

III. 遺伝子発現解析

DNA メチル化やヒストン修飾が遺伝子発現に及ぼす影響を解析します。個々の遺伝子の発現解析には、リアルタイム RT-PCR が有用です。網羅的な遺伝子発現解析には、マイクロアレイが用いられます。

A. リアルタイム RT-PCR

- ◆エピジェネティクスと遺伝子発現の相関を解析
- ◆簡便で正確な定量が可能なリアルタイム RT-PCR がお勧め
- ◆プライマーは Perfect Real Time サポートシステムで

【1】原理

通常、CpG アイランドがメチル化されている遺伝子は、mRNA の発現が抑制されています。実際に mRNA の発現量を定量するには、簡便で正確なリアルタイム RT-PCR がお勧めです。



・リアルタイム PCR 専用の逆転写キット

-[PrimeScript™ RT reagent Kit \(Perfect Real Time\)](#)

-[PrimeScript™ RT Master Mix \(Perfect Real Time\)](#)

-[PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser \(Perfect Real Time\)](#)

本製品は、リアルタイム RT-PCR に最適化された逆転写反応キットです。伸長性能に優れた PrimeScript™ RTase を使用し、37°C 15 分の短時間反応で効率良くリアルタイム PCR 用の鋳型 cDNA を合成することができます。実験操作も簡単でハイスループットな解析にも適しています。ゲノム DNA 除去反応をプラスした gDNA Eraser 添付タイプも便利です。

・TB Green 検出系（インターカレーター法）リアルタイム PCR 試薬

- [TB Green™ Premix Ex Taq™ \(Tli RNaseH Plus\)](#)
- [TB Green™ Premix Ex Taq™ II \(Tli RNaseH Plus\)](#)
- [TB Green™ Premix DimerEraser™ \(Perfect Real Time\)](#)

TB Green Premix シリーズは、増幅効率と反応特異性に優れた TB Green 検出用のリアルタイム PCR 試薬です。増幅効率と特異性のバランスが取れた TB Green™ Premix Ex Taq™ II を 1st choice として、増幅効率抜群の TB Green™ Premix Ex Taq™ や極めて反応特異性の高い TB Green™ Premix DimerEraser™ を組み合わせて使用することにより、あらゆるケースで成功率の高いリアルタイム PCR を実現します。

・遺伝子発現解析用リアルタイム PCR プライマー

- [Perfect Real Time サポートシステム](#)

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 登録遺伝子に対するリアルタイム RT-PCR 用プライマーの合成受託サービスです。オンラインで簡単に検索&ご注文が可能で、プライマーの配列はご購入後に開示されます。TB Green Premix シリーズに最適なパラメータで設計されており、組み合わせて使用することにより成功率の高い実験が可能となります。

・リアルタイム PCR 装置

- [Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズ](#)

本装置は、低価格とコンパクトサイズを実現しながら、高性能ハードウェアと非常に使いやすいソフトウェアを搭載しており、自信をもってお勧めできる完成度の高いリアルタイム PCR 装置です。多波長モデル、1 波長モデル、さらに複数プレートにわたる多検体・多遺伝子の解析や複数リファレンス遺伝子による補正が簡単にできる相対定量解析ソフトウェア「Multiplate RQ」搭載モデルをご用意しており、研究目的に合わせてお選びいただけます。

【2】プロトコール

(操作方法の詳細は、各製品の説明書をご参照ください。)

逆転写反応

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)を使用する場合

(1) 以下の反応液を氷上で調製する

試薬	使用量	最終濃度
5×PrimeScript Buffer (for Real Time)	2.0 μl	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5 μl	25 pmol
Random 6mers (100 μM)	0.5 μl	50 pmol
total RNA	2.0 μl	*1
<u>RNase Free dH₂O</u>	<u>4.5 μl</u>	<u>*1</u>
Total	10.0 μl	

*1 total RNA 濃度によって適宜調整可能。通常、リアルタイム PCR の鋳型として、1 反応あたり 10~50 ng (total

RNA 相当量) の cDNA を使用する。リアルタイム PCR に 2 μ l を鋳型として添加するならば、cDNA 濃度が 5~25 ng/ μ l になるようにすると良い。なお、効率良く逆転写できる total RNA の上限量は、上記の 10 μ l 反応系で 500 ng までである。

(2) 逆転写反応を行う

37°C 15 分 (逆転写反応)
 85°C 5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)
 4°C Hold

