

1 PCRの周辺事情

1-1 PCRに使われる酵素いろいろ

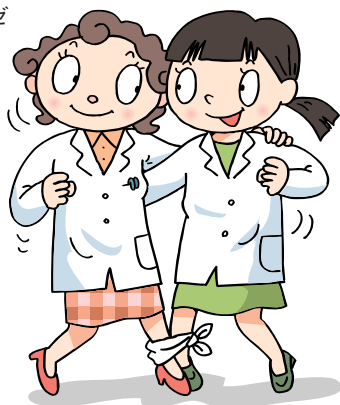
PCRに用いられる酵素は、大きく分けて好熱Bacteriaに由来する『Taqタイプ』のDNAポリメラーゼ (Family A・PolI型) と、3' → 5' エクソヌクレアーゼ活性を有する超好熱Archaeaに由来する『KODタイプ』のDNAポリメラーゼ (Family B・α型) の2種類が存在します (Vol.1参照)。

3' → 5' エクソヌクレアーゼ活性は校正活性とも呼ばれます。この活性の強いKOD DNA polymeraseなどの酵素は、大変高い正確性を示すため、クローニングなどに広く使われています。弊社のKOD-Plus-やKOD-Plus- Ver.2に使われている酵素がこの酵素です。

一方、『Taqタイプ』の耐熱性DNAポリメラーゼの多くは校正活性がなく正確性はKODに遥かに及びませんが、弱いながらDNAを5' 方向から削る5' → 3' エクソヌクレアーゼ活性を有しています。この性質を利用したのが、リアルタイムPCRで使用されるTaqMan®アッセイです (表紙図)。TaqMan®プローブは削られると蛍光を発するようになり、特異的に増幅を検出することができます。

さらに、*Thermus thermophilus*に由来する『Taqタイプ』のポリメラーゼであるTth DNA polymeraseはMn²⁺イオンを含む溶液中で逆転写活性を示す活性があります (Biochemistry, 30: 7661-7666 (1991))。この酵素は同じ反

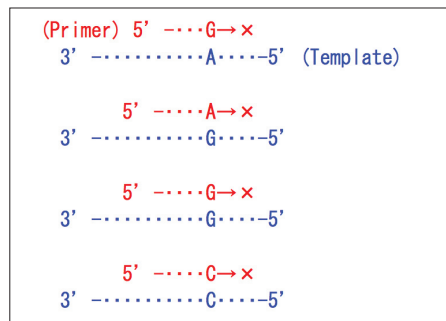
応液組成下で通常のポリメラーゼ活性も示すので、途中で液を移し替えることなくRT-PCRを行うことができます (1酵素・1ステップ)。当然、Taqと同じくTthにも5' → 3' エクソヌクレアーゼ活性がありますので、TaqMan®アッセイにも用いることができます。Tth DNA polymeraseは3種類の活性を示す超マルチファンクショナルな酵素といえます。



1-2 増幅しないはずなのに・・・

ファミリー遺伝子のうちの一種類だけをPCR増幅しなければならないようなときに、ホモロジーがありすぎてプライマーがうまく設計できずに困った経験のある方は多いのではないのでしょうか。また、うまくプライマーを設計できても、なぜか検出したくない方の遺伝子も増幅されてきて頭を悩ませた方も多いはず。これは、ポリメラーゼの性質を少し知っておく程度回避できます。例えば、仮に2塩基しか配列が違わない、遺伝子A (増幅したい遺伝子) [3' -...AACTCGG...-5'] と遺伝子B (増幅したくない遺伝子) [3' -...AAGTCGT...-5'] があった場合、どうい配列のプライマーを設計するのでしょうか? 普通に考えると、とりあえず2塩基分浮くので [5' -...TTGAGCC-3'] というプライマーを設計したいところです。ところが、おそらく [5' -...TTG-3'] が正解です。Taq DNA polymeraseを用いた実験ですが、プライマーの3' 末端と鋳型側の塩基の組み合わせによって、ミスマッチペアでのポリメラーゼの伸長性が異なるようです (Nucleic Acids Res., 20, 4567-4573 (1992))。

この論文によると、図に示すペアの効率がもっとも低くなっています。逆に、CとTのようなペアではそのまま合成が進んでしまう可能性がかなり高いようです。その他にもこのような組み合わせは多数あるようですので、是非一度論文をチェックしてみてください。ただし経験上、一塩基のみのミスマッチでは、サイクル条件によってはどうしても増幅してしまう場合もありますので、2、3種類プライマーを実際に合成して確認することをお勧めします。



【ミスマッチ時に伸長しにくいペア】

2 実践!リアルタイムPCR

A子さんは昨年T社バイオ研究所に配属された新人研究員です。TKリーダー指導の下、研修を行ってききましたが、2月から学術担当を代行しています (前号参照)。一方、同じチームだったAK先輩は、ゴールデンウィーク明けから遺伝子解析チームへ異動し、新しいリアルタイムPCR試薬の開発を行っています。季節はいつの間にか夏を迎えました。A子さんは、次なる課題として、「役に立つリアルタイムPCRの事例」を集めて報告書を提出するように指示を受けました。春からTKリーダーは学術の仕事に兼務しています。そういえば、A子さんは2月まで遺伝子発現解析というテーマで研修に取り組んでいました (前々号参照)。今回のテーマは、その続きという意味もあるようです。

課題：リアルタイムPCRの事例を集めて役に立つ事例集を作成すること。

条件：①以前検討したトランスフェリンリセプター (TFR) 遺伝子の発現解析を例として事例を作成すること。 (Vol.2参照)

