

SYBR® Green マスターミックスの重要性

SYBR Green マスターミックスの性能比較実験

SYBR Green 検出を用いたリアルタイム PCR/RT-PCR は、ライフサイエンス・メーカーの提供するマスターミックスにより簡便に行なうことができます。通常マスターミックスには、PCR 反応に必要なバッファー、DNA ポリメラーゼ、dNTPs、SYBR Green I 色素が入っています。ユーザーは PCR を開始する前にテンプレートとプライマーを添加するのみです。現在では様々なメーカーから SYBR Green マスターミックスが市販されていますが、本稿ではそれらの SYBR Green マスターミックスを比較するポイントについて説明します。

比較項目について

マスターミックスの性能を評価する際に、 C_T 値を比較するだけでは不十分です。 C_T 値が小さいということはリアルタイム PCR 定量の感度が高いことを意味するようにみえますが、他のパラメーターも考慮しなければなりません。まず、マスターミックスで PCR 産物の特異的な増幅が行なわれていることをチェックする必要があります。SYBR Green 色素は二本鎖 DNA に結合するために SYBR Green 蛍光強度に影響するプライマーダイマーや非特異的な PCR 産物の形成を回避することが重要です (図 1)。次に、マスターミックスを用いて得られる PCR 効率を比較することが重要です。増幅効率がターゲット間で同等で 100% に近いことが前提の定量法 (例えば $\Delta\Delta C_T$ 法) では、PCR 効率が低いとリアルタイム PCR 定量結果が不正確になります。PCR 特異性と PCR 効率を測定する方法を説明します。

方法

SYBR Green を用いた 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR でヒト白血球中の BAX (BCL2-associated X protein 遺伝子) の RNA の連続希釈による検量線作成を行ないました。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit あるいは A₁ 社の類似キットを用いて ABI PRISM® 7000 上で反応を行ないました。RNA の 10 倍連続希釈液 (10 ng ~ 10 pg) をテンプレートとして、各希釈液を triplicate で解析しました。使用した forward および reverse primer は QuantiTect® Primer Assay for human BAX です。

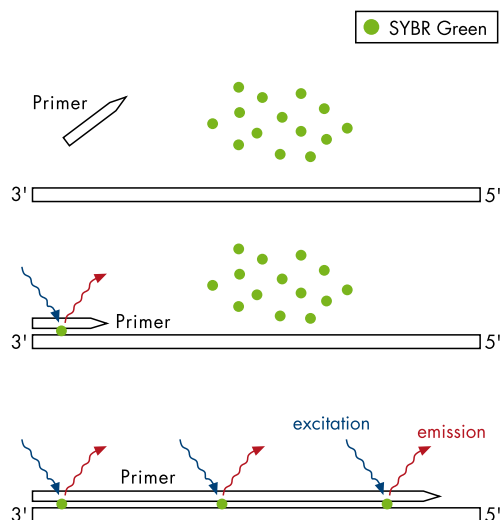


図1. SYBR Green原理

蛍光色素SYBR Green IIは全ての二本鎖DNA分子に結合し、特定の波長で蛍光シグナルを発生する。SYBR Green Iの最大励起波長と発光波長はそれぞれ494 nmおよび521 nmであり、どのリアルタイムPCR装置でも使用が可能。SYBR Greenを用いれば、ターゲットに特異的な標識プローブを合成しなくてもターゲットを定量できる。しかし、非特異的なPCR産物やプライマーダイマーも蛍光シグナルに影響するために、SYBR Green Iを用いる場合には非常に高いPCR特異性が必要とされる。



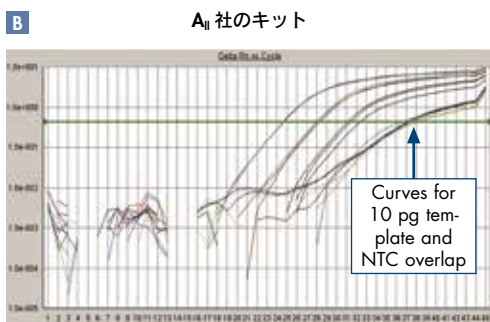


図2. No template control (テンプレートを含まないコントロール)

1ステップ・リアルタイムRT-PCRを表示のキットを用いて行なった。RNAテンプレートの10倍段階希釈液を4段階 (10 ng~10 pg) とNTCを用いて反応を行なった。

