

はじめてのリアルタイム PCR

1. はじめに

リアルタイム PCR 法は、PCR 増幅産物の増加をリアルタイムでモニタリングし、解析する技術です。エンドポイントで PCR 増幅産物を確認する従来の PCR 法に比べて、

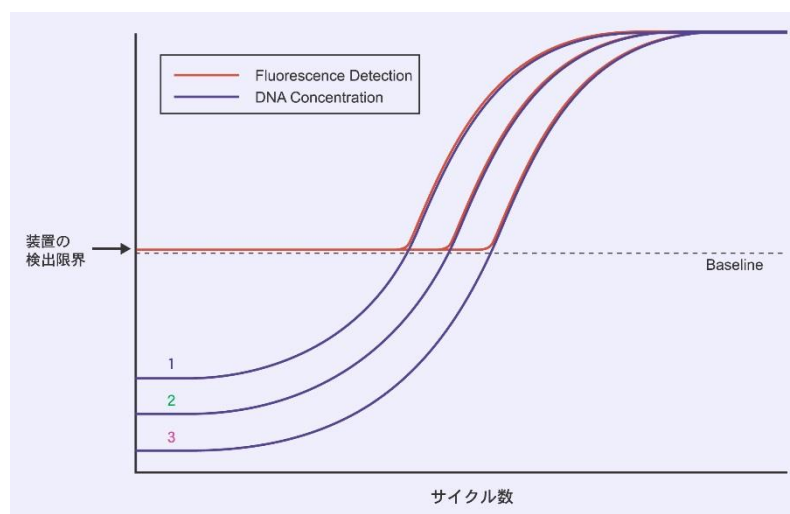
- ①DNA や RNA の正確な定量ができること
- ②電気泳動が不要なので迅速かつ簡便に解析できコンタミネーションの危険性も小さいこと

など多くの利点があります。今や、遺伝子発現解析や SNP のタイピングなどにリアルタイム PCR 法は欠かせないツールとなりました。ここでは、はじめてリアルタイム PCR 実験をされる方を対象に、リアルタイム PCR 法の原理や実験・解析手法などを簡単に解説します。

2. リアルタイム PCR による定量の原理

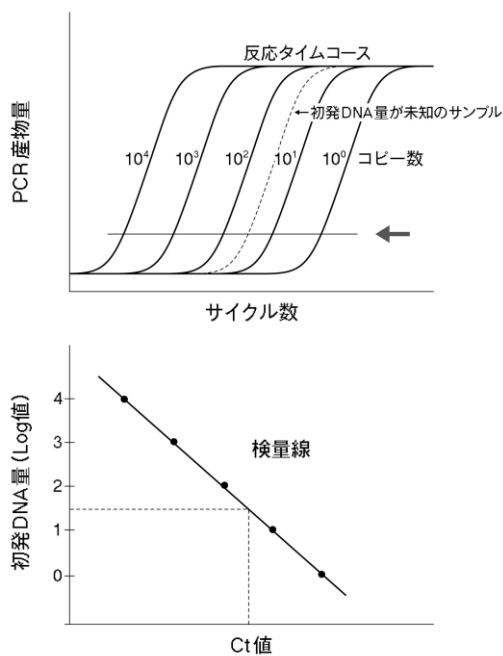
まずは、リアルタイム PCR による定量の仕組みを見ていきましょう。リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングし指数関数的増幅領域で定量を行うため、従来技術の RT-PCR 法などとは異なり、PCR の増幅速度論に基づいた正確な定量が可能です。

PCR では、1 サイクルごとに DNA が 2 倍、2 倍、・・・と指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達します。この増幅の様子をリアルタイムモニタリングした図が増幅曲線です。下の模式図では、DNA 濃度（実際の増幅産物量）を青線で示し、それを蛍光により検出したシグナル強度を赤線で示しました。PCR 増幅産物量が蛍光検出できる量に達すると増幅曲線が立ち上がり始め、指数関数的にシグナルが上昇した後、プラトーに達します。



初発の DNA 量が多いほど、増幅産物量が検出可能な量に達するサイクル数は少なくて済みますので、増幅曲線が早く立ち上がってきます。よって、段階希釈したスタンダードサンプルを用いてリアルタイム PCR 反応を行うと、初発 DNA 量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が得られます。ここで、適当なところに閾値 (Threshold) を設定すると、閾値と増幅曲線が交わる点 : Ct 値 (Threshold Cycle) が算出されます。

