

リアルタイム PCR の応用

1. 遺伝子発現解析

ノザン解析など従来技術に比べ、リアルタイム PCR では正確、迅速かつ簡便に遺伝子の発現量を定量することができるため、遺伝子発現解析の手法としてはリアルタイム PCR 法が主流となりつつあります。従来技術に比べ、発現が微量な遺伝子まで高感度に検出できるため、少量のサンプルからも実験が可能です。

2. DNA マイクロアレイ結果の検証

DNA マイクロアレイ解析で発現量の変動が示唆された遺伝子について、その発現差をリアルタイム PCR 法により検証するのは、一般的な実験の流れとなりました。Perfect Real Time サポートシステムでは、ヒト、マウス、ラットの RefSeq について設計済みのプライマーをご用意しておりますので、すぐに DNA マイクロアレイの検証実験を行うことができます。なお、DNA マイクロアレイには各遺伝子の 3' 末端付近の領域を搭載しているものが多く、そのような DNA マイクロアレイの検証には、Perfect Real Time サポートシステムの 3' 末端から 1.5kb 以内に設計されたプライマーのご使用をお勧めします。

3. siRNA 効果の確認

RNAi 効果の確認は、ノザンブロットによる mRNA 発現量の解析・ウェスタンブロットによるタンパク量の解析・表現型の観察などの方法でも行われますが、リアルタイム RT-PCR による mRNA 発現量の定量はもっとも簡便な方法で、siRNA のスクリーニングなど簡単に RNAi 効果をチェックしたい場合に適しています。詳しくは、RNAi BOOK 掲載中の [「リアルタイム PCR による RNAi 効果の確認」](#) をご参照ください。

4. 病原菌遺伝子の検出や定量

リアルタイム PCR では、PCR 後に電気泳動による増幅産物の確認を行う必要がありませんので、増幅産物が飛散してコンタミネーションの原因となる心配がありません。病原菌遺伝子などの高感度で迅速な検出にも適した方法です。各種遺伝子の検出を目的とする場合には、①その遺伝子に対する特異性が求められること、②インターナルコンロートにより偽陰性をチェックする必要があることからプローブ法を用います。タカラバイオでは、非常に特異性の高い検出法である [サイクリングプローブ法を用いた各種検出キット](#) を多数ご用意しております。

5. SNPs のタイピング

リアルタイム PCR 法により SNPs のタイピングを行う際には、Wild タイプと Mutant タイプのそれぞれに特異的にハイブリダイズするプローブを用意します。一塩基の差を区別するには特異性の高いプローブが必要で、サイクリングプローブはこの用途に非常に適しています（下図参照）。

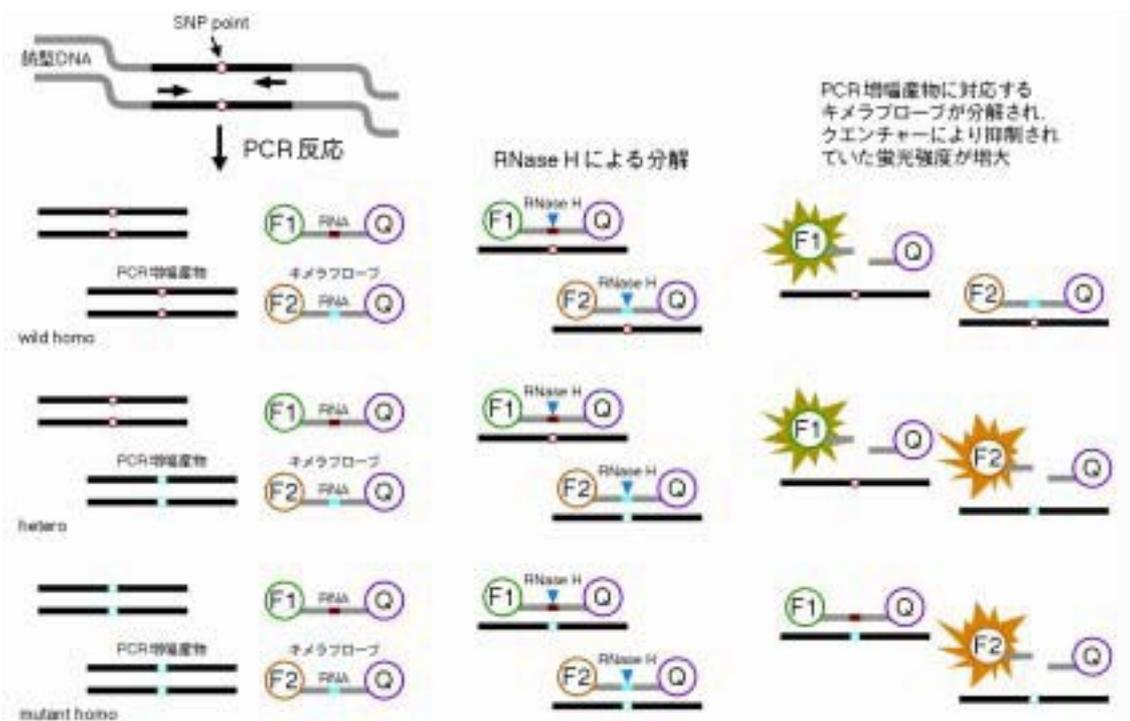


図 サイクリングプローブ法によるSNPタイピング

一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) のタイピングを行う場合、多型部位をカバーするように RNA 部分を設定した、蛍光標識の異なる野生型、変異型のサイクリングプローブをデザインすることがポイントとなる。これらのプローブと RNase H 存在下で、調べたい多型部位を含む領域の PCR 増幅を行いながら、リアルタイムに蛍光強度の変化をモニタリングすることで、迅速かつ正確なタイピングを行うことが可能である。