

# リアルタイム PCR 実践編

## - SYBR Green I によるリアルタイム RT-PCR -

### 1. プライマー設計

- (1) [Perfect Real Time サポートシステム](#)を利用し、設計済みのものを購入する。  
ヒト、マウス、ラットの RefSeq 配列の大部分については、Perfect Real Time サポートシステムが利用できます。目的の遺伝子を検索して購入してください。
- (2) カスタム設計サービスを利用する  
Perfect Real Time サポートシステムでプライマーが用意されていない遺伝子や、ヒト、マウス、ラット以外の生物種については、カスタム設計サービスを利用できます。詳しくは、弊社販売課にお問合せください。
- (3) 自分で設計する  
「[プライマー設計ガイドライン](#)」を参照して設計してください。

### 2. SYBR Green I によるリアルタイム RT-PCR

- (1) 用意するもの（主なもの）
  - ・ SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR083A)
  - ・ リアルタイム PCR 用プライマー
  - ・ 鋳型 (total RNA)
  - ・ リアルタイム PCR 装置と専用チューブ

## (2) プロトコール

### 逆転写反応

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+ $\alpha$  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 $\mu$ l	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 $\mu$ l	0.5 mM
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	50 pmol
total RNA		
RNase Free dH <sub>2</sub> O		
Total	10 $\mu$ 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 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	50 pmol
Gene Specific Primer (2 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ 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  $\mu$  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 (Thermal Cycler Dice Real Time System 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(または添加量)
SYBR <i>Premix Ex Taq</i> II (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM *1
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM *1
Template (<100 ng)	2 μl	*2
dH <sub>2</sub> O (滅菌蒸留水)	8.5 μl	
Total	25 μl <sup>*3</sup>	

\*1 最終 primer 濃度は 0.4 μM 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 μM 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 μl 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(サイクル条件は以下を参照)。

### (3) リアルタイム PCR 反応条件

#### 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。アニーリング/伸長時間は 20~30 秒に設定できますが、より安定した結果が得られる 30 秒で、まずお試してください。T<sub>m</sub> 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、10 秒

(PCR 反応 : 30~45 サイクル)

95°C、5 秒

60°C、20 秒 \*

### (融解曲線分析)

\* 使用するリアルタイム PCR 装置によっては、30 秒 (31 秒、34 秒) 以上の設定が必要。

### 初期変性

RT-PCR を行う際には初期変性は 10 秒に設定します。

通常、鋳型がゲノム DNA の場合は 30 秒程度の初期変性を行います。500 bp 以下の鋳型では初期変性は不要な場合もあります。

### PCR 反応

PCR 反応は、シャトル PCR で行います。プライマーと鋳型 DNA のアニーリングが高温で行われるので、3 ステップ PCR に比べてより特異性の高い PCR 反応を行うことができます。また、反応所要時間も短く、上記条件で Smart Cycler によるリアルタイム PCR 反応を行うと、融解曲線分析まで含め 40 分以内に終了します。

### PCR 反応条件の至適化

ほとんどの場合、PCR 反応条件の至適化は必要ありませんが、反応性に問題があるときは、下記の手順で至適化を行います。

#### 【反応条件の至適化 (より効率の良い PCR 条件を探す)】

プライマーの配列によっては、アニーリング/伸長反応ステップの温度を 60°C よりも高めに設定すると、PCR 効率が良くなることがあります。アニーリング/伸長反応ステップの温度を上げると、プライマーと鋳型 DNA のアニーリングは起こりにくくなりますが、DNA ポリメラーゼの活性は上昇します。よって、高温でも十分にアニールできるプライマーでは、62~66°C で良い結果が得られます。また、短い DNA を鋳型とする場合には、変性のステップを短縮し、PCR 反応時間を短くすることができます。

#### 【反応性が悪い場合やプライマーの T<sub>m</sub> 値が適正範囲より低い場合】

T<sub>m</sub> 値が適正な範囲よりも低いプライマーを使用する場合には、上記の標準プロトコールでは PCR できないことがあります。そのような場合には、アニーリング/伸長反応ステップの時間を延ばすか 3 ステップの PCR を行います。反応性が悪い場合の対処方法も同じです。

#### 【非特異的増幅が起こりやすい場合やプライマーの T<sub>m</sub> 値が適正範囲より高い場合】

プライマーの 3' 末端配列に相補性があるとプライマーダイマーが生じやすく、3' 末端が GC リッチなものや、T<sub>m</sub> 値が適正な範囲を超えているようなものは、非特異的

増幅が起こりやすくなります。このようなプライマーでは、アニーリング／伸長反応ステップの温度を上げるかプライマー濃度を下げることにより改善する場合があります。しかし、非特異的増幅の抑制は、PCR 反応条件の変更だけでは対処できないケースが多いので、プライマーを設計する際に、できるだけ特異性が高く反応性の良いプライマーを選択することが重要です。

#### (4) 留意点

RT-PCR を行う場合、mRNA だけではなく混入したゲノム DNA も鋳型となり得ます。ゲノム DNA 由来の検出を避けるためには、PCR 用プライマーがエキソンジャンクションを挟むように設計します。プライマーに挟まれたイントロンのサイズが十分に大きければ、ゲノム由来の増幅は起こりませんが、シングルエキソンの遺伝子など、ゲノム由来の増幅を避けるプライマー設計が難しい場合には、逆転写酵素を添加しないコントロール反応を行います。このコントロール反応によって、ゲノム DNA の混入をチェックすることができます。