②初心者にも分かりやすいような事例を作成すること。

ヒント：ヒトTFR遺伝子は、アクセッションNO.X01060の配列を参照すること。

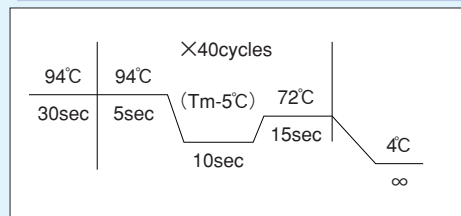
2-1 プライマー設計の落とし穴

A子さんは、とりあえず指示通りにTFR mRNAの発現量を、リアルタイムPCR法を用いて比較するつもりです。まず手始めとして、プライマー設計を行うことにしました。リアルタイムPCRで増幅する領域は80～180bp程度が良いことは既に調べています。その領域を探そうとA子さんはTFRの遺伝子配列を見渡しましたが、ヒトのTFR cDNAの配列はかなり偏った配列が多く、なかなかプライマーを設定できそうな領域が見当たりません。最終的にA子さんは、比較的偏りの少ない4700～4920の間の配列に着目し、プライマー設計ソフトを使ってプライマーを設計してみました。今回は比較実験を行うため、プライマーの長さは20merとし、GC含量は45～55%の範囲で揃えました。候補はいくつか出てきましたが、今まで数kbという長くて難しい配列の増幅ばかり行ってきたA子さんにとって200bp程度の増幅は目をつぶってもできるように思われてなりません。A子さんは見た目の直感で一つのペアを選び、1F、1Rという名前をつけました。

【プロトコール#1】増幅チェック用PCR

試薬	添加量
DW	27 μ l
10 $\times$ rTaq Buffer	5
dNTPs	5
25mM MgCl ₂	6
F primer (10pmole/ μ l)	2
R primer (10pmole/ μ l)	2
Taq +Anti-Taq high = 1:1	1
Sample	2
Total	50

*Anti-Taq high (Code No.:TCP-101)は弊社から販売している抗Taq抗体です。
Taq DNA polymerase (5U/μl)と1:1で混合した後、室温で10分間放置し
凍干し、ます。その後、-20℃で保存可能です。



※この実験では、55℃でアニーリングを行いました。

A子さんは、実験を始める前に遺伝子解析チームで長くRealtime PCR試薬の開発を行っているM田さんに相談に行きました。M田さんからは、いきなりリアルタイムPCRの装置で検討するより一度Taq DNA polymerase (Code No.:TAP-201)を用いてきちんと増幅するかどうかを確認した方が良いというアドバイスをもらいました。またその時に、リアルタイムPCR試薬の条件に近づけるために、添加するマグネシウムの量を少し多めにするということと、Taqには予めホットスタート用の抗Taq抗体 (Anti-Taq high (Code No.:TCP-101))を混合したものを使用した方が良いことも教えてもらいました。A子さんは、M田さんがいつも使っている手書きのプロトコール(プロトコール#1)をもらいました。しかし、A子さんは、あまりにも個性的なM田さんの字をなかなか解読できませんでした。M田さんは字に負けず個性的な天才肌の研究員であるという噂です。

注文したプライマーが届くとA子さんは早速このプロトコルを試してみました。PCRの鋳型としては、以前調製したTFR遺伝子(4.5Kb)をクローニングしたプラスミド(Vol.2参照)を制限酵素でカットして精製したものを2pg使用しました。

その結果、目論見どおり、目の覚めるようなきれいな増幅パターンが得られたので、A子さんはすぐに次の方策を相談するためにM田さんのところへ相談に行きました。するとM田さんは、使った配列と結果を見た瞬間、「うーん、もう少し鋳型濃度の薄い領域で検討しないと意味がないかも」と、考え込んでしまいました。A子さんは、最初何のことを言われているのか分かりませんでしたが、話を良く聞くとう理解できました。

つまり、2pgはコピー数に直すと10⁶コピー程度に相当します。35回以上サイクルを回すPCRではかなりの鋳型量です。また今回も、A子さんの悪い癖でN.C.の増幅も忘れていました。そこで言われたとおり、鋳型DNAの希釈系列を作製してPCRを行ってみました。結果は惨憺たるものでした。M田さんの読みどおりに低コピー数側では、顕著にプライマーダイマーが生じてしまっています(図1)。M田さんは配列を一瞬見ただけで、プライマー間で3'末端の部分が4塩基分もピッタリ重なってしまうことを見抜いたのでした(図2)。偶然とはいえ、最悪のプライマーペアを選択してしまったものです。A子さんは頭を抱えています。