Ct 値と初期鋳型量の間には直線関係があり、下図のような検量線を作成することができます。未知サンプルについてもスタンダードサンプルと同様に Ct 値を算出し、この検量線に当てはめれば、初期鋳型量を求めることができます。



3. リアルタイム PCR 装置と検出方法

では、リアルタイム PCR では、どのようにしてチューブ内の PCR 増幅産物を検出するのでしょうか。ここでは、リアルタイム PCR 装置と PCR 増幅産物の検出方法について解説します。

装置

リアルタイム PCR を行うには、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化したリアルタイム PCR 専用装置が必要です。サーマルサイクラーで DNA を PCR 増幅しつつ、分光蛍光光度計でその増幅産物をモニタリングしていきます。リアルタイム PCR 装置はさまざまな機種が販売されており、96 ウェルのプレート単位で反応できるもの（Thermal Cycler Dice Real Time System 他）や、高速で PCR 反応が行えるように工夫されたもの（Smart Cycler System 他）など、それぞれ特性を備えています。

Thermal Cycler Dice Real Time System III

Applied Biosystems 7500

リアルタイム PCR システム



(タカラバイオ)



(Thermo Fisher Scientific 社)

LightCycler

Smart Cycler



(Roche Diagnostics 社)



(Cepheid 社)

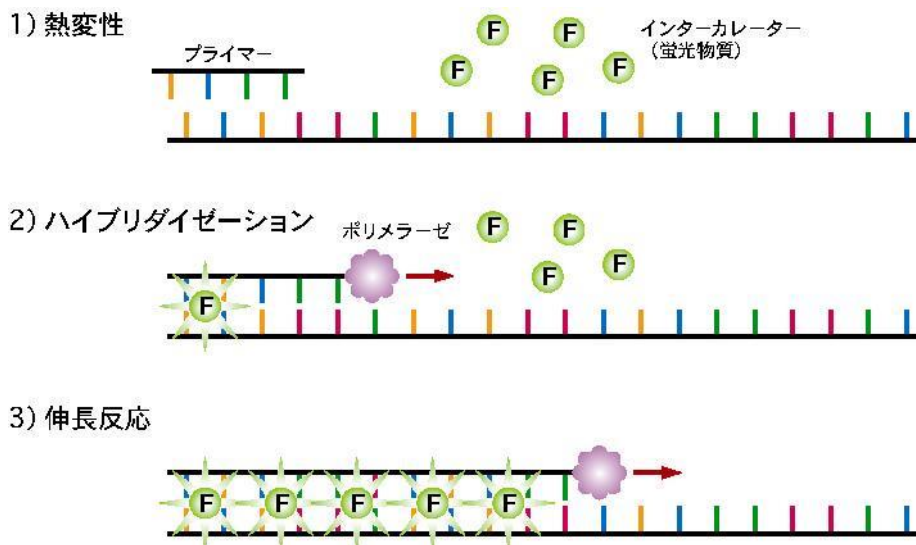
検出方法の選択

リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物を蛍光により検出します。検出方法は、大きく分けてインターカレーターを用いる方法と蛍光標識プローブを用いる方法の 2 種類があります。インターカレーター法は、二本鎖 DNA をすべて検出するため遺伝子ごとにプローブを用意する必要がありません。実験コストが安く反応系の構築も容易なのが長所ですが、検出特異性はあまり高くありません。一方、蛍光標識プローブを用いる方法は、コストは高くなりますが、検出特異性が高いので相同性の高い配列同士も区別して検出できます。検出方法は、実験の目的に応じて選択します。

