

1 ステップ RT-PCR の成否を決定する 8 つの課題

1 ステップ RT-PCR は、微量サンプル内のメッセンジャー RNA (mRNA) を迅速に解析できるため、遺伝子発現研究には最適です。この手法は主に以下の 3 つのステップで構成されています；細胞や組織サンプルからの RNA 分離、続いて逆転写酵素および特異的プライマーを用いたターゲット RNA から cDNA の合成。さらに耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いた PCR 手法による cDNA の増幅です。

しかし 1 ステップ RT-PCR には解決すべき課題がいくつかあります。これらの課題を克服するため、QIAGEN は QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit を開発しました。本キットは、1 ステップ RT-PCR を成功させる 8 つの一般的な課題に焦点を当てています。逆転写反応および PCR を同一チューブ内で行なえるため、操作ステップを軽減し、コンタミのリスクを最小限に抑えられ、また自動化を容易に実現できます。さらに全ての反応をわずか 1 時間で終了できる高速なサイクリングプロトコールが添付されています。

課題 1：アニーリング温度の感度への影響

アニーリング温度が最適化されていないと、非特異的なプライミングが起こります。逆転写反応で生成した一本鎖 cDNA は二本鎖 DNA に比べ、より低い温度で非特異的なプライマーとアニーリングする傾向があります。非特異的な増幅は特異的な増幅と競合し、収量を顕著に低下させることがあります。

QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit は 2 種の陽イオンを配合した PCR バッファーを含むマスターミックスが付いています (図 1)。このバッファーにより、広範囲の温度領域においてプライマー・アニーリングの高い特異性を維持できるため、プライマーとテンプレートのそれぞれの系における至適化実験の必要はありません。従って、アニーリング温度の異なるプライマーを用いたアッセイにも使用できます。

課題 2：反応セットアップ中の非特異的な増幅

適切なプライマーの選択は RT-PCR において非常に重要です。非特異的なプライミングは反応感度を低下するため、特異的な PCR 産物の収量が減少したり、RT-PCR の失敗につながります。逆転写酵素は室温でも活性が残っており、反応セットアップ中にお互いに結合したプライマー同士が伸長する可能性があります。その結果、形成されたプライマーダイマーが PCR で優先的に増幅され、反応の特異性および感度が低下します。従って、ほとんどのキットではセットアップを氷上で行なわなければならないため、そのため実験操作が煩雑になり、またハイスループットなセットアップの自動化を阻んでいます。

QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit は、室温で不活性なホットスタート RT 酵素を用いているため、室温での簡便なセットアップが可能で、サイクリングまでの一定時間、反応溶液を室温に放置しておけます (図 2)。このことは非特異的なプライミングを抑えるだけでなく、ハイスループットな自動化ワークフローも容易に実現できます。

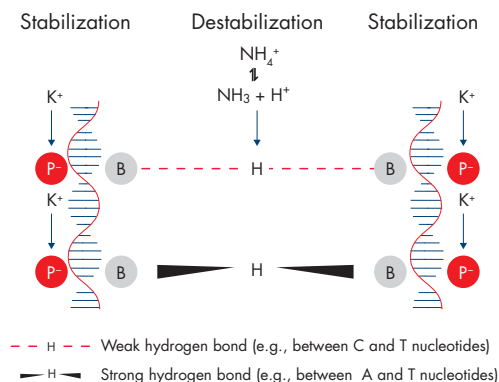


図 1. QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit のデュアルカチオン PCR バッファー
本バッファーは幅広いアニーリング温度で特異的な PCR 産物の高収量を確保するために K^+ と NH_4^+ の 2 種類の陽イオンを含む。これは非特異的に結合したプライマーを不安定化し、より適応性の高い反応環境を提供する。