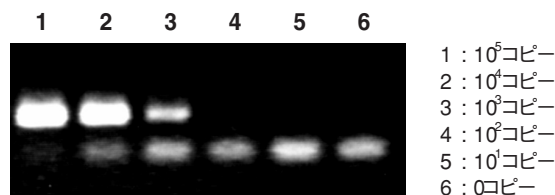


図1 鑄型量とプライマーダイマーとの関係

1F : GATTCCTGGTTCGGGTGTTA

1R : GGAAGTAACTCAACCCTAAC

のプライマーペアを用いて40サイクル増幅を行った。

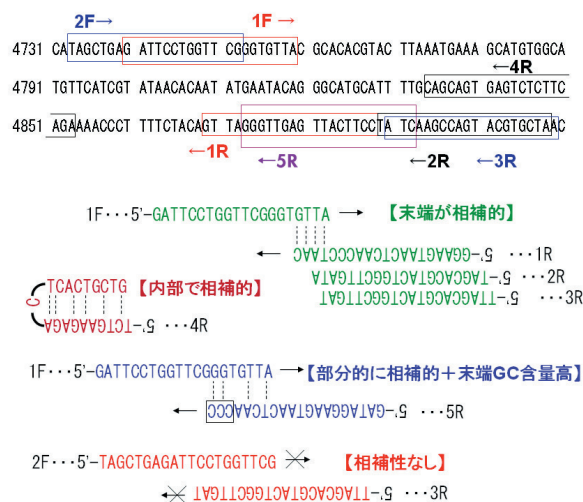


図2 A子さんが設計した様々なプライマーペア

しかし、ころんでも只では起きないのが彼女のいいところです。さらに様々なペアのプライマーを合成してトライしてみることにしました(図2)。そして数日後、図3に示すような結果が得られました。この結果を見る限り、3'末端部分が相補的なもの(1F、1R)は特にだめなようです。たった2塩基しか重なっていないものもプライマーダイマーが生じてしまいます(1F、2R)。1塩基重なったものは(1F、3R)、プライマーダイマーの発生は顕著ではありませんでしたが、すこし増幅量が少ないようです。後で、M田さんから、末端の1塩基が重なるだけでもあまり良くないということが記載されている本もあるということをお教えしてもらいました。また、1Fと5Rのように、3'末端の相補性が高いものもあまり良くありませんでした。さらに、3'末端側のGC含量が高い場合(3'末端側の4塩基中のGCが75%以上)も良くない場合があるとのことで、プライマー5Rはこれにも相当してしまいます。一方、内部で相補的になってしまう4Rのようなプライマーは問題ありませんでした。このような配列が良くないと記載されている本もあるようなので少し注意が必要かも知れません。結論として、今回作製した中では、相補性のない2Fと3Rのプライマーの組み合わせが最も良いようでした。

今回はプライマーダイマーの影響を確認するために、鋳型としてプラスミドを使用しましたが、培養細胞等に由来するTotal RNAの逆転写反応液などを用いてもかまいません。また、上ではプライマーダイマーの生成のみに着目しましたが、検出感度も大切です。増えなければ意味がありませんので、増幅効率の良いプライマーのペアを選択するようにしましょう。

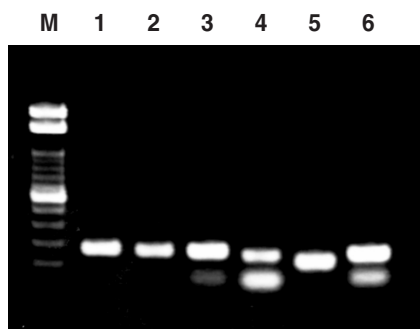


図3 プライマー条件とプライマーダイマーとの関係

M : 100bp Ladder marker
1 : 2F-3R (相補性なし)
2 : 1F-3R (末端1塩基の重なり)
3 : 1F-2R (末端2塩基の重なり)
4 : 1F-1R (末端4塩基の重なり)
5 : 1F-4R (内部で相補的)
6 : 1F-5R (部分的に相補的+末端GC含量高)

ワンポイントメモ ①

リアルタイムPCRでは、増幅産物の持ち越し(キャリーオーバー)による偽陽性も注意すべきポイントの一つです。電気泳動と試薬調製は離れた場所で、別のピペットを用いて行いましょう。また、コントロール配列を挿入したプラスミドの抽出作業なども危険な作業の一つですので、必ず離れた場所で行ってください。試薬調製時には、手洗いや手袋着用も忘れずに。

また、リアルタイムPCR後の反応液は取り出さずにそのまま処理する方が無難です。

2-2 検出法・検出装置いろいろ

次のステップとしてAさんは実際にリアルタイムPCR実験を行ってみようと思っています。そこで、AさんはリアルタイムPCR関連の試薬や機器のカタログを片っ端から調べてみました。しかし、複雑すぎてはつきり言って良く分かりません。そこで、M田先輩にレクチャーをお願いしました。以下、M田さんのレクチャーの内容です。

リアルタイムPCRの検出原理ですが、大きく分けて3種類あります。その中で最もよく使われている原理は、SYBR® Green Iというインターカラーターを用いてPCRの増幅産物量をモニターする方法です。この物質はエチジウムブロマイドと同様にDNAの2本鎖の間に入り込み(インターカレートし)、蛍光強度が増大するという性質を有しています。よって、この蛍光を測定することで比較的簡単に増幅をモニターすることができます。ただ、2本鎖DNA全てにSYBR® Green Iがインターカレートするため、プライマーダイマーや非特異的な増幅産物なども検出してしまうという欠点があります。この欠点を補うために、通常のリアルタイムPCRの装置では、融解曲線解析ができるようになっています。この解析は、DNA断片の長さや構成塩基の種類などによって各断片のTm値(2本鎖DNAの50%が1本鎖DNAに解離する温度:Melting temperature)が異なることを利用します。この融解曲線解析を行うことにより目的の増幅産物が生成したかどうかをある程度確かめることができます(図4)。図5は、2種類の異なる試薬を用いて同じ遺伝子を増幅したときの結果を示しています。サンプルが10倍ずつ段階希釈されているので通常ならば増幅曲線は等間隔になるはずですが、Bでは等間隔になっていません。その原因としては、プライマーダイマーや非特異増幅が疑われます。Bの融解曲線を見てみると、やはり、目的以外の産物も多く増幅できていたことが分かります。(実を言うと、Aの試薬は最近M田さんの開発した、『SYBR® GreenRealtime Master Mix -Plus- (Code No.: QPK-211)』という試薬で、非特異反応を低減したというのが売りとのこと)

