

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Removerを用いたcDNA特異的検出例 -夾雑ゲノムDNA除去性能の確認-

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 杉山 明生

はじめに

リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析実験では、cDNAのみを検出することが重要です。多くの場合、エキソンジャンクションを挟む位置にプライマーを設計することで、鋳型RNAに混入したゲノムDNA (gDNA) に由来する増幅を回避することができます。しかしながら、cDNA特異的なプライマーが設計できないためにgDNAに由来する増幅が起こり、特に低発現遺伝子の研究などにおいて、発現量が正確に解析できない場合があります。

cDNA特異的Primerが設計できないケース

- ・ターゲットにイントロンがない (intronless遺伝子) か、あるいは、イントロンがあってもサイズが短く、十分な大きさのイントロンをまたぐ位置にプライマーを設定できない場合
- ・ターゲットに偽遺伝子 (Pseudogene) が存在する場合

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Removerは、gDNA除去機能を付加した、リアルタイムPCR用逆転写反応キットです。本キットには、強力なDNA分解活性を有するgDNA Removerが付属されており、逆転写反応に先立って本試薬で鋳型RNAを処理することによって、ゲノムDNAフリーのcDNAを簡単に調製することができます。また、それぞれの反応に用いる試薬は、プレミックスタイプであり、容易に反応液を調製することができます。

今回は、本キットを用いてcDNA特異的検出を行った例をご紹介します。



方 法

(1) Total RNAの抽出

まず、市販のスピンカラムタイプのtotal RNA抽出キットを用いて、HeLa細胞からTotal RNAの抽出・精製をおこないました (カラム上でのDNase処理はなし)。抽出後、RNAの品質を確認するため、1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行いました (右写真)。

(2) cDNA合成 (逆転写反応)

次に、抽出したHeLa Total RNA 500ngを、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて、逆転写酵素の有り (+) 無し (-) の条件で逆転写反応 (20µl反応系) を行いました。その際、逆転写無し (-) の条件には、キット付属のno-RT Controlを用いました。また、比較のため、gDNA除去機能を持たないcDNA合成キットを用いて、同様に逆転写酵素の有り (+) 無し (-) の条件にて逆転写反応を行いました。

(3) リアルタイムPCR

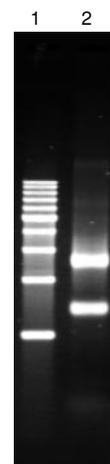
続いて、以下のリアルタイムPCR条件にて、TNF、ACTB、AMIGO3の各遺伝子の検出を行いました (N=2)。

試薬：THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No.QPS-201)

鋳型：(2) で調製した反応液2µl/20µl反応系 (持込量10%)

測定：Applied Biosystems 7900HT

各遺伝子の検出には、以下のプライマーセットを使用しました。



1 : 1kb DNA Ladder
2 : (1) で抽出した HeLa細胞由来 total RNA (200ng)

Primer set name	Target gene name	Target gene Symbol	Genbank Acc.	Target長	Exon junction	挟む場合の Intron size	Target 偽遺伝子
TNF-FR	Homo sapiens tumor necrosis factor	TNF	NM_000594	221bp	挟む	1084bp	-
ACTB-FR	Homo sapiens actin, beta	ACTB	NM_001101	188bp	挟む	441bp	有り
AMIGO3-FR	Homo sapiens adhesion molecule with Ig-like domain 3	AMIGO3	NM_198722	118bp	挟まない	-	-

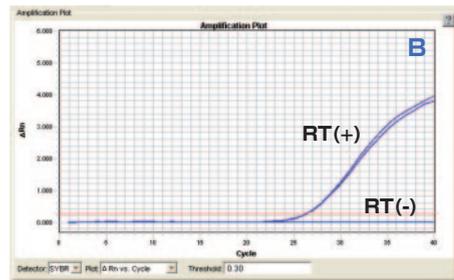
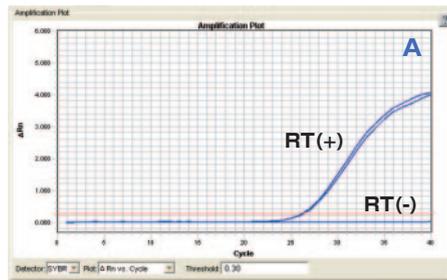
※AMIGO3は、intronがない (intronless) 遺伝子。http://www.bioinfo-cbs.org/igd

