

リアルタイムPCR用のcDNAを合成するための重要なファクター

遺伝子発現解析において逆転写反応とリアルタイムPCR反応を別々に行なう2ステップリアルタイムRT-PCRは汎用されている方法です。この方法で重要な点はRNAからcDNAを合成の際に使用するプライマーの選択です。さらにゲノムDNAを増幅せずcDNAのみを特異的に増幅するPCRプライマーのデザインが不可能な場合があるため、RNAサンプル中に混入したゲノムDNAを除去することも非常に重要です。これらの点はQuantiTect® Reverse Transcription Kitの至適化済み試薬により解決できます。本キットはゲノムDNAの除去とcDNA合成をわずか20分で行なうことができます。

逆転写反应用プライマーの正しい選択

cDNA合成に最適なプライマーは、その後続くリアルタイムRT-PCRアプリケーションにより異なります(表1)。各転写物の全領域を逆転写するために、QuantiTect Reverse Transcription Kitには、oligo-dTとランダムプライマーのブレンド比が至適化されたRT primer mixが入っています。このRT primer mixをQuantiscript™ Reverse TranscriptaseおよびQuantiscript RT Bufferと組み合わせることにより、高感度な2ステップリアルタイムRT-PCR解析を行なうことができます。逆転写反応にoligo-dTあるいはランダムプライマーのみを使用した場合よりも高い感度が得られます(図1)。

表1. 様々なRT-PCRアプリケーションに推奨するRTプライマー

アプリケーション	推奨するプライマー
完全長の転写物あるいは転写物の3'末端から開始する長いアンプリコンのRT-PCR	Oligo-dTプライマー
転写物の全領域を網羅した短い逆転写を行ない、短いアンプリコンサイズで検出するRT-PCR	ランダムプライマーあるいはoligo-dTプライマーとランダムプライマーのミックス。転写物の全領域を網羅するcDNA配列を確実に得るためには、QuantiTect Reverse Transcription Kitに添付のRT primer mixを推奨。

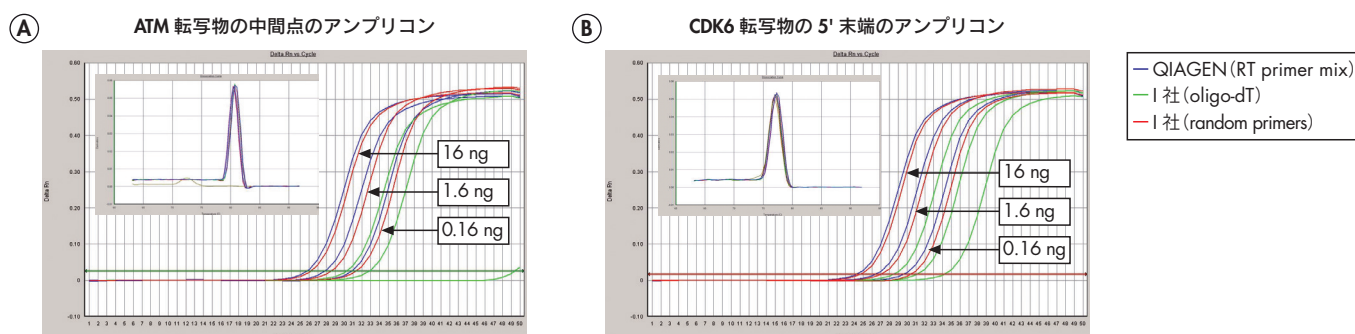


図1. 至適化済みのRT primer mixを用いた高感度な2ステップリアルタイムRT-PCR

HeLa細胞のRNAの10倍連続希釈液(1,000 ng、100 ng、10 ng)からcDNAを合成した。反応はQuantiTect Reverse Transcription Kit(添付のRT primer mixを使用)あるいはI社のキット(oligo-dTあるいはランダムプライマー)を用いて行なった。Quantifast™ SYBR® Green PCR KitおよびATM(ataxia telangiectasia mutated)用(A)あるいはCDK6(cyclin-dependent kinase 6)用(B) QuantiTect Primer Assayを用いてApplied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System上でcDNA(16 ng、1.6 ng、0.16 ng)を解析した。融解曲線はシングルピークを示し、増幅が特異的に行なわれたことを証明した(挿入図)。