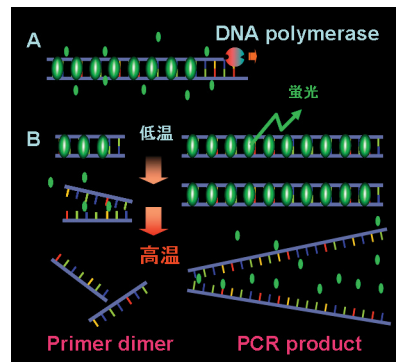


図4 インターカラーターアッセイ概念図

A : インターカレーション原理
B : 融解曲線解析原理
緑色の粒子がインターカラーターを示す

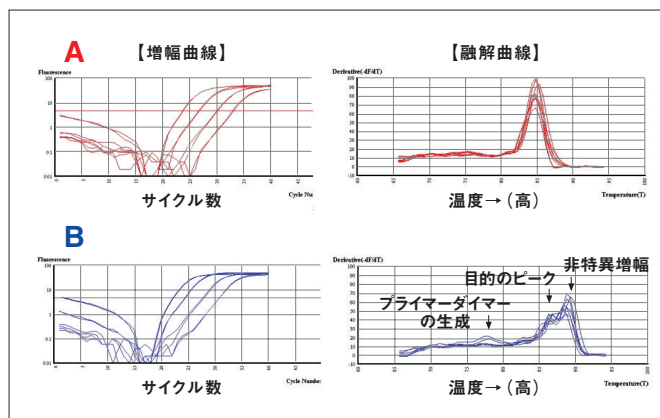


図5 インターカラーターアッセイ(例)

Bの条件では、プライマーダイマーや非特異的な増幅が見られる。10⁴倍希釈したDNAサンプルを使用

別の検出方法としては、TaqMan[®]アッセイやハイブリダイゼーションプロブアッセイ（プロブアッセイ）などの方法があります。これらは、プライマーで挟まれた領域のDNAに相補的なプロブと呼ばれる蛍光標識DNAを用い、特異的に増幅産物をモニターする方法です。TaqMan[®]アッセイの原理を表紙の図に示しています。TaqMan[®]プロブは、鋳型DNAに特異的にハイブリダイズするため、インターカレーターアッセイに比べより特異的な増幅産物の検出が可能です。ハイブリダイゼーションプロブアッセイについては、詳細は割愛しますが、2種類のプロブの3'末端と5'末端に結合した蛍光基のFRETを利用して検出を行います。（プロブの設計方法や使用方法の詳細は、専門の参考資料をご参照ください）

ワンポイントメモ ②

選択したプライマーによっては、インターカレーターアッセイにおいて、非特異反応を検出しやすい場合があります。ここに挙げた例は、それぞれの臓器由来のTotal RNAの逆転写物からβ-actinの検出を行って得られたCt値を単純に比較したデータです。Primer ABを用いた、インターカレーター（IC）アッセイでのheart値のみが乖離しているのが分かります。ここには示ませんが、融解曲線解析を行ったところ、Primer ABでは明らかに異なる産物が合成されていたことが分かりました。

臓器や細胞によっては、非特異増幅されやすい遺伝子が大量に発現している場合もあり、実績のあるプライマーでも、毎回融解曲線を厳密にチェックする必要があります。

また、SNP（1塩基置換）の影響を受けることもあるので、SNP情報も確認するとよいのかも知れません。

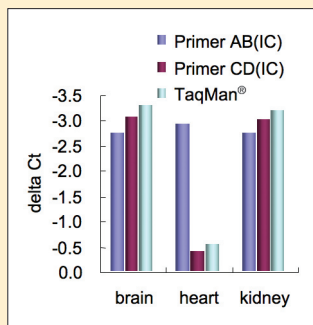


図6 非特異検出例

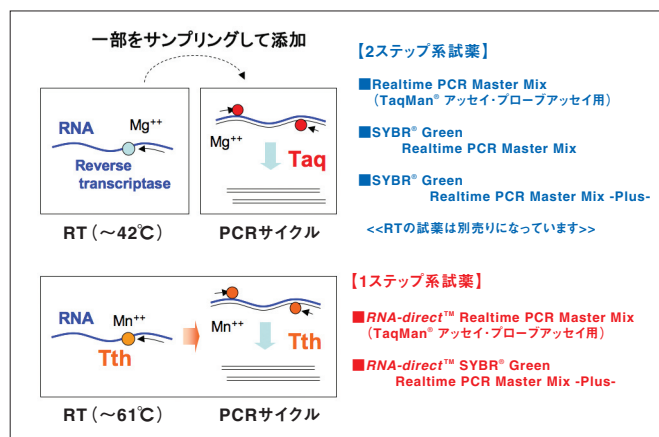
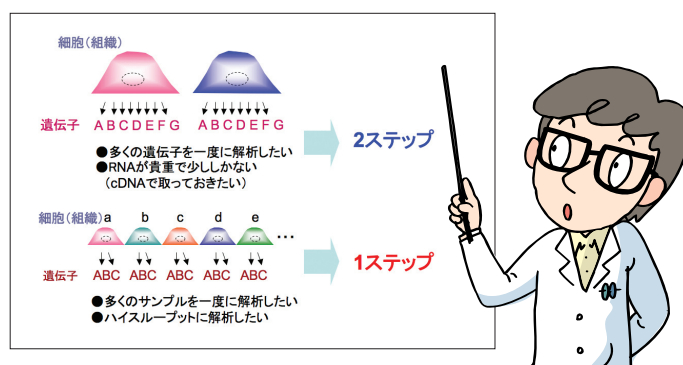
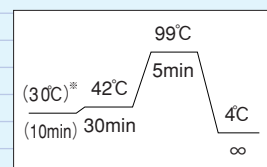