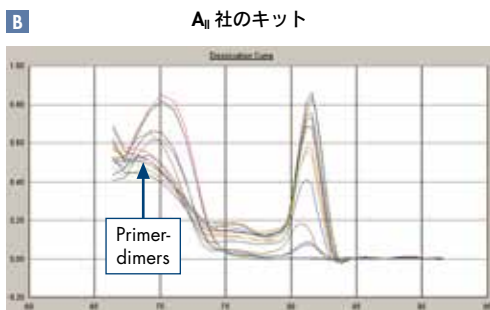
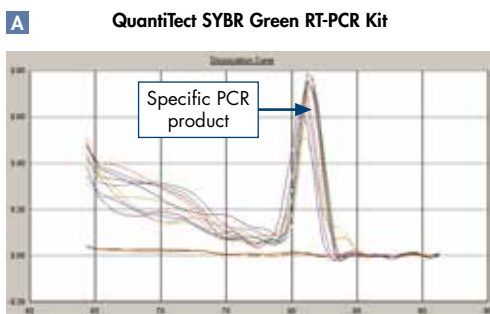


図3. 融解曲線解析

表示のキットを用いて1ステップ・リアルタイムRT-PCRを行ない、次に融解曲線解析を行なった。RNAテンプレートの10倍段階希釈液を5段階 (100 ng~10 ng) 用いて反応を行なった。RNAテンプレートの10倍段階希釈液を4段階 (10 ng~10 pg) とNTCを用いて反応を行なった。

結果

No template control (テンプレートを含まないコントロール) を用いた PCR 特異性の比較

リアルタイム PCR を行なう際に、NTC (no template control) の実験を加えることは重要です。これは、テンプレート以外の PCR に必要な全ての成分を含むコントロール反応液です。目的の PCR 産物の増幅は行なわれないために、NTC では SYBR Green 蛍光は観察されずです。従って NTC で SYBR Green 蛍光が観察される場合は反応液がコンタミしているかプライマーダイマーが形成されたことを示します。

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit を用いた 1 ステップのリアルタイム RT-PCR では、45 サイクルに至るまで NTC に蛍光シグナルが検出されませんでした (図 2A)。このことはコンタミやプライマーダイマーが存在しないことを示します。一方、A₁ 社のキットを用いた反応では 10 pg と同様の増幅が NTC にも見られました (図 2B)。このことは、マスターミックスがコンタミしているかプライマーダイマーが形成されたことを示唆します。

融解曲線解析を用いた PCR 特異性の比較

リアルタイム PCR の最後にリアルタイム用サーマルサイクラー上で融解曲線解析を行ない、反応の特異性をチェックすることができます。融解曲線解析では増幅された PCR 産物が設定した温度範囲内で緩やかに加熱 (例; 65 ~ 95°C) され、SYBR Green 蛍光が連続的に測定されます。特異的な PCR 産物であることを示すシングルピークのみが観察されなければなりません。複数のピークの存在はプライマーダイマーまたは非特異的な PCR 産物が存在していることを示唆します。

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit を用いると一本のピークのみが融解曲線解析で観察され、PCR 産物が特異的に増幅されていることを示しています (図 3A)。一方、A₁ 社のキットを用いた場合、融解曲線解析において 2 本のピークが観察されました (図 3B)。メインのピークは特異的な PCR 産物を示し、その他のピークはプライマーダイマーの存在を示します。

PCR 効率の比較

PCR の効率が 1 (あるいは 100%) であることは、PCR 産物が各サイクルで 2 倍に増えていることを意味しています。高い PCR 効率は信頼できるリアルタイム PCR 定量に必須です。PCR 効率は、テンプレート量の対数値に対して C_T 値をプロットした検量線を作成し、その傾きを計算することにより求めることができます。傾きから PCR 効率は次式に従って計算できます：

$$E = 10^{(-1/S)} - 1$$

ここで E は PCR 効率、S は検量線の傾き。

PCR 効率の計算は以下のように Microsoft® Excel を用いて行なえます：

- 傾き (S) をセル A1 に入れる
- 次の式をセル B1 に入れる： $= 10^{(-1/A1)} - 1$

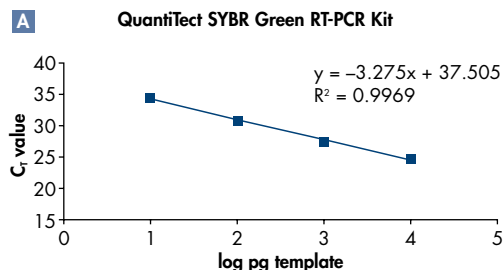
信頼できるリアルタイム PCR 定量のために、傾きは $-3.3 \sim -3.8$ に入るようにします。この領域は PCR 効率が 100 ~ 83.3% に相当します。

