The PCR Monitoring System Using Chemical Modified Primers

Fumie Takei

Department of Regulatory Bioorganic Chemistry,
The Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR), Osaka University,
Mihogaoka, Ibaraki-shi, Osaka, 567-0047, Japan

Abstract: Polymerase chain reaction (PCR) is the most convenient and direct method for analyzing and manipulating DNA and RNA. PCR needs polymerase, templates, and primers. In this review, we focus our attention on the chemistry of PCR primers. Because PCR is a basic technology in biology research fields, we sometimes use chemically labeled primers without any awareness of the chemistry they leave behind. In this primer designing, there are a lot of potential for different chemistry ideas and much study is still necessary to advance PCR for single-nucleotide polymorphism (SNP) typing, genetic diagnosis, and other fields. We provide an overview of the labeling chemistry of PCR primers, especially the concept and its application to SNP and gene typing, and show a new type of PCR monitoring system in here.

Key words: *polymerase chain reaction, SNP typing, enzyme, fluorescence, DNA*