図7 2ステップ法と1ステップ法（弊社ラインアップを併記しております）



【プロトコール#2】（2ステップ法）ReverTra Ace[®]-α[®]を用いるRT反応

試薬	添加量
RNase Free dH ₂ O	11-X μl
5X RT Buffer	4
Random primer (25pmoles/μl) or oligo dT primer (10pmoles/μl) or specific primer (10pmoles/μl)	1
dNTPs	2
RNase inhibitor	1
Poly (A) ⁺ RNA (10-100ng) or Total RNA (10-1000ng)	X
ReverTra Ace [®] <逆転写酵素>	1
Total	20



※Random primerを用いる場合に
行います。

2-3 2ステップ法と1ステップ法

M田さんのレクチャーは続きます。現在、2ステップ法と1ステップ法の2種類のRT-PCRの方法が知られています。2ステップ法は、まず逆転写酵素を用いて逆転写反応を行った後、その一部を用いてPCRを行う方法です。一方、1ステップ法は、Tth DNA polymeraseなどの逆転写活性を有するポリメラーゼを使って、同じ溶液中で一度にRT-PCRを行います（図7）。2ステップ法では、逆転写反応にoligo (dT)、random、あるいはspecific primerを使用しますが、1ステップ法ではspecific primer（PCRのリバースプライマー）を用いて逆転写を行います。Tthは耐熱酵素ですので、逆転写を高温で行うことで、逆転写時の特異性を高めることができます。また、2次構造をとりやすいRNAの解析にも有利です。

2ステップ法のメリットは、逆転写したcDNAを分割して多種類のターゲット遺伝子を検出するためのPCRの鋳型として用いることができる点です。多遺伝子解析に向いている方法です。また、サンプルをcDNAの状態でもストックしておくこともできるので、貴重なサンプルを解析する場合などはこの方法が適しているといえます。代表的なプロトコールをプロトコール#2、3に示します。

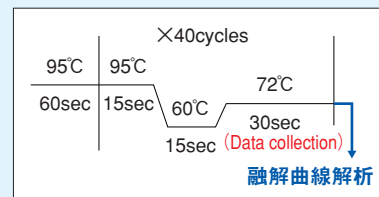
一方、1ステップ法は、なんと言っても分注操作が少ない点が魅力です。検体がたくさんある場合に力を発揮する方法です。ただ、多くの遺伝子を一度に解析するにはあまり向かない方法かも知れません。

【プロトコール#3】（2ステップ法）

『SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix』、及び『SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix -Plus-』を用いるリアルタイムPCR

DW	4.2-X μl
Master Mix	5
Primer F (10pmoles/μl)	0.4
Primer R (10pmoles/μl)	0.4
逆転写反応溶液 (cDNA溶液)	X
<適宜希釈して用いる>	
Total	10

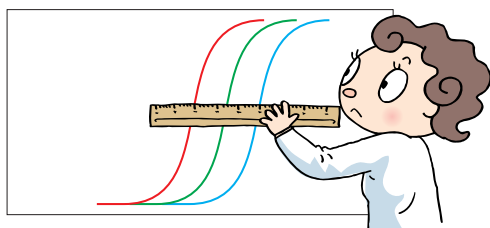
※左記はリアルタイム核酸増幅モニタリング装置:LineGene (Bioflux社) 用の組成を示しています。容量は変更可能で、様々な装置にお使いいただけます。サイクルは一例です。



先ほどから実験台の向こうでアシスタントのS本さんが、まだ話が終わらないか覗き込んでいますが、話に熱中しているM田さんは全く気づかないようです。

2-4 相対定量

A子さんは少し疲れてきましたが、M田さんのレクチャーは止まりません。リアルタイムPCRを使ってある遺伝子のmRNAの発現量を比較する場合、RT-PCRの増幅量を指標として比較するわけですが、増幅量を比較するポイントが重要です。増幅は大きく分けて3段階に分けられます。すなわち、①検出限界以下の段階、②定量可能な段階（リニアレンジ）、③プラトー、の3段階です。リアルタイムPCRでは、検出限界からリニアレンジに入った直後のサイクル数（Ct: Cycle threshold）で比較するのが一般的です。”Threshold”とは閾値のことです。この閾値付近での定量性が最も良いと考えられています。



理論的に、PCR産物は倍々・・・と増えていくので、発現量はCt値の累乗を使って比較できそうなものですが、実際はそうではありません。プライマーや遺伝子の配列によって増えやすいものや増えにくいものがあることはご存知だと思います。ですから、サンプル毎に一定の倍率で希釈したサンプル（例えば10倍希釈系列や、5倍希釈系列）を準備して検量線を作成し、それをモノサシとしてそれぞれの発現量が何倍になっているのかを相対的に比較するような形をとります。

ただ、ここで問題点があります。サンプルとする「Total RNA」や「Poly (A)⁺ RNA」はかなりヘテロな集団からなっています。純粹に見えるPoly (A)⁺ RNAでもrRNAが残っている場合も多いですし、それ以前に薄くて正確に定量できない場合が多いのが実情です。また、反応に用いたRNA量が一定であったとしても、それがどれだけの細胞に由来しているかはサンプルごとにまちまちです。要するに、いくら吸光計を用いて260nmの吸収を指標として濃度を揃えたとしても、サンプル間ではかなりの誤差を含んでいると考える必要があります。