検出方法の原理

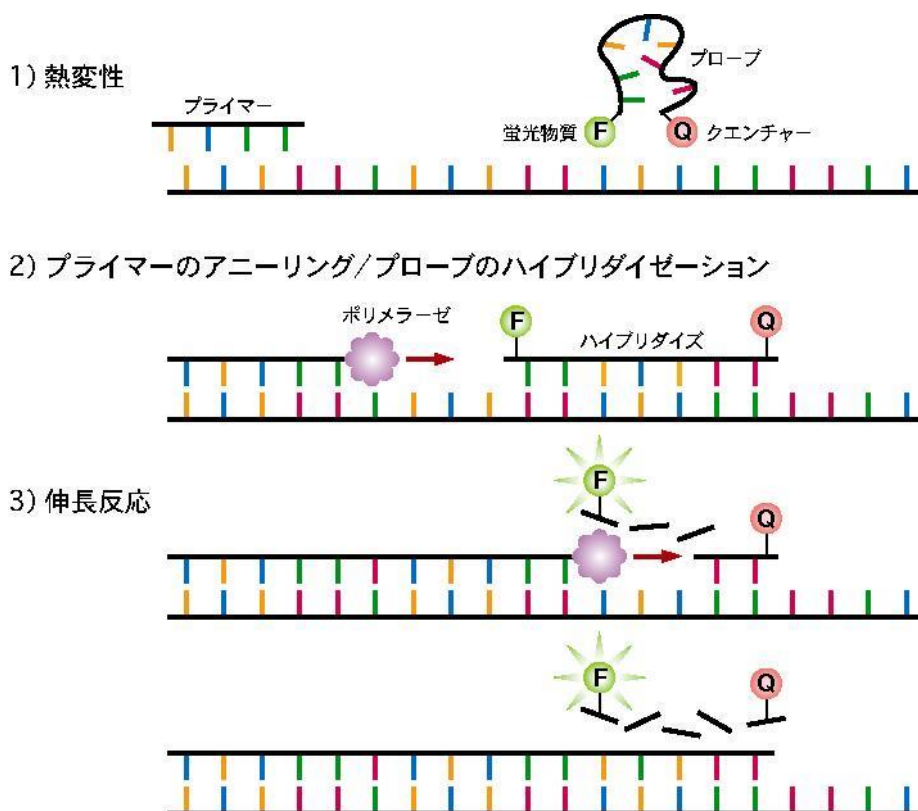
(1) インターカレーター法

インターカレーターは、二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬です。PCR 反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合し、励起光の照射により蛍光を発します。この蛍光強度を検出することにより、増幅産物の生成量をモニターできます。



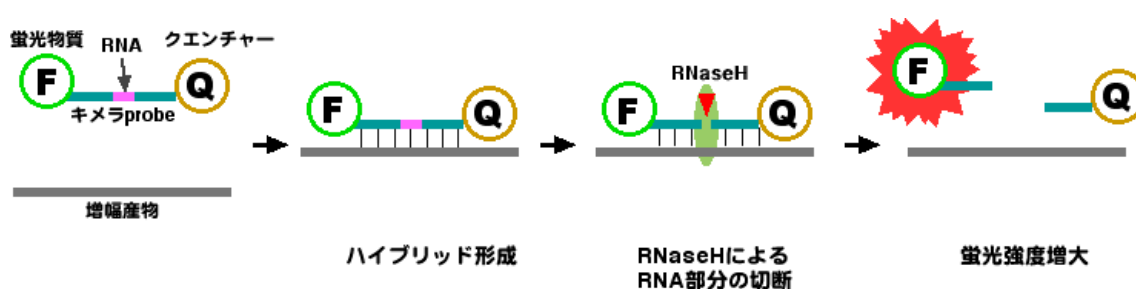
(2) プローブ検出 (5' -ヌクレアーゼ法)

5' 末端を蛍光物質で、3' 末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる方法です。プローブは、アニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズしますが、プローブ上にクエンチャーが存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制されます。伸長反応ステップのときに、*Taq* DNA ポリメラーゼのもつ 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により、鋳型にハイブリダイズしたプローブが分解されると、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光が発せられます。



(3) サイクリングプローブ検出 (CyclecleavePCR 法)

サイクリングプローブ検出は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法です。プローブは一方の末端が蛍光物質で、もう一方の末端がクエンチャー物質で標識されています。このプローブは、インタクた状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNaseH により RNA 部分が切断されると、強い蛍光を発するようになります。また、サイクリングプローブの RNA 付近にミスマッチが存在すると RNaseH による切断は起こりませんので、非常に配列特異性の高い検出方法であり、SNPs タイピングなどに最適です。



4. プライマー設計

リアルタイム PCR 実験の第一ステップは、目的の遺伝子を検出できるプライマー（およびプローブ）の入手です。専用ソフトウェアを用いて自分で設計する他に、設計済みのものをご購入して使用することもできます。