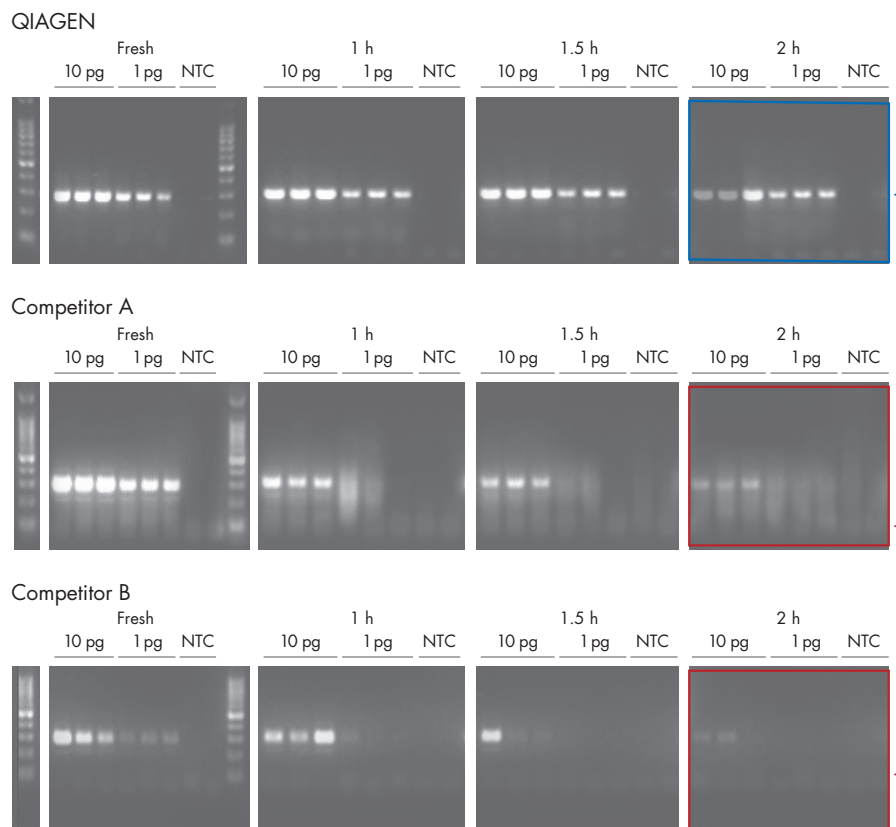


図 2. QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit を用いた室温でも安定な RT-PCR セットアップ

ACTB の増幅用テンプレートとして HeLa 由来のトータル RNA (10 および 1 pg) を用いた (triplicate)。反応溶液は氷上でセットアップ (Fresh) あるいは、解析前に表記した時間室温で放置した。QIAGEN キットを用いた反応では、室温で 2 時間放置した後でさえも明確な遺伝子特異的なバンド (青い矢印) が観察できた。

課題 3：RNase の混入

RNA を分解する RNase は我々の周りのあらゆる場所にある酵素で、ヒトの皮膚にも大量に存在しています。従って、細心の注意を払っていても、サンプルへ RNase は混入しやすく、大事なサンプルの RNA を破壊する可能性があります。QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit には、偶然混入した RNase による RNA 破壊を防御する RNase Inhibitor が含まれています。

課題 4：二次構造あるいは高い GC 含量を有する RNA

サンプル中の RNA が複雑な二次構造を持つ場合、逆転写酵素が RNA テンプレートで停止したり、解離することがあります。その結果生じた短い cDNA は、ダウンストリームのプライマー結合部位を含まないために、PCR 反応により増幅されません。逆転写酵素は RNA のループ構造を有する領域をスキップすることがあり、合成された cDNA はその部位を含まず、その結果内部に欠失を有する RT-PCR 産物を増幅します。

GC 含有量の高い RNA の場合には、RNA-DNA ハイブリッドの強い結合がプライマーの結合を妨害し、DNA ポリメラーゼの進行を妨げます。PCR ステップにおいて、cDNA 合成量の減少が感度の低下につながります。

QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit は、どのような RNA テンプレートでも高い親和性を実現するために Omniscript® と Sensiscript® を配合しています。さらに、GC リッチなアンプリコンに使用できるオプションの PCR 添加剤としてユニークな Q-Solution™ が付いています (図 3)。

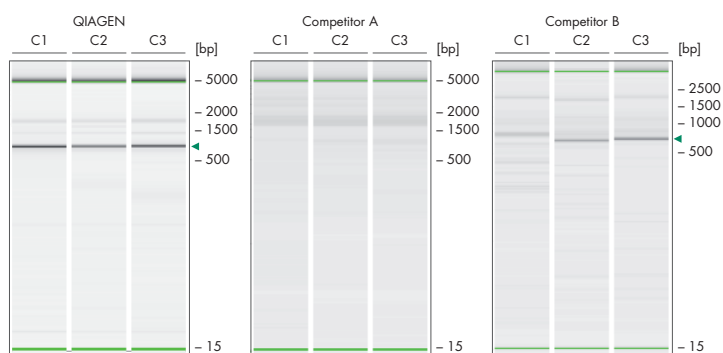


図 3. GC リッチな RNA の確実な cDNA 転写を実現する QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit

GC 率が 67.1% である TNFR1 (581 bp) の増幅テンプレートとして HeLa 由来のトータル RNA (100 ng) を用いた。反応はメーカーの指示に従い triplicate で行なった。緑色の矢印は特異的な PCR 産物を示している。

課題 5：PCR に起因する変異

通常の Taq DNA ポリメラーゼを用いた PCR 増幅は、DNA 複製過程においてある程度のエラーが発生する傾向があります。一般的に、点変異では 9,000 に対して 1 の割合でエラーが起こります。サンプルの生物学的な見識を得るためには、配列の正確性は必須事項です。3' - 5' エクソヌクレアーゼの校正活性を有するハイフィデリティ酵素を用いることで、PCR ステップ全体における正確性を高めかつ処理能力を向上し、長いターゲットの増幅を実現します (4 kb まで)。

課題 6：ピペッティングによるエラー

無色の液体を多数 (例えば、96 ウェルプレート) ピペッティングする場合、それぞれのウェルに溶液が入っているかどうかの確認が非常に困難です。本キットではシンプルで非常に有効な解決策を提供しています: マスターミックスに添加する不活性な黄色素およびテンプレートに添加する青色素により、ピペッティングのチェックを可視化できます。テンプレートをマスターミックスに添加すると、溶液は緑色に変色します。これらの色素は、電気泳動中の泳動を追跡するゲル色素として利用できるため、サイクリング後にゲルのローディング/トラッキング色素を添加する必要はありません。



課題 7：間違ったネガティブ結果判定

ゲル上の PCR 産物バンドが検出できない場合、RNA ターゲット配列が存在しないことを意味しますが、PCR 反応中に何か失敗したことも考えられます。ターゲット RNA が存在しないのか、あるいは PCR の再実験が必要かを確信を持って判定するためには、各実験でポジティブコントロールが必要です。絶対に確実であるためには、ポジティブコントロールがそれぞれの反応で実施しなければなりません。QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit は duplex PCR 用に最適化され、それぞれの反応でインターナル・ポジティブコントロールを一緒に増幅できます。

課題 8：ターゲット RNA の検出限界

含有量が非常に少ない mRNA の検出は困難なことがあります。ある種のサンプルではターゲット RNA がほんのわずかしが含まれていません。このような場合には、RT-PCR 試薬は、わずかピコグラムレベルの RNA を検出できる高い感度に対応するように最適化されていなければなりません。QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit の試薬は、わずか 1 pg の RNA でも検出できるように最適化されています。さらに、2.5 倍濃縮のマスターミックスは、より多量のサンプル RNA の添加を実現します。

まとめ

新製品 QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit は、非常に高い感度と特異性を兼ね備えた簡便な RT-PCR 用試薬です。本キットには、逆転写反応と PCR 増幅を同一チューブで行なえる最適化済みの試薬が含まれています。特有な酵素の組み合わせと特別に開発した反応バッファーは、反応条件の最適化実験なしに効率的で特異性の高い反応を実現します。さらに、本キットは室温での反応セットアップが可能で、ピペッティングの視覚的コントロールもでき、実験操作の簡便性をお届けします。また、超高速なプロトコルを用いて、わずか 1 時間で 1 ステップ RT-PCR を完了できます。

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.	価格 (¥)
QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit (50)	6 vials for 50 reactions: 1 x 500 µl OneStep Ahead RT-PCR Master Mix, 1 x 50 µl OneStep Ahead RT Mix, 1 x 200 µl Template Tracer, 1 x 50 µl Master Mix Tracer, 1 x 1.9 ml water, 1 x 400 µl Q-Solution	220211	23,500
QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit (200)	8 vials for 200 reactions: 2 x 1 ml OneStep Ahead RT-PCR Master Mix, 1 x 200 µl OneStep Ahead RT Mix, 1 x 200 µl Template Tracer, 1 x 50 µl Master Mix Tracer, 2 x 1.9 ml water, 1 x 2 ml Q-Solution	220213	71,500
QIAGEN OneStep Ahead RT-PCR Kit (2000)	75 vials for 2000 x 25 µl reactions: 20 x 1 ml OneStep Ahead RT-PCR Master Mix, 10 x 200 µl OneStep Ahead RT Mix, 10 x 200 µl Template Tracer, 10 x 50 µl Master Mix Tracer, 20 x 1.9 ml water, 5 x 2 ml Q-Solution	220216	629,000

本製品のより詳細な情報は弊社ウェブサイト www.qiagen.com/onestep-ahead をご覧ください。

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。

Trademarks: QIAGEN®, Sensiscript®, Omniscript®, Q-Solution™ (QIAGEN Group).

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