そこで登場するのが、ノーザンブロットングなどで内部標準として使われてきたβ-actinやG3PDHなどのハウスキープング遺伝子です。これらの遺伝子の各組織や細胞での発現の分布は非常によく調べられていることから、とても良いコントロールになります。よって、目的の遺伝子の定量値をこの内部標準遺伝子の定量値で補正した値を用いることで、ある程度正確な比較ができるようになります。また、RNAに何らかのRT-PCRを妨げるような物質が混入しているような場合もあります。このような場合も、内部標準を用いることである程度補正することが可能です。でないと、でたらめな値が一人歩きしてしまいます。また、使用する内部標準遺伝子の選定も慎重に行なう必要があります。特に、組織間での比較を行なうような場合は、前もって文献等で確かめておいた方が無難です。

図8に内部標準を用いた定量のイメージを示しました。3匹のマウスからRNAを調製し、遺伝子AとBの発現量を相対比較した例です。それぞれの遺伝子のPCRの結果から検量線を作成し算出した定量値が左側です。この結果を見るかぎりでは、遺伝子Aの発現量のみに差があるように見えます。しかし、β-actinの定量値で補正すると、右のように、遺伝子Bに差がある結果となります。当然、右の方が正しい結果であることは一目瞭然です。

次に、検量線の作成方法について説明します。検量線用の鋳型サンプルとしては、3種類の方法が考えられます（図9）。一つ目は、遺伝子をクローニングしたプラスミドからRNAを合成し、それを段階希釈して用いる方法です。前々号（Vol.2）で、KOD-Plus- Ver.2（Code No.: KOD-211）で増幅したTFR遺伝子（4.5 kb）を専用のTAクローニングキット（TArget Clone™ -Plus-; Code No.: TAK-201）を用いてpTA2ベクターにクローニングしましたが、まさにそのプラスミドを用いることができます。ただ、作業が複雑になるのでそれなりの覚悟が必要です。また、逆転写反応時のプライマーの選択にも注意が必要です。

最も簡単でリーズナブルなのが、大量に目的RNAを発現していると思われる培養細胞や組織などのRNAを希釈して使用する方法です。コピー数は不明ですが、相対的なコピー数とCt値の関係が分かれば良いわけですから、この方法で全く問題ありません。

最後の一つは、遺伝子をクローニングしたプラスミドDNAをそのまま用いる方法です。ただ、この方法はRT反応のコントロールにはならないことを頭に入れておく必要があります。DNAウィルスの定量などには最適な方法です。

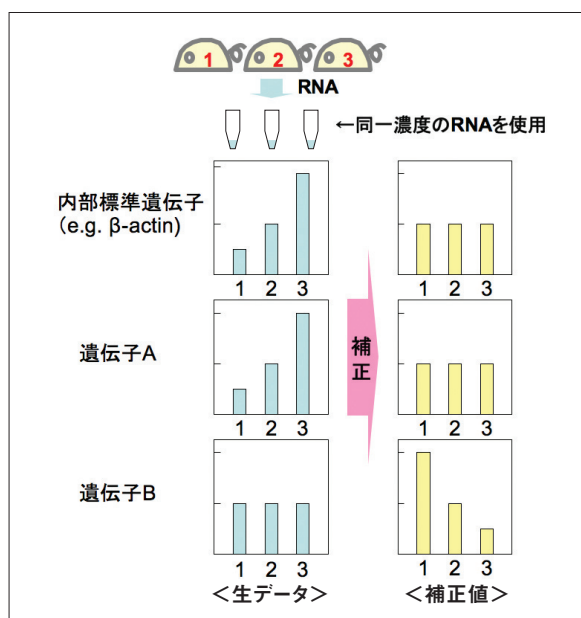


図8 内部標準を用いた定量のイメージ

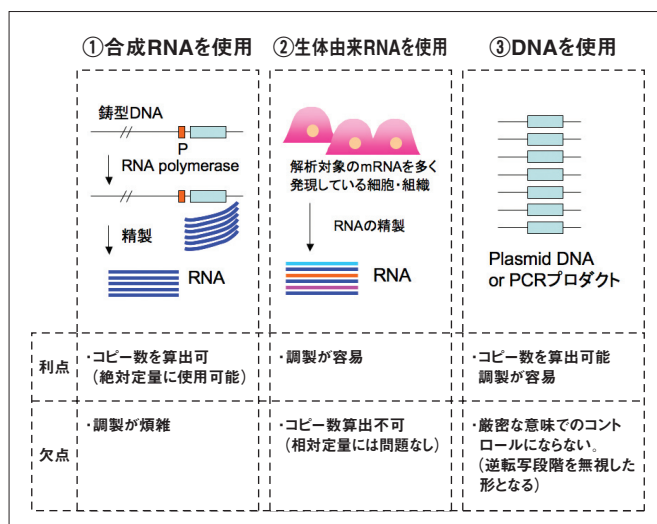


図9 検量線作成に用いられる標準サンプル

2-5 いざ、リアルタイムPCR

昨日は、あれから延々と定時を過ぎてもリアルタイムPCR談義が続きました。A子さんは少し疲れしました。今日は、以前同じチームだったAK先輩と、M田さんのアシスタントのS本さんとリアルタイムPCRの実験をすることになっています。



LineGene外観

使用するキットとしては、初心者の方A子さんにも分かりやすい1ステップリアルタイムPCRキット『RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix』なる試薬を用います。これは現在、AK先輩が開発しているキットで、今回A子さんはついでにモニターを務めることになりました。装置は、自社販売のLineGene (Bioflux社製)を使用します。この装置は10μlからでも安定した結果が得られるので、かなり経済的です。

