

Q & A

逆転写反応と RT-PCR 法

Q．ワンステップ RT-PCR とツーステップ RT-PCR の使い分け

A．ほとんどの用途にはツーステップ RT-PCR が適しています。ツーステップ RT-PCR では、Oligo dT プライマーやランダムプライマーも使用できますので、逆転写反応による cDNA 調製をまとめて行って、さまざまな遺伝子の検出に利用することができます。また、そのようにして調製した cDNA は、凍結して保存することも可能です。ワンステップ RT-PCR は、逆転写反応～PCR までをワンチューブかつワンステップで行うため操作が簡単な反面、反応性はやや劣る場合があります。コンタミ防止が最優先される実験や遺伝子検査などに用いられることが多いようです。

Q．逆転写用プライマーの使い分け

A．ランダムプライマーを用いると RNA の全長に渡り効率よく逆転写できますので、ランダムプライマーは、ほとんどの用途に適しています。Oligo dT プライマーは、mRNA の poly(A)からの選択的な逆転写に利用され、cDNA ライブラリーの作製などによく用いられます。リアルタイム RT-PCR で使用する場合には PCR プライマー設計位置が mRNA の 3'末端から離れすぎないように注意が必要です。

Q．total RNA に混入したゲノム DNA の対策

A．(対策1) ゲノム由来の増幅が起こらないようにプライマーを設計します。まず、目的遺伝子のゲノム構造を調べ、サイズの大きなイントロンを選びます。そして、その前後のエキソンに Forward Primer と Reverse Primer をそれぞれ設計します。イントロン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。イントロンサイズが小さい場合にはゲノム由来の増幅も起こりますが、増幅サイズの違いによる融解温度の差からゲノム由来の増幅を見分けることができます。

(対策2) シングルエキソンの遺伝子やゲノム構造が不明な場合には、あらかじめ調製した total RNA を DNase I 処理して、ゲノム DNA を除去しておきます。

Q．鋳型 RNA 量の補正方法

A．リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析において鋳型 RNA 量を補正するには、通常、ハウスキーピング遺伝子が用いられます。ハウスキーピング遺伝子は、検体間で発現量が一定であることが前提ですので、そのような遺伝子を注意深く選ばなくてはなりません。また、複数のハウスキーピング遺伝子を用いることで、より正確な補正が可能である

とされています。その他の方法として、Ribosomal RNA の発現量や RNA 濃度で補正する方法もありますが、これらは正確に mRNA 量を反映しないこともありますので、注意が必要です。

Q．適切なハウスキーピング遺伝子の選び方

A．正確な解析結果を得るには、その実験系で発現量が変動しないハウスキーピング遺伝子を選んで用いることが重要です。従来、ハウスキーピング遺伝子としては、GAPDH や β アクチンがよく用いられてきましたが、近年、これらの遺伝子も実験条件によっては変動するケースがあることが報告されています。1 種類のハウスキーピング遺伝子では正確な補正を行うには不十分であり、現在、もっとも信頼性が高いとされている補正方法は、複数のハウスキーピング遺伝子を用いる方法です。この方法では、いくつかのハウスキーピング遺伝子の発現量を測定し、その中で変動が小さいと思われるものを選択して使用します。最適な補正用遺伝子を選択するソフトウェアも開発されており、ダウンロードして利用できます (geNorm, BestKeeper など)。マイクロアレイによる発現プロファイルのデータがある場合には、その結果から類推することもできます。

(参考文献)

Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Genome Biol. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.

