

ReverTra Ace® qPCR RT Kitを用いた レア発現遺伝子の検出比較例

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 川井 淳

はじめに

ReverTra Ace® qPCR RT KitはリアルタイムPCRに用いるcDNAの合成に最適なキットとして開発されました。高効率逆転写酵素:ReverTra Ace®をベースに、最適化されたOligo dTとRandom primerのmixture、及び改良されたBuffer条件の採用により効果的な逆転写反応を実現しています。本キットを用いることにより、様々なRNAから効率良くcDNA合成を行うことができ、リアルタイムPCR解析の感度を向上させることができます。今回、HeLa細胞より精製したTotal RNAをサンプルとして、HeLa細胞中での発現量が低いと報告されている、TNF- α 、IL-8、及びKRT(Keratin)10のmRNAの検出を各社キットを用いて行い、検出感度を比較しました。



方 法

まず、ヒト由来細胞株であるHeLa細胞から精製したTotal RNA 100ngを各社の逆転写キットを用いて逆転写反応(10 μ l)を行いました。次に、合成したcDNA溶液がリアルタイムPCR反応液の10%となるように添加し、リアルタイムPCR解析により、TNF- α 、IL-8、及びKRT(Keratin)10遺伝子の検出効率の比較を行いました。さらに、TNF- α に関しては、リアルタイムPCR反応液の2%になるように添加したのに関して、検出限界付近での感度の比較を行いました(n=5)。本実験において、リアルタイムPCR試薬は、SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Code No.:QPK-201)を、検出装置はLineGene (Code No.:BFFQD-33A)を用いました。

cDNA合成の条件は、以下のとおりです。

ReverTra Ace® qPCR RT Kit : 37°C, 15min
 A社 : 37°C, 15min
 B社 : 25°C, 10min → 50°C, 30min
 C社 : 42°C, 15min
 D社 : 25°C, 10min → 37°C, 2hr

結果及び考察

リアルタイムPCRによって測定されたCt値(表1)と、算出されたcDNA定量値(図1)を以下に示します。cDNA定量値は、それぞれの遺伝子において、全キット間で最も高かった値を100とし、各キットでの相対値を示しています。

表1. リアルタイムPCRによって測定されたCt値とcDNA定量値

	TNF- α		IL-8		KRT10	
	Ct	cDNA定量値(相対量)	Ct	cDNA定量値(相対量)	Ct	cDNA定量値(相対量)
ReverTra Ace® qPCR RT Kit	31.60	100	28.97	100	18.56	100
A社キット	32.01	75.00	29.00	97.94	19.93	38.82
B社キット	32.61	49.65	29.78	56.84	20.60	24.32
C社キット	32.25	63.51	29.11	90.75	20.01	36.60
D社キット	33.42	28.32	28.98	99.31	18.96	76.05

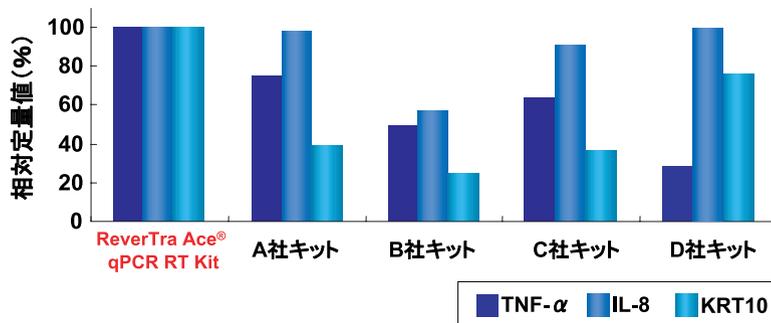
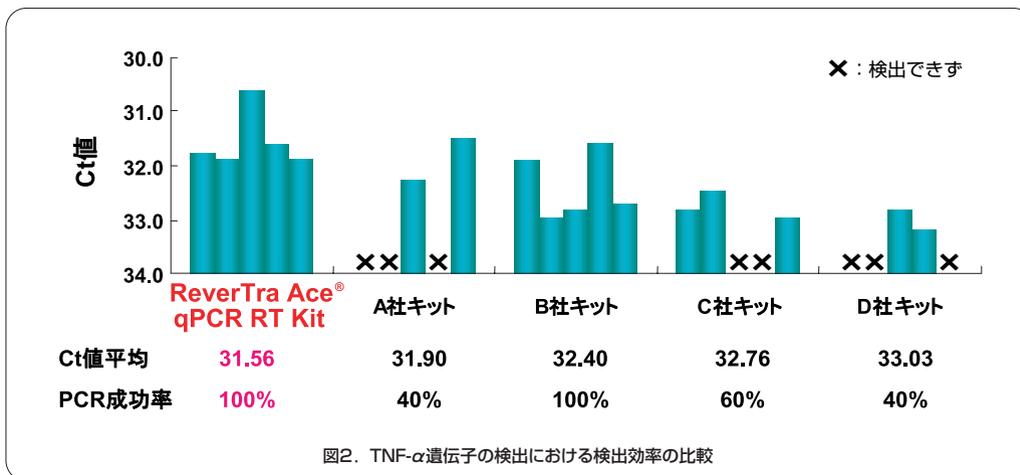


