

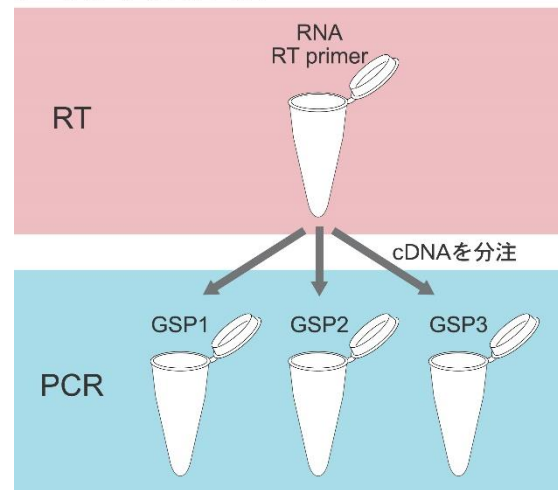
リアルタイム RT-PCR 実験法

1. 逆転写反応

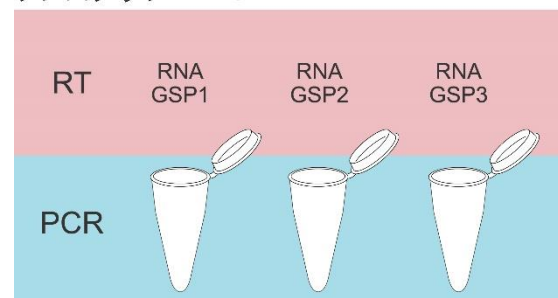
【ツーステップ RT-PCR とワンステップ RT-PCR】

RT-PCR による遺伝子発現解析では、まず、逆転写反応により RNA から cDNA を合成し、この cDNA を鋳型として PCR を行う。これらの反応は、ツーステップまたはワンステップで行う。ツーステップ RT-PCR では、ランダムプライマー、オリゴ dT プライマーまたは遺伝子特異的プライマーを用いて逆転写反応を行い、その反応液の一部 (cDNA) を鋳型としてリアルタイム PCR 反応液に添加する。実験の目的に応じて最適な逆転写用プライマーを選択して使用することができ、ランダムプライマーまたはオリゴ dT プライマーを使用して合成した cDNA からは PCR により複数種類の遺伝子を検出できる。また、合成した cDNA 溶液は安定な状態で長期保存することができ、後の解析にも使用できる。ワンステップ RT-PCR では、逆転写反応と PCR を同じチューブ内で連続して行うため、操作が簡便でサンプル間のコンタミネーションのリスクが低い。また、逆転写反応には、遺伝子特異的なプライマー (PCR の下流プライマー) を用いるため、特定遺伝子を高感度に検出できる。

ツーステップ RT-PCR



ワンステップ RT-PCR



GSP : Gene Specific Primer

【RT-PCR 法の使い分け】

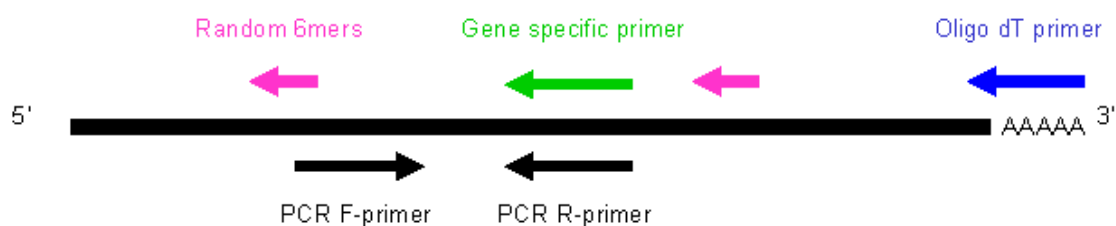
従来は、ワンステップ RT-PCR に比べツーステップ RT-PCR は反応性が良いとされていたが、近年ではキットの改良が進みワンステップ RT-PCR でも良好な反応が可能である。どちらの手法を用いるかは、実験目的に合わせて自由に選択すると良い。