リアルタイム PCR 実験

Q．プライマー設計方法は、通常の PCR とは異なりますか？

A．リアルタイム PCR では、できるだけ 100%に近い効率で増幅するよう増幅サイズを短め (100 bp 前後) にします。その他の注意点は、通常の PCR とほぼ同様ですが、プライマーダイマーなど非特異的増幅も定量に影響を及ぼすことがありますので、特に特異性に注意して設計します。個々のパラメータ設定などの詳細は、[「リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析 II リアルタイム RT-PCR 実験法」](#)の 5～8 ページや[「プライマー設計ガイドライン」](#)をご参照ください。

Q．反応性の確認方法とチェックポイント

A．新しく設計・合成したプライマーを使用する際には、まず検量線を作成して反応性を確認します。検量線の傾きは PCR 増幅効率を表し、検量線の直線性が高い範囲が定量可能な範囲となります。また、RT-PCR を行う場合には、ゲノム DNA を鋳型とした反応を行い、ゲノム由来の増幅の有無を確認しておきます。

Q . 検量線作成用の標準サンプルは、何が良いか？

A . できるだけ実サンプルに近い形状のものが標準サンプルとして適しています。遺伝子発現解析なら目的遺伝子が発現している total RNA から逆転写反応により調製した cDNA を、ゲノム DNA の解析ならゲノム DNA を使用します。増幅領域の塩基配列が同じでも鋳型全体の形状が大きく異なると、PCR 増幅効率も異なる場合があります (ゲノム DNA とプラスミド等)。

Q .リアルタイム RT-PCR を行うときの標準サンプルは RNA と cDNA のどちらが良いか？

A . リアルタイム RT-PCR で検量線を作成する場合、RNA を段階希釈して逆転写反応およびリアルタイム PCR を行い作成する方法と 逆転写反応によって得られた cDNA を段階希釈してリアルタイム PCR を行い作成する方法の 2 通りが考えられます。これらは評価している内容が異なりますので、実験系により適切な方法を選択します。

絶対定量の場合

RNA の絶対定量では、逆転写効率を考慮する必要があるため、RNA を段階希釈して検量線の作成に用います。cDNA の希釈物は使用できません。

相対定量の場合

相対定量では、レファレンス遺伝子の測定により逆転写効率の誤差を補正できるので、cDNA を段階希釈して用います。RNA 希釈物による検量線には、PCR 増幅効率の他に RNA 量依存的な逆転写効率の差も反映され、実際とは異なった PCR 増幅効率を算出してしまう危険性があるためです。

Q . PCR 増幅産物の確認方法

A . 使用実績のあるプライマーでは、以前の融解曲線分析結果 (T_m 値) が参考になります。以前と同じ T_m 値であれば以前と同じ PCR 増幅産物が得られていると考えてほぼ間違いないでしょう。ただし、同一の PCR 増幅産物であれば同一の T_m 値を示しますが、逆に、T_m 値が同じだからといって同一の PCR 増幅産物であるとは限りません。初めて使用するプライマーでは、一度、リアルタイム PCR を行った増幅産物を電気泳動して目的の増幅サイズであることを確認してください。

Q . N 数はいくつ取れば良いか？ (実験誤差について)

A . 必要な N 数は、実験系により異なります。基本的には、実験全体を通して実験誤差が大きいと予想されるステップで多めに N 数を取るようにします。RT-PCR による遺伝子発現解析においては、もとの生物試料を複数用意したり RNA 抽出を複数回行ったりすることが誤差の把握に役立つでしょう。リアルタイム PCR に限って言えば、鋳型量が少ないとき、つまり PCR の後半で検出されるような場合に誤差が大きくなりますので、そのような反応について多めに N 数を取るようにします。

Q．調製済みの PCR 反応液は、保存できるか？

A．マスターミックスの状態でもチューブやプレートに分注済みの状態でも保存が可能です。24 時間以内なら 4℃ で、それ以上の期間なら -20℃ で凍結して保存します。蛍光の退色を防ぐため遮光して保存してください。

Q．リアルタイム PCR の検出感度は？

A．リアルタイム PCR の検出感度は、使用する試薬やプライマーなどの実験条件によって異なります。適切な系では、少なくとも 10 コピー前後の鋳型を検出できることが確認されています。