結果および考察

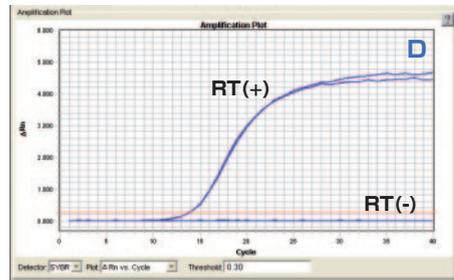
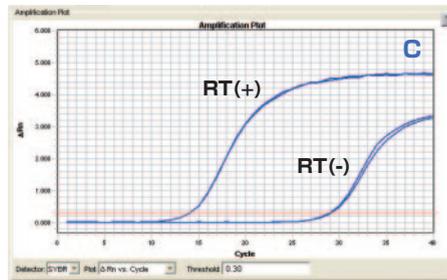
gDNA除去機能を持たない
cDNA合成キット

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix
with gDNA Remover

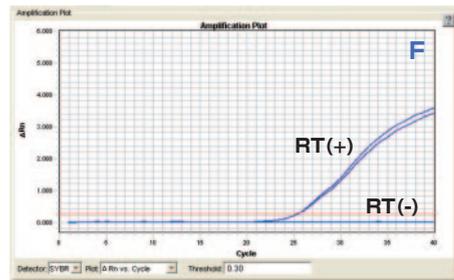
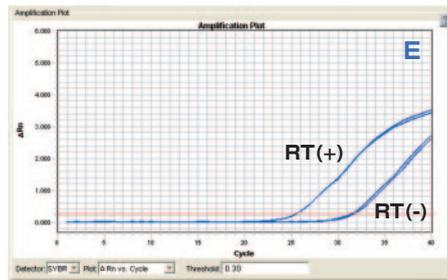
Target: TNF
Primer:エキソンジャンクション
を挟むプライマー
(イントロンサイズ:1,084bp)



Target: β -actin
Primer:エキソンジャンクション
を挟むプライマー
(イントロンサイズ:441bp)



Target: AMIGO3
Primer:エキソンジャンクション
を挟まないプライマー
(AMIGO3は, intronless遺伝子)



イントロンが十分に長いTNF(図A)では、RT(-)条件で増幅はみられませんでした。偽遺伝子が存在するハウスキーピング遺伝子 β -actin(図C)やイントロンを挟まなかったAMIGO3(図E)においては、RT(-)条件でも増幅がみられました。 β -actinでは融解曲線解析の結果から、偽遺伝子由来の産物が優先的に増幅している可能性が示唆されました。このことから、gDNA除去機能をもたないcDNA合成キットの場合、プライマーセット(あるいはTarget)によっては、RNAサンプルに夾雑しているgDNAに由来するシグナルが検出されてしまう可能性があると考えられます。

これに対し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Removerでは、いずれの場合においても、RT(-)条件で増幅がみられず(図B, D, F)、確実にgDNAが除去され、gDNAに由来するシグナルは検出されないことが確認されました。

まとめ

本実験でお示したように、cDNA特異的なPrimerが設計できない場合でも、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Removerを用いることによって、簡便に混入gDNA由来の増幅を回避することができます。この効果は、低発現遺伝子の発現解析を行う場合に特に有効になってくると考えられます。

また、本キットはマスターミックス化されており、簡便かつ正確に反応液を調製することができます。さらに、逆転写酵素のみを除いたno-RT Control試薬も付属しておりますので、上記のようなRT(-)条件も簡単に採ることができます。Total RNA中のgDNAの残存が問題となる、あるいは、なりそうなリアルタイムPCR実験には是非一度お試しください。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover ・gDNA Remover ・4x DN Master Mix ・5x RT Master Mix II ・5x RT Master Mix II no-RT Control ・Nuclease-free Water	200回用 (10 μ l反応)	-20 $^{\circ}$ C	FSQ-301	¥40,000

※リアルタイムPCR用マスターミックスTHUNDERBIRD®とのセット品もご用意しております。詳細は、弊社Webサイトにてご確認ください。

gDNAを含むRNAサンプルから簡便にgDNA-free cDNAを調製したい場合、あるいはRNA調製時に、時間とコストと手間のかかるDNaseI処理をされている方は是非一度お試しください。