例えば、解析対象の遺伝子数が多い場合には、汎用プライマーを用いるツーステップ RT-PCR が適している。一方で、サンプル数が多い場合には、ツーステップ RT-PCR では多数の逆転写反応を行った後でそれぞれを PCR 反応チューブに移す作業が煩雑であり、ワンステップ RT-PCR を用いた方が便利である。また、ワンステップ RT-PCR は、遺伝子特異的プライマーを用いるため total RNA 量が多くても効率良く反応でき、低発現の遺伝子の検出に有利なことがある。

- ◎ ツーステップ RT-PCR が適した実験
 - ・ 解析対象遺伝子数が多い場合（遺伝子発現解析など）
- ◎ ワンステップ RT-PCR が適した実験
 - ・ 解析サンプルが多い場合
 - ・ 特定遺伝子の高感度検出

【逆転写反应用プライマーの選択】

ツーステップ RT-PCR の逆転写反応には、ランダムプライマー、オリゴ dT プライマー、遺伝子特異的プライマーの 3 種類を使用でき、実験の内容に応じて使い分ける。



□ ランダムプライマー

ランダムプライマーを使用すると、mRNA 全長にわたって効率よく逆転写することができ、PCR 増幅位置によらず目的遺伝子を効率良く検出できる。

□ オリゴ dT プライマー

polyA tail からの逆転写反応を行いたい場合には、オリゴ dT プライマーを使用する。その際、PCR 増幅位置が polyA tail から離れすぎていると、その部分まで効率よく逆転写することができない場合がある。できるだけ、polyA tail から 1.5 kb 以内に設計された PCR 用プライマーと合わせて使用すると良い。また、polyA tail から PCR 増幅位置までの間に強固な二次構造がある場合や mRNA が分解を受けている可能性がある場合にも注意を要する。

□ 遺伝子特異的プライマー

特定の遺伝子のみを検出する場合には、遺伝子特異的プライマーを逆転写反応に使用できる。この場合、PCR 用の Reverse Primer を逆転写用プライマーとして使用する。通常、遺伝子発現解析では複数の遺伝子を検出するので、遺伝子特異的プライマーの使用は適さない。

リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析を行う際には、ランダムプライマーとオリゴ dT プライマーを混合して用いると良い。そうすることにより、mRNA 全長を効率よく逆転写でき、mRNA の二次構造や mRNA の分解といった影響も最小限に抑えることができる。

参考

オリゴ dT プライマーの用途 ……

オリゴ dT プライマーは、一般的に、cDNA ライブラリーの作製や cDNA のラベリングなど polyA tail を持った mRNA から特異的に cDNA を合成したい場合に使用する。

参考

内在性 RNA 分子の影響 ……

total RNA には、分解された RNA 断片や small RNA などが含まれており、これらも逆転写反応のプライマーとして機能し、逆転写反応に関与する。オリゴ dT プライマーや遺伝子特異的プライマーを用いる場合には、このような影響があることも考慮しておく。

【total RNA と mRNA】

通常、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析では、total RNA を鋳型として使用し、十分な検出感度で解析できることが多い。より検出感度を上げたい場合には、total RNA から mRNA を精製して用いることも考えられるが、精製に伴う RNA の分解やロス、さらには発現プロファイルの変化といった危険性もあるので注意を要する。また、非常に微量な total RNA を用いて解析を行う場合には、前もって RNA を増幅する技法も試みられている。この場合にも、処理に伴う発現プロファイルの変化がどの程度生じるのか、事前に確認しておくことが重要である。

◎ 通常、mRNA を精製する必要はなく、total RNA をそのまま用いれば良い。

【ゲノム DNA 混入とその対策】

total RNA サンプルにはゲノム DNA が混入していることがあり、ゲノム DNA も PCR の鋳型となりうるため、そのような試料を用いると解析結果が不正確になる。それを避けるために、① ゲノム DNA 由来の増幅が起らないようなプライマーを設計する、あるいは、② DNase I 処理によりゲノム DNA を除去する、といった対策を採る。

① ゲノム DNA 由来の増幅が起らないプライマー設計

ゲノム DNA は、エキソン、イントロン構造を持っているため、これを利用してゲノム DNA 由来の増幅が起らないようなプライマーを設計することができる。まず、目的遺伝子のゲノム構造を確認し、サイズの大きなイントロンを選び出す。そして、このイントロンを挟む 2 つのエキソン上に上流プライマー、下流プライマーをそれぞれ設計する。イントロンのサイズが十分に大きければ、ゲノム DNA 由来の増幅が起らず、イントロンのサイズが小さい場合にも、ゲノム由来の PCR 増幅産物は、mRNA 由来のものよりもサイズが大きくなるため、融解曲線分析で区別ができる。