図1. レア発現遺伝子の検出における検出効率の比較

結果より、ReverTra Ace® qPCR RT Kitを用いてcDNA合成した場合の相対量が最も高く検出され、高効率に逆転写されていることが示されました。

KRT10遺伝子はレア発現遺伝子という報告もあるようですが、今回の検討では発現量が比較的多いことを示す結果が得られました。これに関しては、培養条件等によって発現量が変化したことなどが理由として考えられます。



TNF-αについて逆転写反応溶液を2%持ち込んでn=5で解析した結果を図2に示します。結果、TNFαはHeLa細胞において発現量が低く、全ての反応でCt値は30を超えましたが、弊社ReverTra Ace® qPCR RT Kitを用いた逆転写反応では、Ct値が最も小さく、高感度な検出が可能でした。また、行った5反応の成功率は100%でした。それに対し、他社キットの逆転写反応液を用いた場合は、PCR成功率自体も低く、また、Ct値も相対的に高い傾向にありました。

おわりに

ReverTra Ace® qPCR RT KitはcDNA合成効率が高く、さらに逆転写反応液をリアルタイムPCR試薬へ最大20%まで持ち込むことができるという利点もあり、発現量の低い遺伝子の定量にも適しています。また、本キットは、反応系が簡略化されており、短時間で反応を完了することができます。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
Realtime PCR用cDNA合成キット ReverTra Ace® qPCR RT Kit 5×RT Buffer Enzyme Mix Primer Mix Nuclease-free Water	200回用*	-20℃	FSQ-101	¥38,000

* 1反応を10μlで行った時の使用回数を表示しています。

Web de 温故知新

過去に紹介した記事で、今号に関連のある記事をピックアップしてご紹介するコーナーです。

『Can Get Signal®』(本誌p.14~16掲載)

Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution (以下Can Get Signal®)は、主にウェスタンブロット解析でお使いの先生方が多いかと思いますが、ELISAなどの解析においても同じく威力を発揮します。ウェスタンブロット解析と同じように、Kdの高い抗体や特性の甘い抗体などに有効であることが確かめられています。His-tag融合タンパク質の定量などに有効です。

また、Can Get Signal®の姉妹品であるCan Get Signal® immunostain Immunoreaction Enhancer Solution (以下Can Get Signal® immunostain)は、免疫組織染色用に特化された試薬であり、発色や蛍光法における検出で力を発揮します。

最近、Can Get Signal®シリーズの試薬が増えたこともあり、どの試薬をどういうときに用いたら良いかという質問をお受けする回数が増えました。弊社のウェブサイト(www.toyobo.co.jp/bio)の実験お助けコーナーに掲載中の「私にもできた! ライフサイエンス実験シリーズ Vol.3」に分かりやすくまとめているので、是非一度ご覧ください。

また、本誌p.14~16のQ&Aのコーナーにも少しだけ掲載しましたが、Can Get Signal®シリーズを引用していただいている論文の数が増えているようです。Googleで“Can Get Signal” (“ ”で囲んで)と入力してみてください。今回ご紹介させていただいた以上の論文をご参照いただけます。