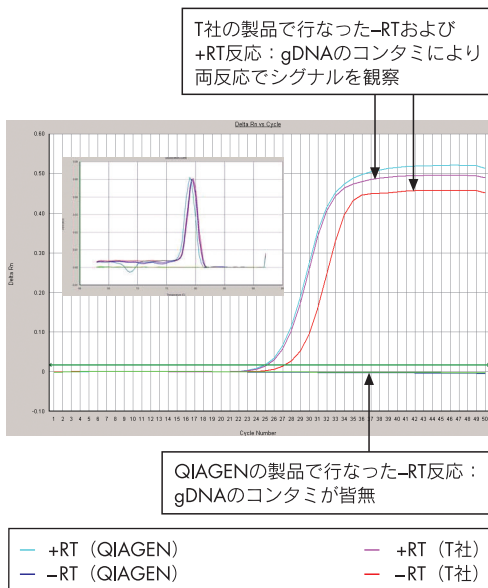


図 2. gDNA Wipeout Buffer を用いてゲノム DNA を効率的に除去した正確なリアルタイム RT-PCR

RNeasy[®] Mini Kit を用いて HeLa 細胞からトータル RNA を精製した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (添付の RT primer mix を使用) あるいは T 社のキット (oligo-dT とランダムプライマーのミックス) を用いて 1 µg の RNA から cDNA を合成した。反応は duplicate で逆転写酵素添加 (+RT)、あるいは未添加 (-RT) で行なった。QuantiFast SYBR Green PCR Kit および E2F3 (E2F transcription factor 3) の cDNA およびゲノム DNA を増幅するプライマーを用いて、16 ng の cDNA に相当するサンプルを Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System で解析した。融解曲線解析も行なった (挿入図)：全反応でシングルピークが得られたことは目的のアンプリコンが特異的に増幅されたことを証明している。

混入したゲノム DNA の効率的な除去

PCR プライマーがゲノム DNA も増幅する場合、RNA サンプルに混入したゲノムは微量であっても、正確なリアルタイム RT-PCR 定量を妨げます。この問題を解決するために、QuantiTect Reverse Transcription Kit はゲノム DNA の除去が組み込まれた cDNA 合成を行いません (表 2)。RNA サンプルを gDNA Wipeout Buffer で迅速に処理してゲノム DNA を取り除いた後、至適化済みの RT primer mix、Quantiscript Reverse Transcriptase、Quantiscript RT Buffer を用いて効率的な逆転写反応を行いません。

表 2. QuantiTect Reverse Transcription Kit の内容

内容	利点
gDNA Wipeout Buffer	効率的に DNA を除去する buffer
Quantiscript Reverse Transcriptase	幅広い RNA 量 (10 pg ~ 1 µg RNA) で使用可能 高感度な逆転写
Quantiscript RT Buffer	増幅困難なテンプレートでも効果的に逆転写
RT Primer Mix	5' 領域を含む転写物の全ての領域から cDNA を合成

gDNA Wipeout Buffer の効果を調べるために、QuantiTect Reverse Transcription Kit とゲノム DNA 除去を行わない T 社のキットとを比較しました (図 2)。実験は、それぞれのキットと QuantiFast SYBR Green PCR Kit を組み合わせて、HeLa 細胞での E2F3 発現を 2 ステップリアルタイム RT-PCR で検出しました。使用したプライマーは E2F3 の cDNA およびゲノム DNA 配列の両方を増幅するようにデザインされています。

T 社のキットで逆転写反応を行なった場合、-RT コントロール (逆転写酵素の入っていないコントロール反応、図 2 の赤) で S 字型の増幅プロットが観察され、ゲノム DNA の増幅が示されました。-RT コントロールと +RT 反応 (逆転写酵素の入った反応、図 2 の紫) の増幅プロット間の 2 サイクルのわずかな違いは、+RT 反応のシグナルの 25% が混入したゲノム DNA の増幅によるものであることを示唆します。

QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて逆転写反応を行なった場合、+RT 反応では S 字型の増幅プロットが得られました (図 2 の薄青)。-RT コントロールが平坦な増幅プロットであることから (図 2 の青)、ゲノム DNA の増幅がないことを示しています。これらの結果から、gDNA Wipeout Buffer は混入したゲノム DNA を効果的に除去し、+RT 反応で cDNA 配列のみを検出できたといえます。