しかし、この方法は、シングルエキソンの遺伝子や偽遺伝子を持つ遺伝子には適用できない。また、イントロンを持たない生物種やゲノム情報が解析されていない生物種でも同様である。これらの場合には、②の DNase I 処理が必要となる。

② DNase I 処理によるゲノム DNA の除去

total RNA を抽出した後、DNase I (RNase-free) により混入したゲノム DNA を分解する。
DNase I 処理後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により DNase I を除去する。

【混入ゲノム DNA の確認方法】

逆転写反応をせずにリアルタイム PCR を行うことにより、ゲノム DNA の混入量を確認することができる。この実験には、ゲノム DNA と mRNA の両方から PCR 増幅が可能なプライマーを使用すると便利である。DNase I 処理後にゲノム DNA が除去されたことの確認のため、このような反応を行ってみると良い。なお、ゲノム DNA 由来の増幅が起こらないように設計したプライマーでも、偽遺伝子由来の増幅が起こる場合があるので、一度、ゲノム DNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行い、反応性を確認しておく。

偽遺伝子 ……

生体内で機能している遺伝子と塩基配列は酷似しているが、転写されなかったり、機能をもつ産物をコードしていなかったりする一群の DNA 配列。特に、3'末端にポリアデニル酸をもちイントロンを欠如しているグループをプロセス型偽遺伝子といい、mRNA が逆転写されたのち、cDNA がゲノム上に挿入して生じたのではないかと推定されている。

(分子細胞生物学辞典より)

参考

2. リアルタイム PCR

A. インターカレーター法 (TB Green アッセイ等)

【プライマー設計】

プライマー設計の良否は、実験結果を大きく左右する。あるプライマーの反応性が悪かった場合、PCR 反応条件を最適化するという手段も考えられるが、多くの場合、PCR 反応性が劇的に改善されることはない。あらかじめ、反応性の良いプライマーを設計することが肝要である。
プライマー設計で重要なポイントは、以下の3つである。

- ① 標的の DNA 配列に安定してアニーリングできること
(T_m 値や GC 含量が適切な範囲である)
- ② プライマー利用効率が高いこと
(プライマー内部やプライマー間に相補的な配列がない)
- ③ 特異性が高いこと
(鋳型 DNA 上にミスプライミングする部位がない)

このような点に気をつけながら、プライマー設計専用のソフトウェアを用いて設計する。自分で設計する手間を省きたい場合には、プライマー設計・合成サービス (Perfect Real Time サポートシステム for インターカレーター (タカラバイオ)) を利用することもできる。

◎ プライマー設計は、実験成功のための最大のポイント！

市販のプライマーセットや設計サービスを利用するのも良い。

【プライマー設計パラメータ】

★印は、重要度を表します。

★の数が多いほど重要なパラメータですので、それらを優先して設計します。

増幅サイズ ★★

- ・ 80～150 bp が最適

リアルタイム PCR で 100%に近い増幅効率を得るためには、増幅サイズが 80～150 bp となるように設計することが望ましい。

プライマーのサイズ ★

- ・ 17～25 塩基

プライマーの長さを 17～25 塩基にすれば、通常、目的の遺伝子に特異的な配列になる。プライマーが長すぎると合成が困難で、収量が低下する。逆にプライマーが短すぎると、十分な特異性が確保できないことがある。

GC 含量 ★

- ・ 40～60%

プライマー全体の GC 含量は 40～60%とし、配列中で塩基の偏りがないように注意する。部分的に GC あるいは AT リッチなものも避ける。特に、プライマーの 3' 端配列には注意が必要である。AT リッチなものは、プライマーと鋳型 DNA が安定して結合できず、逆に、GC リッチなものは、鋳型 DNA に非特異的にアニールし、特異的増幅を阻害する。また、T/C が連続する配列 (polypyrimidine) や A/G が連続する配列 (polypurine) を含むプライマーも避けた方がよい。

