

リアルタイム PCR 実践編

－ インターカレーター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、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、上記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、弊社各支店までお問合せください。
- (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. インターカレーター法 (TB Green アッセイ) によるリアルタイム RT-PCR

- (1) 用意するもの (主なもの)
 - ・ [PrimeScript RT reagent Kit \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR037A\)](#)
 - ・ [TB Green Premix Ex Taq II \(Tli RNaseH Plus\) \(製品コード RR820A\)](#)
 - ・ 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【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 (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。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)

初期変性

初期変性は通常 95°C、30 秒で充分です。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鑄型でも、ほとんどの場合、この条件で良好に反応できます。鑄型の状態によっては、95°C、1~2 分程度に延長することが可能ですが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがありますので、2 分以上の条件は推奨しません。

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、下記の手順でプライマー濃度や PCR 条件の検討を行ってください。実験条件を選ぶ際には、反応特異性と増幅効率の両方を考慮して総合的に判断します。両方のバランスが取れた実験系では広い濃度範囲で正確な定量が可能です。

【増幅効率を上げるには】

T_m 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、上記のシャトル PCR 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基本的に同じです。さらにプライマー濃度を上げる（最終濃度~1 μM 程度）ことで改善される場合もあります。

【反応特異性を上げるには】

プライマーの 3' 末端配列が GC リッチなものや、 T_m 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。

鋳型 RNA にゲノム DNA の混入が疑われる場合は、ゲノム DNA 除去反応をプラスしたリアルタイム RT-PCR 用逆転写試薬 [PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser \(Perfect Real Time\)](#) (製品コード RR047A) の利用が効果的です。20 分以内で簡単にゲノム DNA フリーの cDNA 合成が可能となっています。