高い安定性をもつ gDNA Wipeout Buffer

ゲノム DNA を効率的に除去することは非常に重要であるため、ゲノム DNA 除去のために使いやすく安定性の高い試薬が求められます。gDNA Wipeout Buffer は保存中に失活のリスクがなく、また分注して保存する必要がありません。長期保存や凍結融解の繰り返しによりバッファの性能が損なわれないことを証明するために、異なる条件下で保存した gDNA Wipeout Buffer を用いて 2 ステップリアルタイム RT-PCR を行ないました。gDNA Wipeout Buffer の様々な保存条件（開封直後、18 ヶ月間以上保存、45 回凍結融解）に関わらず、ゲノム DNA は効率よく除去されており、また -RT コントロール間の C_T 値が同程度であることから gDNA Wipeout Buffer の安定したゲノム DNA 除去能力も示されました（図 3、4）。

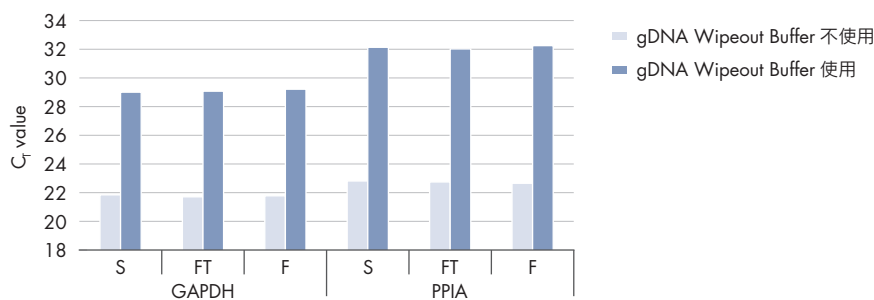


図 3. 長期保存や凍結融解を繰り返した後の gDNA Wipeout Buffer による安定したゲノム DNA の除去

RNeasy Mini Kit を用いて HeLa 細胞からトータル RNA を精製後、gDNA Wipeout Buffer のゲノム DNA 除去能力を評価するために過剰量のゲノム DNA (100 ng) を添加し、逆転写酵素を添加せずに QuantiTect Reverse Transcription Kit による反応を行なった。18 ヶ月以上保存した gDNA Wipeout Buffer (S: Strage)、凍結融解を 45 回繰り返した gDNA Wipeout Buffer (FT: Freeze-thaw) あるいは開封直後の gDNA Wipeout Buffer (F: Fresh) を用いてゲノム DNA 除去処理をした。GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) あるいは PPIA (peptidylprolyl isomerase A) の cDNA およびゲノム DNA を増幅するプライマーと QuantiFast SYBR Green PCR Kit を用いて、Applied Biosystems 7900 Real-Time PCR System で検出した。gDNA Wipeout Buffer 使用したとき、不使用のときに比べて C_T 値が大幅に大きくなっている。また、S、FT、F において同程度の C_T 値が示された。