3' 末端の配列 ★★

- ・ 3' 末端の塩基は G または C が望ましい
- ・ 3' 末端近傍の GC 含量が多すぎるプライマーは避ける
- ・ 3' 末端の塩基が T になるプライマーは避ける

プライマーの 3' 末端配列は、確実にプライミングするために重要である。3' 末端の塩基を G または C にするとより確実にプライミングできるが、3' 末端近傍の GC 含量が高すぎると、非特異的にプライミングする危険性が高くなるので、GC が連続するような配列は避ける。また、3' 末端が T の場合、ミスマッチでもプライミングしてしまうことがあるので、そのようなプライマーも避けた方がよい。

配列の偏り ★

- ・ 同一塩基が連続するプライマーは避ける
- ・ 配列のリピートがないこと

同一塩基が 3～4 個連続するようなプライマーは避ける。特に、G または C の連続がないようにする。プライマー配列中にリピートがあると、間違った位置にプライミングしやすくなり、サイズの異なる増幅産物が生じることがある。

配列の相補性

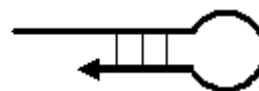


- ・ プライマー内部やプライマー間で 3 base 以上相補しないようにする
- ・ プライマー 3' 末端の相補性には、特に注意する

プライマー内部に相補する配列があると、そのプライマー自身で二次構造を形成しやすい。また、プライマー間で相補する配列があると、プライマー同士でハイブリッドを形成しやすい。いずれも、プライマー利用効率の低下につながるのを避けるようにする。プライマーの 3' 末端配列同士が相補するような配列では、プライマーダイマーが形成される可能性が高いので、特に注意を要する。



3'末端配列の相補



二次構造の形成

T_m 値



- ・ 上流プライマー、下流プライマーの T_m 値をそろえる
- ・ T_m 値の計算は、専用のソフトウェアで行う

上流プライマーと下流プライマーの T_m 値は、2℃以上の差がないことが望ましい。2つのプライマーの T_m 値が異なると、低い温度では、T_m 値が高いプライマーが非特異的にプライミングして特異的増幅を阻害し、逆に、高い温度では、T_m の低いプライマーはプライミングできない。このようなケースでは、最適なアニーリング温度の設定が困難である。

プライマーの T_m 値を計算するには、Nearest Neighbor 法を用いるのがもっとも正確で、プライマー設計用ソフトウェアではこの計算方法が用いられている。(Nearest Neighbor 法を用いても、パラメータが異なると T_m の計算値が異なるため、ソフトウェアによって T_m 値が異なることがある。) 20 塩基以下のプライマーでは、以下の式 (Wallace formula) で概算することもできるが、できるだけ専用のソフトウェアで計算された値を使用する。

$$T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

特異性



- ・ BLAST 検索でプライマーの特異性を確認する

鋳型 DNA 上で、目的遺伝子特異的な配列にプライマーを設計する。設計したプライマーについては、NCBI の BLAST 検索などを利用して、特異的な増幅ができることを確認する。

(ただし、BLAST ではプライマーのような短い配列をクエリとした場合、相同性があっても検出されない場合があるので、注意を要する。) また、ゲノム DNA 上の繰り返し配列は、あらかじめマスクしてプライマーを設計する。

ゲノム構造の考慮 (RT-PCR の場合) ★★

- ・ エキソンジャンクションを挟む位置にプライマーを設計する

RNA サンプルにゲノム DNA が混入していると、ゲノム DNA 由来の PCR 増幅の影響で正確な発現解析ができないことがある。このようなことを避けるために、RNA サンプルを前もって DNase I 処理する方法もあるが、あらかじめゲノム DNA 由来の増幅が起こらないようにプライマーを設計しておくこともできる。そのためには、目的遺伝子のゲノム構造が分かっている必要があるので、公共のデータベースを利用して調べる。