プライマー設計は、リアルタイム PCR を成功させるためにもっとも重要なステップです。PCR 増幅効率が悪いプライマーでは高感度検出ができませんし、プライマーダイマーなどの非特異的増幅が起こりやすいようなプライマーでは正確な定量が困難です。プライマー設計専用のソフトウェアを用いて、下記の条件を満たすようなプライマーを設計しましょう。

- ・ 標的の DNA 配列に安定してアニーリングできる (T_m 値が適切な範囲である)
- ・ PCR 反応効率が良い (プライマー内部やプライマー間に相補的な配列がない)
- ・ 特異性が高い (鋳型 DNA 上にミスプライミングする部位がない)

* 詳しくは、[「プライマー設計のガイドライン」](#)をご参照ください。

[Perfect Real Time サポートシステム](#)は、このような条件を考慮して設計されたプライマー（インターカレーター法によるリアルタイム RT-PCR 用）をカスタム合成するサービスです。ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq 登録遺伝子または Ensembl Plants 登録遺伝子について多くのプライマーセットが用意されていますので、リストから選んで購入するだけですぐに実験できる便利なシステムです。市販のプライマーやカスタム設計サービスも上手にご利用ください。

なお、検出に蛍光標識プローブを使用する場合には、プライマーとプローブの相互作用が検出効率に大きく影響することがありますので、プライマーとプローブを同時に設計するようにします。設計の方法はプローブの種類によって異なり、それぞれ専用のソフトウェアが用いられます。

5. 実験プロトコール

リアルタイム PCR 実験は、実際にはここに示すような方法で行います。ここでは、インターカレーター法（TB Green 検出）によるリアルタイム RT-PCR の操作方法の例を紹介します。

用意するもの（主なもの）

リアルタイム PCR 装置および専用チューブ

- Thermal Cycler Dice Real Time System II（製品コード TP900）

リアルタイム PCR 用プライマー

リアルタイム RT-PCR 用試薬

- PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード R037A）
- TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820A）

鋳型 total RNA

マイクロピペットおよびチップ

プロトコール

逆転写反応【PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)を使用】

1. 下記に示す逆転写反応液を氷上で調製する。

RNA サンプル以外のコンポーネントを必要本数 + α 調製し、マイクロチューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

<1 反応あたり>

試薬	使用量	最終濃度 (または添加量)
5×PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μ l	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μ l	0.5 mM
Oligo dT Primer (50 μ M) *1	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M) *1	0.5 μ l	50 pmol
total RNA		
RNase Free dH ₂ O		
Total	10 μ l *2	

*1 Random 6 mers と Oligo dT Primer の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer の場合の使用量は以下の通りです。

	使用量	添加量
Oligo dT Primer (50 μ M)	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M)	0.5 μ l	50 pmol
Gene Specific Primer (2 μ M)	0.5 μ l	1 pmol

*2 逆転写反応は、必要に応じてスケールアップすることも可能です。10 μ l の反応液で逆転写できるのは、およそ 500 ng までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。

37°C、15 分*3 (逆転写反応)

85°C、5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)

4°C

*3 Gene Specific Primer を用いる場合には、逆転写反応を 42°C、15 分で行う。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50°C に変更すると改善される場合がある。

リアルタイム PCR 反応【TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) を使用】

(Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズを用いる場合)

1. 下記に示す PCR 反応液を 氷上で調製する。

<1 反応あたり>

試薬	使用量	最終濃度
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (Tli RNaseH Plus) (2×)	12.5 μ l	1×
PCR Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M *1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M *1
Template (<100 ng)	2 μ l	*2
滅菌精製水	8.5 μ l	
Total	25 μ l *3	

*1 最終 primer 濃度は 0.4 μ M で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2~1.0 μ M の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

*2 template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA (RT 反応液) を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

*3 反応液量は 25 μ l を推奨。

2. 反応を開始する。

反応チューブを軽く遠心後、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始する。

<シャトル PCR 標準プロトコール>

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。T_m 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。

(初期変性)

95°C、30 秒

(PCR 反応 : 40 サイクル)

95°C、5 秒

60°C、30 秒

(融解曲線分析)

操作方法の詳細は、リアルタイム PCR 試薬の取扱説明書およびご使用のリアルタイム PCR 装置の説明書でご確認ください。

注意事項

- RNA を取扱うときは、グローブとマスクをしてください。

- ・反応液を調製するときは、必要本数+ α のマスタミックスを用意して分注します。
- ・PCR 反応液への逆転写反応液の持込は、PCR 容量の 10%を超えないようにします。