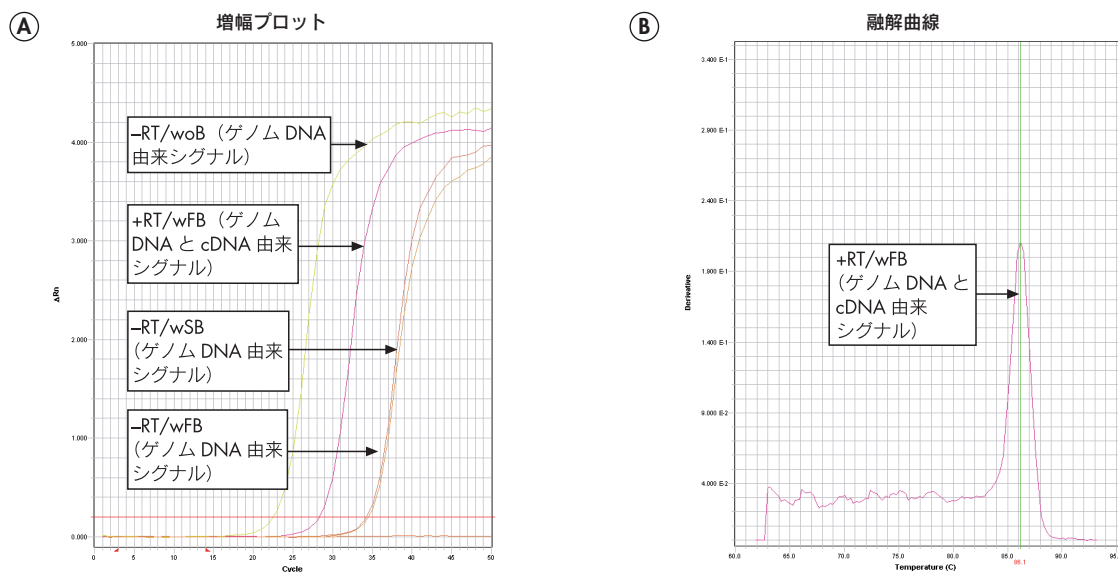


図 4. 18 ヶ月間保存後の gDNA Wipeout Buffer の安定性

-RT/woB : gDNA Wipeout Buffer が未添加の -RT コントロール反応 ; **+RT/wFB** : 開封直後の gDNA Wipeout Buffer を添加した +RT 反応 ; **-RT/wSB** : 18 ヶ月保存した gDNA Wipeout Buffer を添加した -RT コントロール反応 ; **-RT/wFB** : 開封直後の gDNA Wipeout Buffer を添加した -RT コントロール反応

RNeasy Mini Kit を用いて HeLa 細胞からトータル RNA を精製後、gDNA Wipeout Buffer のゲノム DNA 除去能力を評価するために過剰量のゲノム DNA (100 ng) を添加した。QuantiTect Reverse Transcription Kit の反応を行ない、QuantiFast SYBR Green PCR Kit および PPIA (peptidylprolyl isomerase A) の cDNA およびゲノム DNA を検出するプライマーを用いて、反応液を Applied Biosystems 7900 Real-TimePCR System で増幅させた。添加ゲノム DNA のみを検出する -RT コントロールにおいて、-RT/woB と比べ -RT/wSB と -RT/wFB では立ち上がりが大幅に遅くなっている。また、長期保存と開封直後の Buffer 間で立ち上がりには差は見られなかった。

結論

- QuantiTect Reverse Transcription Kit に同梱の RT primer mix は oligo-dT とランダムプライマーのユニークなブレンドで、転写物でのアンプリコンの位置には関係なく、高感度な 2 ステップリアルタイムを実現する。
- QuantiTect Reverse Transcription Kit に含まれる gDNA Wipeout Buffer は RNA 中に混入しているゲノム DNA を効率的に除去する。
- gDNA Wipeout Buffer は長期保存後や凍結融解を複数回繰り返した後も安定であり、分注して保存する必要がない。

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.
QuantiTect Reverse Transcription Kit (10)	Trial kit for 10 x 20 µl reactions: gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix, and RNase-Free Water	205310
QuantiTect Reverse Transcription Kit (50)	For 50 x 20 µl reactions: gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix, and RNase-Free Water	205311
QuantiTect Reverse Transcription Kit (200)*	For 200 x 20 µl reactions: gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix, and RNase-Free Water	205313
QuantiFast SYBR Green PCR Kit (400)*	For 400 x 25 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (contains ROX dye), 2 x 2 ml RNase-Free Water	204054
QuantiTect Primer Assay (200)	For 200 x 50 µl reactions or 400 x 25 µl reactions: 10x QuantiTect Primer Assay (lyophilized) supplied in single tube	Varies †
RNeasy Mini Kit (50)*	50 RNeasy Mini Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml and 2 ml), RNase-Free Reagents and Buffers	74104

* 大きいサイズのキットも入手可能です。 www.qiagen.com をご覧ください。

† GeneGlobe ウェブサイト www.qiagen.com/GeneGlobe でアッセイをご注文いただけます。96 または 384 ウェルプレートでのアッセイも入手可能です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.com の “Trademarks and Disclaimers” をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.com から入手可能です。

製品のより詳細な情報は www.qiagen.com/goto/QuantiTectRT をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, GeneGlobe®, QuantiFast™, Quantiscript™, QuantiTect®, RNeasy® (QIAGEN Group); Applied Biosystems®, SYBR® (Life Technologies).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更する場合がございます。予めご了承ください。© 2016 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.com

株式会社 キアゲン | 〒104-0054 | 東京都中央区勝どき3-13-1 | Forefront Tower II
Tel:03-6890-7300 | Fax:03-5547-0818 | E-mail:techservice-jp@qiagen.com