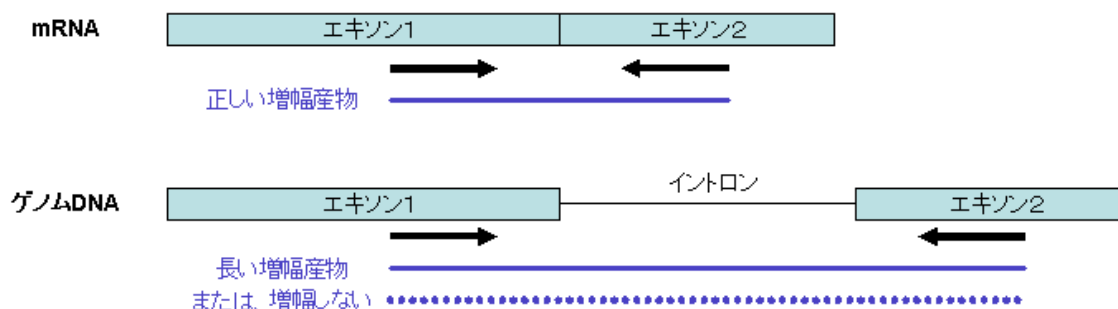
◇ UCSC Genome Browser (Human, Mouse, Rat etc.)

<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

◇ tair Seq Viewer (Arabidopsis)

<https://seqviewer.arabidopsis.org/>

ゲノム構造が分かったら、サイズの大きなイントロンを選んで、その前後のエキソンに上流プライマー、下流プライマーをそれぞれ設計する。イントロンのサイズが十分に大きければ、ゲノム DNA 由来の増幅を避けることができる。小さなサイズのイントロンでも、ゲノム由来の増幅産物と cDNA 由来の増幅産物とはサイズが異なるので、融解曲線分析により区別することができる。



【プライマー設計ソフトウェア】

プライマー設計においては、サイズ、GC 含量、3' 末端配列など、多くの考慮すべき重要なパラメータがある。プライマー配列を目で見て簡単に確認できるパラメータもあるが、T_m 値の計算や相補性の確認は、専用のソフトウェアを用いるとより効率的かつ確実に検証できる。長い設計対象配列のうち、どこが最適かを検索するのには、専用のソフトウェアが必須と言えるだろう。

◇ OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights 社)

デモプログラムのダウンロードはこちらから <https://oligo.net/>

◇ Primer3 (フリーウェア)

<https://primer3.sourceforge.net/>

【[Perfect Real Time サポートシステム for インターカレーター](#) (タカラバイオ)】

インターカレーター法によるリアルタイム RT-PCR 用のプライマーをオンラインで検索して注文できる便利なシステムである。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プライマーが登録されており、プライマー設計の手間を省くことができる。本システムのプライマーは、[TB Green Premix Ex Taq II \(Tli RNaseH Plus\)](#) (製品コード RR820A)、[TB Green Fast qPCR Mix](#) (製品コード RR430A) または [TB Green Premix Ex Taq \(Tli RNaseH Plus\)](#) (製品コード RR420A) と組み合わせて使用する場合に、一定の標準 PCR 条件で良好な反応が得られるように設計されており、多くの場合、PCR 条件の検討は必要ない。

◇ ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの遺伝子解析に

<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/intercalator/>

【リアルタイム PCR 試薬の選択】

市販のリアルタイム PCR 試薬のほとんどは、2×濃度のプレミックスタイプになっている。DNA ポリメラーゼや dNTP など PCR に必要なコンポーネントがすべて含まれているので、プライマー（およびプローブ）と鋳型 DNA を添加するだけで簡単に反応液を調製でき、通常、Mg 濃度の最適化なども必要ない。

使用時の注意点としては、メーカーの推奨 PCR 反応条件を遵守することである。試薬の取扱説明書に標準的な PCR 反応条件が示されているので、まずはそれに従うことをお勧めする。例えば、リアルタイム PCR 試薬の多くは Hot Start 用 DNA ポリメラーゼを採用しているが、これには2通りのタイプがあり、タイプにより PCR 反応条件が異なる。化学修飾タイプでは、ポリメラーゼの活性化に 10～15 分のプレヒートが必須であるが、Taq 抗体タイプでは、多くの場合、そのような操作は必要ない。また、高速リアルタイム PCR 対応の試薬は、短時間のサイクル条件に最適化されている。使用する試薬によって、PCR 反応条件は柔軟に変更すべきである。