今回、サンプルとして使用するDNase I処理済のTotal RNAは既に準備されていました。A子さんは、RNAのDNase I処理で以前つまづいた苦い経験があります (Vol.2参照)。とにかくRT-PCRに用いるサンプルにDNA成分がないことを確認することが重要です。

今回の実験では、A子さんの設計したプライマーペア (2F,3R)を用いてTFRの発現量の比較を行います。内部標準はβ-actinを用います。また、検量線用のコントロールサンプルは、今から定量に用いる臓器由来のTotal RNAからTFR遺伝子の発現量の高そうなものを幾つか選んで混合して使用します (今回はheartとPlacentaを混合して使用しました)。検量線用サンプルは培養細胞由来のRNAなどもかまいません。今回、検量線用のRNAは、50ng/μlのものを5th希釈して、2μl使用しました (プロトコル#4)。定量用のサンプルは、10ng/μlのものを2μlずつ用いました。得られた結果を図10に示します。初めてにしては上出来です!

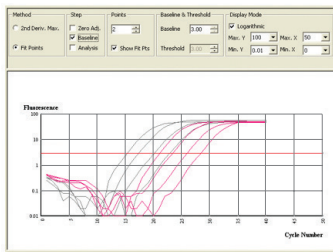


図10 LineGeneの解析画面
青がβ-actin、赤がTFR

定量の計算は、S本さんのノートに書いてあった計算の手順 (表1)に従ってExcelで計算しました。この手順に従うと、相当大変だと思っていた作業がほんの30分以内でできてしまいました。S本さんのこの表はとても便利です。また、今回作成した検量線を図11に示します。

臓器ごとの結果をまとめたのが図12です。以前行ったノーザンブロット解析では、HeartとPlacentaで発現が多く、MuscleでのTFRの発現はそれほど多くないという結果でしたが、今回の結果を見るとMuscleの発現が最も多いようです。不思議に思ったA子さんは、以前のノーザンブロットの結果を見直してみました (Vol.2参照)。そして、Muscleでは、筋肉性のactinの発現に隠れて、実はβ-actinがそれほど検出されていなかったことが判明しました。前回の結果では、MuscleのTFRの発現量を低く見積もっていたのです。

【プロトコル#4】1ステップ法

RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mixを用いるリアルタイムPCR

DW	2.2 μl
Master Mix	5
Primer F (10pmoles/μl)	0.4
Primer R (10pmoles/μl)	0.4
RNA溶液	2
Total	10

※左記はLineGene用の組成を示しています。容量は変更可能で、様々な装置にお使いいただけます。サイクルは一例です。

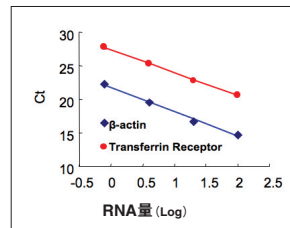
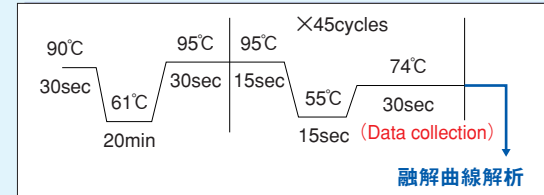


図11 検量線

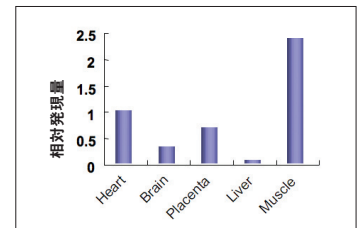


図12 相対定量の結果

表1 相対量の算出方法

①使用したRNA量もしくはコピー数のLog値を求める
(100の場合は $\log_{10}100=2$
Excelでは、 $=\log(100,10)$)

②RNA濃度(Log)とCt値から検量線を作成し(片対数)、傾きと切片を算出する
(Excelの"SLOPE", "INTERCEPT", "RSQ"の関数を用いると便利)

③検量線にCt値を代入して、出した値(Logの値になっている)

④計算で得られた指数(③)を用いて10の乗乗を求める

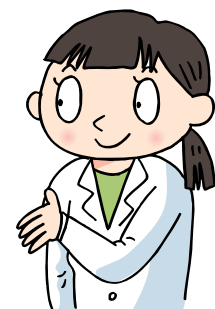
⑤β-actin(内部標準)の定量値で割り算

ここで得られる定量値の単位は、厳密にはngとかコピー数とかになるが、相対定量なので無視する。

ここはコピー数とかでもOK

検量線の式は $Ct=a \times (\text{RNA濃度のLog値})+b \Rightarrow$ 各サンプルのRNA濃度のLog値(計算値③) $=(Ct-b)/a$

RNAサンプル	β-actin			Transferrin Receptor				
	Ct	計算値	定量結果	Ct	計算値	定量結果	補正結果	相対量
Heart (20ng)	20.00	0.475	2.980	25.52	0.538	3.443	1.155	1
Brain (20ng)	17.12	1.276	18.851	24.44	0.851	7.087	0.376	0.33
Placenta (20ng)	17.37	1.207	16.062	23.54	1.113	12.933	0.805	0.7
Liver (20ng)	18.99	0.756	5.691	28.58	-0.350	0.445	0.078	0.07
Muscle (20ng)	19.62	0.581	3.802	23.86	1.020	10.443	2.747	2.38
Standard用RNAサンプル								
2 (100ng)	14.73			20.55				
1.301 (20ng)	16.74			22.76				
0.602 (4ng)	19.49			25.36				
-0.097 (0.8ng)	22.19			27.71				
検量線								
傾き(a)		-3.595			-3.445			
切片(b)		21.708			27.373			
相関係数		0.995			0.999			