(3) 必要に応じて cDNA (逆転写反応液) を希釈する

EASY Dilution (for Real Time)^{*2} を使用すると、低濃度まで正確に希釈できる。

*2 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) に添付されている。単品でも購入可能。

リアルタイム PCR

TB Green™ *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) を使用する場合

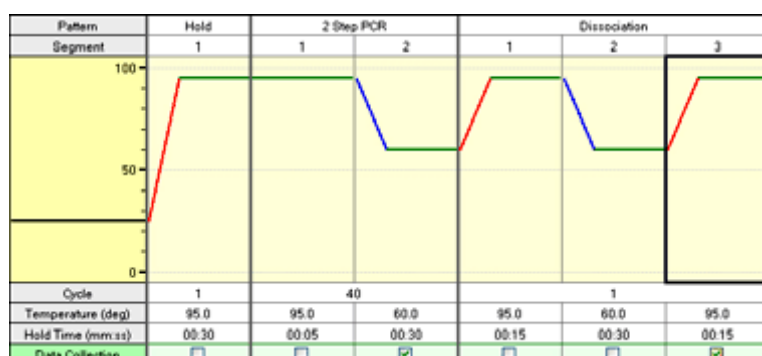
(1) 以下の反応液を調製する

試薬	使用量	最終濃度
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (2 \times)	12.5 μ l	1 \times
PCR Forward Primer (10 μ M)	1.0 μ l	0.4 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1.0 μ l	0.4 μ M ^{*1}
cDNA	2.0 μ l	^{*2}
滅菌精製水	8.5 μ l	^{*2}
Total	25.0 μl	

*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時は 0.2~1.0 μ M の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

*2 cDNA 濃度によって適宜調整可能。逆転写反応液の持ち込みは、2.5 μ l を上限とする。

(2) 以下のプログラムでリアルタイム PCR を行う



Hold (初期変性)

Cycle : 1

95°C 30 秒

2 Step PCR

Cycle : 40

95°C 5 秒

60°C 30~60 秒

Dissociation

【3】 実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞から total RNA を抽出し、それぞれ 600 ng を鋳型として PrimeScript™ RT reagent Kit による逆転写反応を行った。次に、1 反応あたり cDNA 20 ng (total RNA 相当量) を鋳型として TB Green™ Premix Ex Taq™ II によるリアルタイム PCR を行った。解析対象遺伝子は、[EpiScope® Promoter qPCR Array \(Human\)](#) に搭載されている 25 種で、該当遺伝子のリアルタイム RT-PCR 用プライマーは Perfect Real Time サポートシステムで入手した。

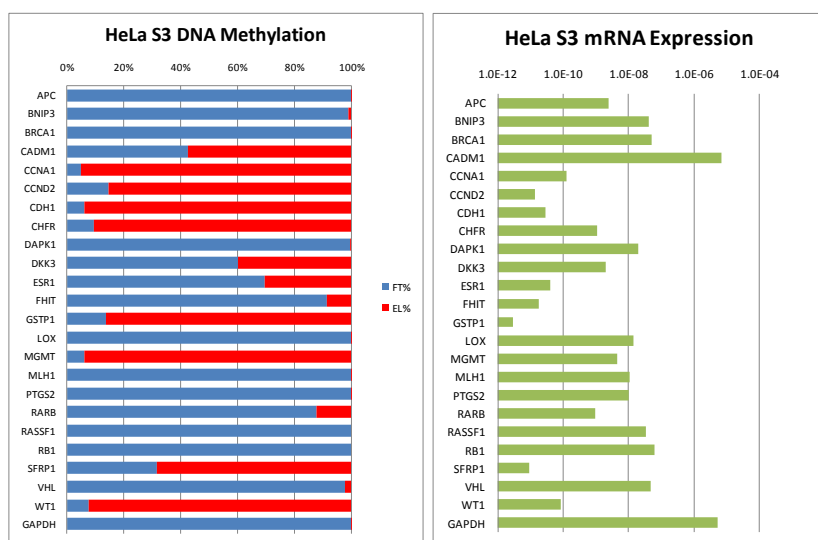


図 1. DNA メチル化と遺伝子発現の相関

左に EpiXplore™ により濃縮したメチル化 DNA をリアルタイム PCR で解析した結果を、右にリアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析の結果を示す。遺伝子発現量は、Ct 値を $\Delta \Delta Ct$ 法により定量値に換算した値で表した。DNA メチル化と遺伝子発現の間に相関が認められる。

【4】 製品リスト

[NucleoSpin™ RNA \(製品コード 740955.10/.50/.250\)](#)

[PrimeScript™ RT reagent Kit \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR037A/B\)](#)

[PrimeScript™ RT Master Mix \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR036A/B\)](#)

[PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR047A/B\)](#)

[TB Green™ Premix Ex Taq™ \(Tli RNaseH Plus\) \(製品コード RR420S/A/B\)](#)

[TB Green™ Premix Ex Taq™ II \(Tli RNaseH Plus\) \(製品コード RR820S/A/B\)](#)

[TB Green™ Premix DimerEraser™ \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR091A/B\)](#)

[Perfect Real Time サポートシステム](#)

[Thermal Cycler Dice® Real Time System III \(製品コード TP950/TP970/TP980/TP990\)](#)

[Thermal Cycler Dice® Real Time System II シリーズ \(製品コード TP900/TP960\)](#)

[EASY Dilution \(for Real Time\) \(製品コード 9160\)](#)

[EpiScope® Promoter qPCR Array \(Human\) \(製品コード 5301\)](#)