なお、リアルタイム PCR 装置と試薬の相性はさほど問題にならないことが多く、使用する装置によらず気に入った試薬を用いれば良い。ただし、装置によっては、反応液に ROX や BSA を添加する必要があるので注意する。また、30～40 分で PCR 反応を行う高速タイプのリアルタイム PCR 装置では、高速対応の試薬が最高のパフォーマンスを発揮する。

◎ 使用する試薬の推奨 PCR 反応条件を遵守しよう。

【プライマーの反応性確認】

新しく設計・合成したプライマーについては、まず、反応性の確認を行う。PCR 増幅効率と検出感度を確認するために、6 段階濃度の鋳型を用いることが望ましい。また、必ず、No template control (NTC) の反応を同時に行い、プライマーダイマーの有無も調べておく。鋳型としては、目的の遺伝子が発現している total RNA から調製した cDNA を段階希釈して用いれば良い。該当遺伝子の発現量にもよるが、total RNA 1 pg、10 pg、100 pg、1 ng、10 ng、100 ng 相当量の cDNA/1 反応 程度の量を使用する。

① PCR 増幅効率

検量線の傾きから PCR 増幅効率を算出する ([解析法の P2 参照](#))。PCR 増幅効率は、80～120% の範囲内であることが望ましい。

② 検出感度

定量可能な範囲、つまり、PCR の何サイクル目まで定量可能か、ということを調べておく。インターカレーター法では、プライマーダイマーなどの非特異的増幅が生じ始める時点が定量の限界となり、それ以降のサイクルでは定量できない。だいたい 35 サイクル目ぐらいまで定量できれば反応性は良好である。30 サイクル以前に非特異的増幅が出るようなら、PCR 条件を至適化するか、プライマーを再設計したほうが良い。

③ No template control

②で説明した通り、30 サイクル以前にプライマーダイマーが生じるような場合には、定量可能な範囲が狭くなってしまうので、PCR 条件の至適化またはプライマーの再設計を行う。

④ ゲノム DNA 由来の増幅

ゲノム DNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行い、ゲノム DNA 由来の増幅が起こるかどうかを確認する。増幅が起こる場合には、融解曲線分析により cDNA 由来の増幅産物とゲノム由来の増幅産物が区別できるかどうかということも確認しておく。ゲノム由来の増幅が起こる場合には、total RNA を DNase I 処理しておくか、RTase (－) のコントロール反応を行う必要がある。

【PCR 条件最適化の手順】

増幅効率が悪いとき：

2 ステップ PCR の場合、アニーリング・伸長ステップの時間を延ばすと改善することがある。改善が見られない場合には、3 ステップ PCR に変更して、アニーリング温度を下げしてみる。または、プライマー濃度を高くしてみる。

非特異的増幅が多いとき：

アニーリングステップの時間を短くするか温度を高くする。あるいは、伸長時間が長すぎる場合にも非特異的増幅が起こりやすいので、伸長時間を短くしてみる。または、プライマー濃度を低くしてみる。

B. プローブアッセイ

【[Perfect Real Time サポートシステム for プローブ](#) (タカラバイオ)】

蛍光標識プローブ法によるリアルタイム RT-PCR 用のプライマー・プローブをオンラインで検索して注文できる便利なシステムである。ヒト、マウス、ラットの RefSeq 登録遺伝子に対するプライマー・プローブが登録されており、プライマー・プローブ設計の手間を省くことができる。本システムのプライマー・プローブは、[Probe qPCR Mix \(製品コード RR391A/B\)](#) と組み合わせて使用する場合に、一定の標準 PCR 条件で良好な反応が得られるように設計されており、多くの場合、PCR 条件の検討は必要ない。

◇ ヒト、マウス、ラットの遺伝子解析に

<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/probe/>

【[TaKaRa qPCR Probe](#) (タカラバイオ)】

遺伝子発現解析に用いるためのプライマーおよび蛍光標識プローブを設計・合成するサービス。対象遺伝子の Accession No.や配列情報、遺伝子名、生物種、蛍光標識など

の情報を提供いただき、プライマー・プローブを設計する。設計したプライマー・プローブの配列情報は事前に開示するので、確認した上で注文が可能である。レポーター色素（5'修飾）とクエンチャー色素（3'修飾）の最適な組み合わせを用意しており、リアルタイム PCR 装置の機種や使用目的に応じて反応系を選択できる。[Probe qPCR Mix（製品コード RR391A/B）](#)と組み合わせて用いることで高いパフォーマンスを実現する。