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit と A₁₁ 社のキットを用いて行なった増幅反応の検量線を作成し、比較しました (図 4)。検量線の傾きから、A₁₁ 社のキットの PCR 効率 (S = -4.24 ; E = 72.1%) よりも QuantiTect Kit の PCR 効率が高い (S = -3.275 ; E = 102%) ことが観察されました。なお、これらの PCR 効率はテンプレート量 10 ng ~ 10 pg の範囲に適用されます。これより広いダイナミックレンジの PCR 効率を計算するには、10 ng ~ 10 pg より広いレンジのテンプレートを調製し、リアルタイム RT-PCR を繰り返すことが必要になります。

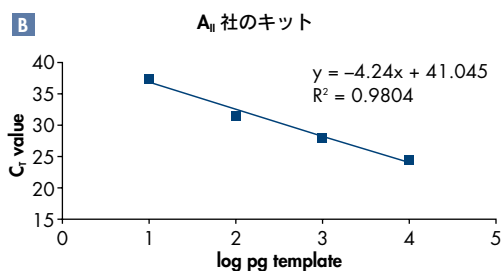
結論

- マスターミックスの性能評価は C_T 値のみで行なうのではなく PCR 特異性や PCR 効率の比較も行なう。
- NTC によりコンタミやプライマーダイマーの検出が行なえる。
- SYBR Green 蛍光強度に影響し不正確なリアルタイム PCR 定量の要因となるプライマーダイマーや非特異的 PCR 産物は、融解曲線解析により検出可能である。
- 検量線により PCR 効率を計算できる：信頼できるリアルタイム PCR 定量を行なうためにはこの値がほぼ 100% であることが重要。

1 ステップあるいは 2 ステップ RT-PCR での高い特異性と効率は QuantiFast™、QuantiTect あるいは Rotor-Gene® SYBR Green Kits で達成することができます。ヒト、ラット、マウス、その他のゲノムワイドなデザイン済みプライマーセットである QuantiTect Primer Assays と組み合わせて使用することにより、本キットは SYBR Green を用いたリアルタイム RT-PCR で良好な結果が得られます。本アッセイは個別のチューブあるいは 96 ウェルプレートあるいは 384 ウェルプレートに入っており、GeneGlobe® Web portal からオンライン注文できます。



cDNA amount	C_T value
10,000 pg	24.61
1,000 pg	27.47
100 pg	30.76
10 pg	34.43
NTC	45



cDNA amount	C_T value
10,000 pg	24.57
1,000 pg	28.09
100 pg	31.58
10 pg	37.54
NTC	37.21

図4. 検量線
1ステップ・リアルタイムRT-PCRを表示のキットを用いて行なった。検量線はテンプレート量の対数に対して C_T 値をプロットすることにより作成した。傾きを求め、PCR効率を計算した。

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.	価格 (¥)
オプションでUNGも可能なPCR/RT-PCR			
QuantiTect SYBR Green PCR Kit (40)*	Trial kit for 40 x 50 µl reactions: 1 ml 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2 ml RNase-Free Water	204141	10,500
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (200)*	For 200 x 50 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix, 100 µl QuantiTect RT Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204243	98,000
遺伝子特異的リアルタイムPCR用プライマーセット (SYBR Green用)			
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	18,000
サイクラーを選ばない高速PCR/RT-PCR			
QuantiFast SYBR Green PCR Kit (80)*	Trial kit for 80 x 25 µl reactions: 1 ml 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (contains ROX dye), 2 ml RNase-Free Water	204052	販売終了
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit (400)*	For 400 x 25 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix (contains ROX dye), 100 µl QuantiFast RT Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204154	99,500
Rotor-Geneサイクラー用			
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (80)*	For 80 x 25 µl reactions: 1 ml 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix, 2 ml RNase-Free Water	204072	販売終了
Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit (400)	For 400 x 25 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Master Mix, 100 µl Rotor-Gene RT Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204174	99,500

* その他のサイズも入手可能です。お問い合わせください。

記載の製品は研究用です。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。

Trademarks: QIAGEN®, GeneGlobe®, QuantiFast™, QuantiTect®, (QIAGEN Group); Rotor-Gene™ (Corbett Research Pty Ltd); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); ABI PRISM® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Microsoft® (Microsoft Corporation).

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。詳細は www.qiagen.co.jp をご覧ください。

2301617 04/2014 © 2014 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

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