「さすがPCR だな」とA子さんは思いました。ちなみに、この試薬は秋には発売になるようです。

外に耳を澄ますと、うるさいほどセミの音が聞こえてきます。週末はみんなで近くの砂浜に海水浴に行く予定です。ゴムボートを持って。

A子さん 核酸のコピー数はどうやって求めるのですか？

以前学校で習ったのでは？ 以下のようにして求めます。

$$\text{コピー数 (コピー/}\mu\text{l)} = A/B \times 6.02 \times 10^{14}$$

M田さん A=吸光度から求めた核酸の濃度 (ng/μl)

B=核酸の分子量

(分子量はDNA 1bp=660、RNA 1b=330 (近似値) を用います)

A子さん 今回紹介した試薬類は他社の装置で使えますか？

M田さん ガラスキャピラリータイプのものから、パッシブリファレンスを用いるものまで、幅広い装置で問題なく使用可能です。また、全てのキットには抗ポリメラーゼ抗体が混合されているので、ホットスタート法により非特異反応を飛躍的に軽減することができます。

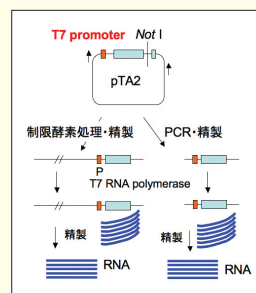
A子さん Ct値の求め方が少し分かりにくいのですが。

M田さん 機器によっては自動計算でCtを求めてくれるものもあるようですが、対数増幅期の前半部分の安定した領域を選んでもらっても問題ないと思います。

A子さん プラスミドを鋳型としてRNAを合成したいのですが。

M田さん TAクローニングキット『TARget Clone™』に用いられているプラスミドはT7およびT3プロモーターを保有しています。よって、T7もしくはT3 RNAポリメラーゼを用いて転写反応を行うことができます。転写には、高効率T7転写キット『ScriptMAX® Thermo T7 Transcription kit (Code No.:TSK-101)』を使うと便利かも知れません。

転写後は、DNase IによってDNAを分解し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール処理を行った後、エタノール沈殿を行います。その後、沈殿を、RNase freeの水に溶解し、濃度を測定しコピー数を算出します。



製品紹介 (T社バイオ研究所における定番製品)

説明	品名	包装	Code No.	価格
2ステップリアルタイムPCR用試薬 (逆転写反応とPCRを別に行うタイプ) *逆転写には、別途ReverTra Ace α-®などのRT試薬が必要です。				
高効率逆転写キット (リアルタイムPCRのRTに最適)	RevaTra Ace α-®	100回用	FSK-101	¥53,000
TaqMan®・プローブアッセイ用	Realtime PCR Master Mix (2×濃度)	200回用 (1ml×5本) 40回用 (1ml×1本)	QPK-101 QPK-101T	¥37,000 ¥10,000
インターカレーターアッセイ用	SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	200回用 (1ml×5本) 40回用 (1ml×1本)	QPK-201 QPK-201T	¥37,000 ¥10,000
インターカレーターアッセイ用 改良版	SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- (2×濃度)	200回用 (1ml×5本) 40回用 (1ml×1本)	QPK-211 QPK-211T	¥37,000 ¥10,000
1ステップリアルタイムPCR用試薬 (逆転写反応とPCRを同じ反応液中で行うタイプ) *逆転写・PCRともにTth DNA polymeraseで行います。				
TaqMan®・プローブアッセイ用	RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix (2×濃度) <Mn溶液別添>	100回用 (0.5ml×5本) 40回用 (0.5ml×2本)	QRT-101 QRT-101T	¥33,000 ¥17,000
インターカレーターアッセイ用	RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (2×濃度) <Mn溶液別添>	100回用 (0.5ml×5本) 40回用 (0.5ml×2本)	QRT-201 QRT-201T	¥33,000 ¥17,000
高性能リアルタイム核酸増幅モニタリング装置				
リアルタイム核酸増幅モニタリング装置	LineGene (本体+ソフトウェア)	1式	BFFQD-33A	¥1,890,000
高正確PCR用酵素	KOD -Plus-	200U×1本	KOD-201	¥30,000
” (さらに高効率)	KOD -Plus- Ver.2	200U×1本	KOD-211	¥32,000
高性能Taqポリメラーゼ	Blend Taq®	250U×1本	BTQ-101	¥19,000
” (Hot start可能)	Blend Taq® -Plus-	250U×1本	BTQ-201	¥21,000
TA クローニングキット	TARget Clone™	10回用	TAK-101	¥12,000
” (KOD専用)	TARget Clone™ -Plus-	10回用	TAK-201	¥16,000
PCRのスタンダード酵素	rTaq DNA Polymerase	250U×1本	TAP-201	¥25,000
ホットスタート用抗Taq抗体	anti-Taq high	100μl	TCP-101	¥16,000
高効率T7転写キット	ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit	60回用	TSK-101	¥28,000

*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。*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。



東洋紡績株式会社

ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
(E-mail) order_lifescience@bio.toyobo.co.jp



ライフサイエンス事業部 (東京)
〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951
(E-mail) order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

Toyoboテクニカルライン

TEL 06-6348-3888
(9:00~12:00 13:00~17:00 (土、日、祝を除く))
FAX 06-6348-3833
(E-mail) techosk@bio.toyobo.co.jp

Toyobo Web Site

[http://www.toyobo.co.jp/bio]

取扱店