【[CycleavePCR Assay Designer \(SNPs\)](#)（タカラバイオ）】

CycleavePCR 法（サイクリングプローブを用いるリアルタイム PCR 法。非常に特異性の高い検出が可能）に適した SNP（1 塩基置換）検出用プライマーおよびサイクリングプローブを設計・オンライン注文するためのシステム。目的遺伝子の塩基配列、検出対象塩基を指定するだけで、プライマー、プローブ候補を最大 3 種類設計し、配列・Tm 値・増幅サイズ等の情報を開示する。配列確認後は、WEB 上から注文が可能である。設計されたプライマー・プローブは、[CycleavePCR Starter Kit（製品コード CY505S）](#)または、[CycleavePCR Reaction Mix（製品コード CY505A/B）](#)と組み合わせて使用する。

3. その他の酵素処理

【RNase H 処理】

レトロウイルス由来の逆転写酵素は、もともと RNA/DNA ハイブリッドの RNA 鎖を切断する RNase H 活性を持っているが、実験には RNase H 活性を欠失させた変異体が広く用いられている。このような逆転写酵素を用いると cDNA の収量が多くなるため RT-PCR による遺伝子の検出に好都合だが、ある種の遺伝子においては、RT-PCR で効率よく検出するために逆転写反応後に RNase H 処理が必要であると報告されている。しかし、実際には RNase H 処理が必要になるのは稀なケースであり、また、RNase H 処理の効果は PCR の初期変性により代替できることも示唆されている（BioTechniques 32 : 1224-1225. (2002)）。

参考

初期変性の効果

タカラバイオのリアルタイム RT-PCR 用の逆転写反応キット(PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time))では、Random primers と Oligo dT primer を用いて短時間で効率よく逆転写反応を行うので、cDNA の平均合成鎖長はあまり長くない。そのため、上述のように cDNA/RNA ハイブリッドが PCR 効率を低下させる可能性は低いと考えられる。配列によっては多少影響が生じる場合があるが、30 秒～1 分の初期変性を行うことによりその影響を緩和することができる。また、同じく PCR の鋳型としての利用効率が悪いと考えられる環状プラスミドや長鎖ゲノム DNA を用いる場合にも長めの初期変性が有効である。

【UNG によるコンタミネーションの防止】

UNG は、PCR 増幅産物のコンタミネーション防止のために用いられるシステムである。しかし、リアルタイム PCR では、PCR 増幅サイズが 100 bp 前後と短いため、あまり効果的ではない。そもそも、リアルタイム PCR では PCR 増幅産物をチューブから取り出すことは少ないので、コンタミネーションのリスクも低い。必ずしも UNG を使う必要はない。

参考

UNG (Uracil-N-Glycosylase)

UNG は、一本鎖 DNA および二本鎖 DNA に含まれる U 塩基の部分切断する酵素である。PCR を行う際に dTTP の代わりに dUTP を添加しておくと、PCR 増幅産物には U 塩基が取り込まれる。これらの PCR 増幅産物が次に調製した PCR 反応液にコンタミネーションしたとしても、PCR 前に UNG で処理することにより、それらを除去することができる。

4. 実験誤差について

PCR 自体は、再現性が高く精度の良い技法であるが、リアルタイム RT-PCR による発現解析は、RNA 抽出、逆転写反応など多くの実験ステップからなっており、結果を正しく解釈するには、それらの実験誤差を把握しておくことが必要である。RNA 抽出や逆転写反応は、比較的バラツキが生じやすいステップであり、PCR においてもピペッティング誤差による分注量の差などが結果のバラツキに直結する。また、実験者間の誤差も意外と大きく、操作のくせがバラツキにつながる。さらには、材料となる生物学的試料にももともと誤差があることは言うまでもない。これらのバラツキを把握するためには、必要なステップで必要な N 数を取るよう実験を計画する。なお、直接比較するサンプルについての実験は、できるだけまとめて行い、いくつかに分割しないようにする。異なる日に（または、異なる人が）行った実験の結果を比較するには、それらをつなぎ合わせるために何らかのコントロールが必要である。