

リアルタイムPCR特集

今回は『リアルタイムPCR』を特集させていただきます。

リアルタイムPCR解析は、今日の遺伝子発現解析にはなくてはならないツールとなった感があります。今号では、各種リアルタイムPCR試薬、および関連試薬に関して特集しております。是非、研究にお役立てください。

Technical Review

『RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix』を用いた1-step Realtime PCRによるプロテインキナーゼ発現定量

東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所 川井 淳

はじめに

リアルタイムPCRを用いて目的の遺伝子の発現量を測定する方法には、まずRNAをcDNAに変換し、それを鋳型としてリアルタイムPCRを行う『2-step反応系』と、RNAを鋳型として逆転写反応とリアルタイムPCRを連続的に行う『1-step反応系』とがあります。1-stepリアルタイムPCRは、試薬の分注操作が1回で済み、ハイスループト化に適しています。また、サンプル間のクロスコンタミネーションの危険性も低減します。

RNA-direct™ Realtime PCR Master Mixは、*Thermus thermophilus* HB8株由来のTth DNA Polymeraseが、2価のマンガンイオン (Mn^{2+}) 存在下において強い逆転写活性を示すことを利用した、1酵素系による1-stepリアルタイムPCR用2xマスターミックスです。耐熱性DNAポリメラーゼを用いた逆転写反応は、一般の逆転写酵素と比較して、反応を高温で実施できるため、立体構造をとりやすい鋳型RNAからの増幅や、逆転写反応の特異性を高めるのに適しています。

本キットは、TaqMan®アッセイ・プローブアッセイ用とSYBR® Greenアッセイ用の2種類から選択いただけます。

本号では、RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mixを用いてnovel Protein Kinase C (nPKC)のサブタイプごとのヒト各種組織別発現プロファイル解析を実施した例をご紹介します。



図1. キット外観
Master Mixと酢酸マンガンをそれぞれ1.5mlチューブに分注され包装されている。

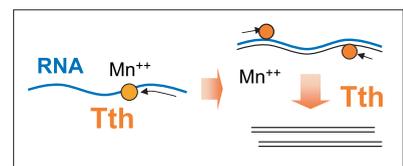
一口メモ

Tth DNA polymeraseについて

Tth DNA polymeraseは好熱細菌：*Thermus thermophilus*から分離されたpolII型DNA polymeraseです。 Mn^{2+} イオン存在下で、逆転写活性を示すユニークな性質を有しています。

Biochemistry, **30**: 7661-7666 (1991)

※本酵素の基本特許は弊社が有しています。



RT PCRサイクル

図2. Tthを用いたRT-PCR原理図

方法

1. サンプル:

10種類のヒト由来Total RNA (脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、小腸、筋肉、肺、胃、大腸)を鋳型として用いました。各反応系 (20 μ l) に対し、それぞれ50ngのtotal RNAを添加して解析を行いました。またこれらとは別に、検量線作成用として上記10種のtotal RNAのうち4種(心臓、脾臓、筋肉、肺)をピックアップして混合したものについて、200ngおよびその5倍希釈系列を作成し、それぞれ同時に反応を行いました。

2. プライマー:

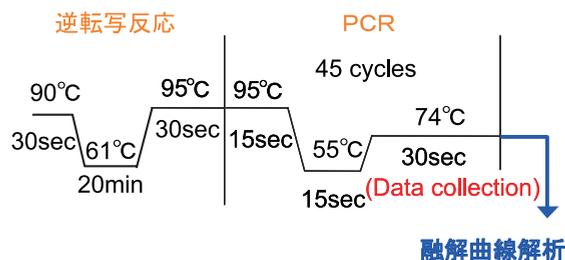
PKC δ 、PKC ϵ 、PKC η 、PKC θ それぞれに対して、イントロンを跨ぐ約150~170bpの領域を増幅するように、それぞれ20mer前後の鎖長を持つプライマーを設計しました。また、サンプル間のmRNA量を補正するために、 β -Actinを内部標準として使用しました。プライマー濃度は各0.2 μ Mに設定しました。各プライマーの配列を表1に示します。

表1 増幅用プライマー

	Forward Primer	Reverse Primer	領域長
PKC δ	AGATTGCCGACTTTGGGATG	TACAGAAGGACCCCGAAAGA	154bp
PKC ϵ	GGATGTGCAAGGAAGGGATT	GCCATCATCTCGTACATCAG	151bp
PKC η	AGGGTCACTGTAAACTGGCA	TCATAGAGCAACACGCCCAT	168bp
PKC θ	TGTTAGGAGATGCCAAGACG	TGGAAAGGCGACTGACCAAT	151bp
β -Actin	AGAAAATCTGGCACCACACC	AGAGGCGTACAGGGATAGCA	188bp

3. 反応機器・条件:

Applied Biosystems 7900HTを使用して、以下の条件にて増幅検出を行いました。



一口メモ

novel Protein Kinase C (nPKC) について

細胞内シグナル伝達システムにおいて重要な役割を果たしている Protein Kinase C (PKC) は、現在9種類のサブタイプ(ヒトの場合)が知られていますが、それらは、ホルボールエステル結合部位、カルシウムイオン結合部位を持つ conventional PKC (cPKC)、カルシウムイオン結合部位を欠く novel PKC (nPKC)、更にホルボールエステル結合部位も欠く atypical PKC (aPKC) に大別されます。このうち、nPKC に分類されるものは4種類あり、それぞれ δ 、 ϵ 、 η 、 θ と呼ばれています。それぞれのサブタイプは組織別の発現量分布に差があることが知られていますが、機能との関わりは完全には解明されていません。

結果及び考察

1. β -ActinおよびPKCの標準曲線作成

今回、相対定量に用いる検量線用のスタンダードとして、nPKCの発現が高いと予想された4つの臓器由来のtotal RNAを混合したものを希釈して用いました (200 \times 5⁻ⁿng (n=0,1,2...))。まず、それぞれCt値より、 β -Actinおよび各PKCサンプルの検量線を作成しました。また同時に、それぞれの組織由来のサンプルを1反応あたり50ng、および200ngを用いて同様に増幅しました。

その結果、鋳型量とCt値との相関性は極めて良好であることが示されました。 β -Actinの検量線を図3に示します。また、融解曲線解析の結果、プライマーダイマー等の生成は確認されませんでした。

相対定量の場合、プラスミド等にクローニングした遺伝子から転写反応を用いて合成したRNAを定量のスタンダードにする方法もありますが、今回のように単に生体より抽出したRNAを希釈して用いるだけでも問題なく検量線を作成できました。

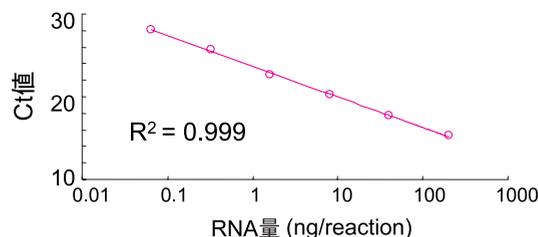


図3. β -Actinの検量線

2. PKC各サブタイプの組織毎の発現量算出

β -Actin、およびPKC各サブタイプの検量線を用いて、それぞれの遺伝子の組織別存在量を算出しました。次に、 β -ActinのmRNAの相対量で補正し、各組織における各PKCの相対発現量を算出しました (図4)。

その結果、PKC ϵ 、PKC θ において、組織別発現量分布が大きく偏っていることが明らかになりました。この結果は既に報告されている情報と良く一致していることが確認できました¹⁾²⁾。また今回、50ngと200ngのtotal RNAを用いてPCR反応を行い、それぞれ相対値を算出しましたが、どちらの濃度のRNAにおいてもほぼ同じ結果を示しました。

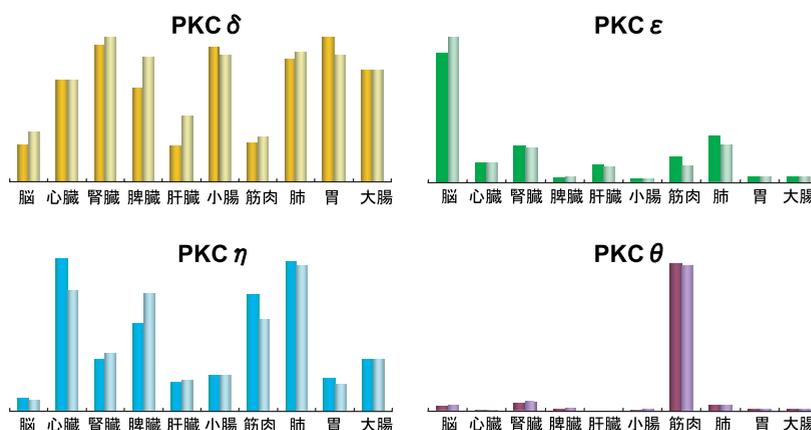
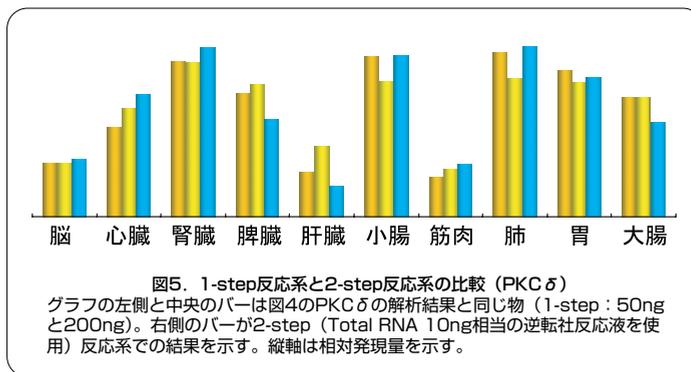