6. 解析方法 ー相対定量ー

リアルタイム PCR 実験により定量結果が得られたら、これらの結果を解析して相対量を求めます。解析ソフトウェアによっては、一連の作業が自動化されているものもありますが、解析手順を一度、確認しておきましょう。

ある遺伝子の mRNA 発現量を異なるサンプル間で比較するには、目的の遺伝子の他にハウスキーピング遺伝子も同時に測定して相対定量を行います。ハウスキーピング遺伝子の測定値により RNA 量を補正することで、サンプル間の正確な比較ができます。ここでは、具体例を交えながら、相対定量の手順について解説します。

(1) 実験例

3 種の RNA サンプルについて、遺伝子 X の mRNA 発現量を比較する。

発現量を測定する遺伝子：

遺伝子 X：解析目的遺伝子

遺伝子 H：ハウスキーピング遺伝子

RNA サンプル：

A、B、C の 3 種

(2) リアルタイム PCR 反応と定量結果

遺伝子 X と遺伝子 H のそれぞれについて検量線を作成し、未知サンプルの定量を行います。下表に反応例とその結果をまとめました。6 段階濃度のスタンダードを用いて検量線を作成し、そこに RNA サンプル A、B、C の Ct 値を当てはめて定量した結果です。

	遺伝子 X			遺伝子 H		
	既知量	Ct	定量結果*1	既知量	Ct	定量結果*1
スタンダード 1	1	35.66	-	1	37.46	-
スタンダード 2	10	32.77	-	10	33.06	-
スタンダード 3	100	29.20	-	100	29.69	-
スタンダード 4	1000	25.75	-	1000	26.10	-
スタンダード 5	10000	22.06	-	10000	22.51	-
スタンダード 6	100000	18.62	-	100000	18.88	-
RNA サンプル A	-	27.22	343.4	-	23.17	6391.5
RNA サンプル B	-	31.70	17.3	-	22.70	8589.7
RNA サンプル C	-	24.62	1946.1	-	22.93	7432.9

(3) 相対定量

次に、得られた定量結果をもとに、遺伝子 X の相対量を求めます。解析の手順は、下記の通りです。表の結果を参照しながら、手順を確認してください。

	遺伝子 H	遺伝子 X		
	定量結果*1	定量結果*1	補正值*2	相対量*3
RNA サンプル A	6391.5	343.4	0.054	1.000
RNA サンプル B	8589.7	17.3	0.002	0.037
RNA サンプル C	7432.9	1946.1	0.262	4.874

*1 定量結果

Ct 値を検量線に当てはめて得られた定量結果です。このままでは、遺伝子 X の発現量をサンプル間で直接比較することはできません。

*2 補正值

ハウスキーピング遺伝子の発現量により、RNA 量の補正を行います。補正值は、目的遺伝子（遺伝子 X）の定量結果をハウスキーピング遺伝子（遺伝子 H）の定量結果で割ることにより求められます。

*3 相対量

発現量の差を把握しやすいように、コントロールサンプルを“1”とした場合の相対量を求めます。ここでは、RNA サンプル A をコントロールとし、各サンプルの補正值を RNA サンプル A の補正值で割ることにより、相対量を求めました。

(4) まとめ

相対定量の結果から目的遺伝子 X の発現量は、サンプル A を"1"とした場合、サンプル B、C ではそれぞれ"0.037"、"4.874"に発現量が増減していることが分かりました。

このように、相対定量を行うことで、同一遺伝子の発現量を異なるサンプル間で比較することが可能となります。逆に、異なる遺伝子が同一サンプル内でどのような量比で発現しているかを正確に求めることはできません。相対定量で定量できるものとできないものをよく理解しておくことが重要です。

7. おわりに

以上、リアルタイム PCR について基本的な事項を解説してきました。これから実際に実験を行っていく中で分からないことが出てきたときや、リアルタイム PCR をもっと詳しく知りたいという方は、[「リアルタイム PCR 実験ガイド」](#)もご参照ください。定量方法やプライマー設計方法などについて、より詳細に解説しています。また、さまざまなアプリケーションデータも紹介していますので、ぜひ一度ご覧ください。