Q．リアルタイム PCR の定量精度は？

A．リアルタイム PCR の定量精度は、使用する試薬や装置などの実験条件によって異なります。適切な系では、2 倍の鋳型濃度差を確実に区別できることが確認されています。

解析法

Q．Ct 値の算出法

A．Ct 値の算出には、次の 2 通りの方法があります。Crossing Point 法は、増幅曲線と閾値（Threshold）の交点から Ct 値を求める方法です。2nd Derivative Maximum 法は、増幅曲線の二次導関数（2 回微分した曲線）が最大となる位置を Ct 値とする方法です。後者の方法では、閾値の設定により Ct 値が変動することがなく、装置の検出誤差の影響も受けませんので、精度の高い解析が可能です。装置によっては Crossing Point 法、2nd Derivative Maximum 法を選択ができないものもありますので、ご注意ください。

Q．絶対定量と相対定量の違い

A．絶対定量では、コピー数が既知の標準サンプルを用いて絶対数（コピー数）を定量します。それに対し、相対定量では、サンプル間で量を相対的に比較します。例えば、コントロールサンプルに対して未知サンプルでは 2 倍に増えたあるいは 1/3 に減ったといった解析を行います。相対定量では、定量目的遺伝子の他に補正のためのレファレンス遺伝子（ハウスキーピング遺伝子等）を同時に測定します。

Q．相対定量解析法（検量線法と $\Delta\Delta Ct$ 法）

A．相対定量解析には、標準サンプルの段階希釈液を用いて作成した検量線に基づいて解析を行う検量線法の他に、Ct 値の差を発現レベルの差に換算する $\Delta\Delta Ct$ 法があります。例えば、2 つのサンプルを測定しその Ct 値の差が 2 であった場合、PCR では 1 サイクルで

2 倍に増えますので、初期鋳型量は約 4 倍異なっていたと考えます。Δ Δ Ct 法の基本的な考え方は、これと同じです。検量線が不要なためハイスループットな解析に適していますが、PCR 増幅効率が 100%に近くないと正確な結果が得られません。Δ Δ Ct 法で解析する場合には、事前に、PCR 増幅効率を確認しておく必要があります。

Q．絶対数の正確な定量はできるか？

A．絶対数の正確な定量には、正確な絶対数（コピー数）が分かっている標準サンプルが必要です。このような標準サンプルがあれば可能ですが、実際にはその入手が難しいことが多いようです。

Q．異なる遺伝子が同一サンプル内でどのような量比で発現しているかを定量できるか？

A．基本的には、できません。

1、遺伝子間の比較が難しい理由

異なる遺伝子の発現量を正確に比較することは困難です。大ざっぱでよければ Ct 値からだいたいの予想はできます。例えば、GAPDH の Ct 値が 18 で TFR の Ct 値が 28 だった場合、「GAPDH の発現量は TFR より多そうだ」と推測します。しかし、この場合、各遺伝子の PCR 増幅効率を無視しています。もし、TFR 検出に用いたプライマーの増幅効率が極端に悪かったとしたら、上記とは異なる解釈になるでしょう。

2、遺伝子間の比較を行う方法（絶対定量法）

異なる遺伝子間の比較を正確に行うには、絶対定量をする必要があります。絶対定量では、各遺伝子のコピー数を求めるので、定量結果を直接比較できます。しかし、正確な絶対定量には、コピー数が正確に分かっている標準サンプルが必要です。もし、遺伝子ごとに標準サンプルの量が異なっていたら正しい結果が得られません。コピー数は、通常、OD 測定値に基づいて算出しますが、正確に数をそろえることは難しいようです。

3、より現実的な方法

この問題を解決するアイデアのひとつを紹介します。

定量目的配列がすべて 1 コピーずつ含まれるプラスミドを作成し、これを標準サンプルとして用います。すると、プラスミド中の各配列は必ず等量になりますので、OD 値の測定誤差があったとしても、正確な量の比較が可能です。