図4. PKC各サブタイプの組織別発現量
各グラフの左側のバーが50ng RNA使用時、右側のバーが200ng RNA使用時のデータをそれぞれ示す。縦軸は相対発現量を示す。

3. 2-step反応系との結果比較:

1-step反応系と2-step反応系（逆転写反応とリアルタイムPCRとを別に実施）の結果に整合性があるかどうかを確認するため、弊社高効率逆転写キットReverTra Ace - α -[®] (Code No.:FSK-101)と、リアルタイムPCRキットSYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix -Plus- (Code No.: QPK-211) とを用い、核酸増幅リアルタイムモニタリング装置：LineGene (BioFlux社) による2-stepリアルタイムPCRを実施した場合との結果の比較を行いました (PKC δ のみ実施)。

その結果、図5に示すように、両者の結果はほぼ一致しており、1-step反応系による結果は2-step反応系と同等の信頼性があり、2-step反応系から1-step反応系への移行も容易であることが示されました。



まとめ

RNA-direct[™] Realtime PCR Master Mixを用いた1-stepリアルタイムPCRでは、多数のサンプルの処理をより簡便に行うことが可能で、実験系のハイスループット化に適しています。今回の検討においても、本系の再現性は良好で、かつ2-step反応系とも高い整合性が示されました。また、1-step系では2-step系に比べ鑄型RNAを多く持ち込める傾向にあるため、発現

量の少ないmRNAの解析にも力を発揮するものと思われます。現在、2-step系の試薬を用いて行っている実験も、1-step系試薬での解析に向いている場合も多々あると推察されます。『RNA-direct[™] Realtime PCR Master Mix』を是非一度お試しください。

参考文献

- 1) Akita Y. *et al.*, *J Biol Chem.* **265** : 354-362 (1990)
- 2) Osada S. *et al.*, *Mol Cell Biol.* **12** : 3930-3938 (1992)

品名	包装*	保存温度	Code No.	価格**
One-step qPCR Kit (TaqMan [®] アッセイ・プローブアッセイ用) RNA-direct[™] Realtime PCR Master Mix	40回用 (0.5ml×2) 100回用 (0.5ml×5)	-20℃	QRT-101T QRT-101	¥17,000 ¥33,000
One-step qPCR Kit (SYBR [®] Greenアッセイ用) RNA-direct[™] SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix	40回用 (0.5ml×2) 100回用 (0.5ml×5)	-20℃	QRT-201T QRT-201	¥17,000 ¥33,000

*1反応50 μ lとした場合の使用回数を記載しています。

※RNA-direct[™] Realtime PCR Master MixおよびRNA-direct[™] SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mixには、Passive Reference色素があらかじめ混合されています。プレートタイプのPCR機器にそのままご使用いただけますが、Passive Reference色素を使用しないPCR機器への影響もありません。

※RNA-direct[™] Realtime PCR Master MixおよびRNA-direct[™] SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mixには、必要量の酢酸マンガソ液が別チューブで添付されます。

※PCR (Polymerase Chain Reaction) は、F. Hoffman-La Roche社が米国特許 (特許番号4,683,195および4,683,202) を有しています。PCRの実施に当たっては許可が必要となります。本品はF. Hoffman-La Roche社が有するPCRに関する特許の使用許可を示唆するものではありません。

※LightCycler[™]は、Idaho Technology Inc.並びにRoche Molecular Systems Inc.の商標です。

※SYBR[®]は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

※TaqMan[®]は、Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。

Web de 温故知新

今号に関連のある記事をピックアップして詳しくご紹介するコーナーです。

『TTarget Clone[™]』 (本誌p.9掲載)

TTarget Clone[™]シリーズは、様々なPCRプロダクトを高効率にTAクローニングするために開発されたキットです。PCRプロダクトの末端の形状によって、2種類のキットを使い分けます。A付加を受けた通常のPCRプロダクトのクローニングには、『TTarget Clone[™]』を用います。一方、高正確性酵素であるKOD -Plus-やKOD -Plus- Ver.2で増幅された、末端が**プランドエンド**になっているPCRプロダクトの場合は、『TTarget Clone[™] -Plus-』を用います。これらの酵素は、強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性 (校正活性) を有するため、増幅産物はその末端が平滑化されてしまい、通常の方法ではTAクローニングができません。TTarget Clone[™] -Plus-には、

KOD DNA polymeraseの活性を抑える2種類のモノクローナル抗体とTaq DNA polymeraseが使われており、PCR後に残存したKOD DNA polymeraseの活性を抑えつつ、Taq DNA polymeraseの活性により増幅産物の末端にA付加を行います。

ただ、紛らわしいのは、Blend Taq[®]やKOD Dash[®]のような、2つのPCR酵素を混合したタイプの高性能ポリメラーゼの場合です。弊社のウェブサイト (<http://www.toyobo.co.jp/bio>) の『PCRコーナー』では、PCR酵素別にPCRプロダクトの末端の形状を分かりやすくまとめています。是非一度ご参照ください。