

遺伝子発現および発現制御の解析



遺伝子発現制御の重要なメカニズム

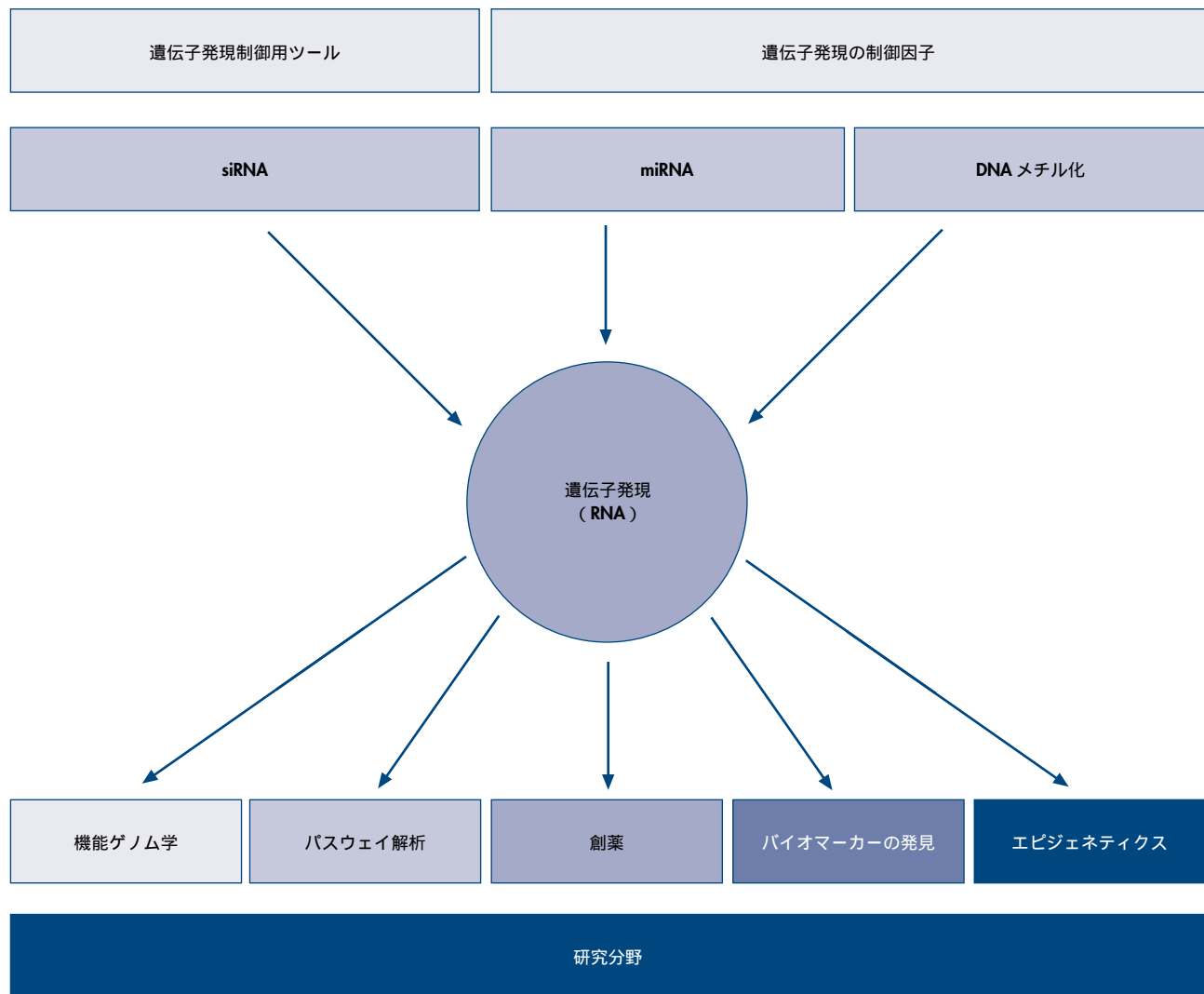


図1. 遺伝子発現および発現制御

遺伝子ノックダウン用の強力なツールの一つである siRNA を介した RNAi により遺伝子発現を人工的に制御できる。自然界に存在する短い RNA である miRNA による遺伝子サイクリング、そして外部環境の刺激に反応して変化し得るゲノム DNA の DNA メチル化が遺伝子制御のメカニズムに含まれる。従って RNAi、miRNA、DNA メチル化は様々な研究分野において重要な要素である。

遺伝子研究のための様々なソリューション

siRNA を用いた RNAi という画期的な手法および miRNA や DNA メチル化という重要な発見は研究者たちに多くの可能性を提供しています。RNAi は遺伝子機能を解明する重要なツールであり、また miRNA および DNA メチル化は癌のような疾病研究という興味深い研究分野に参与しています。QIAGEN はこのような科学的進歩の重要性を常に認識し、遺伝子サイレンシングや遺伝子発現解析、さらに miRNA や DNA メチル化による遺伝子制御研究における重要な課題を解決するための幅広い製品群を提供しています (表 1)。

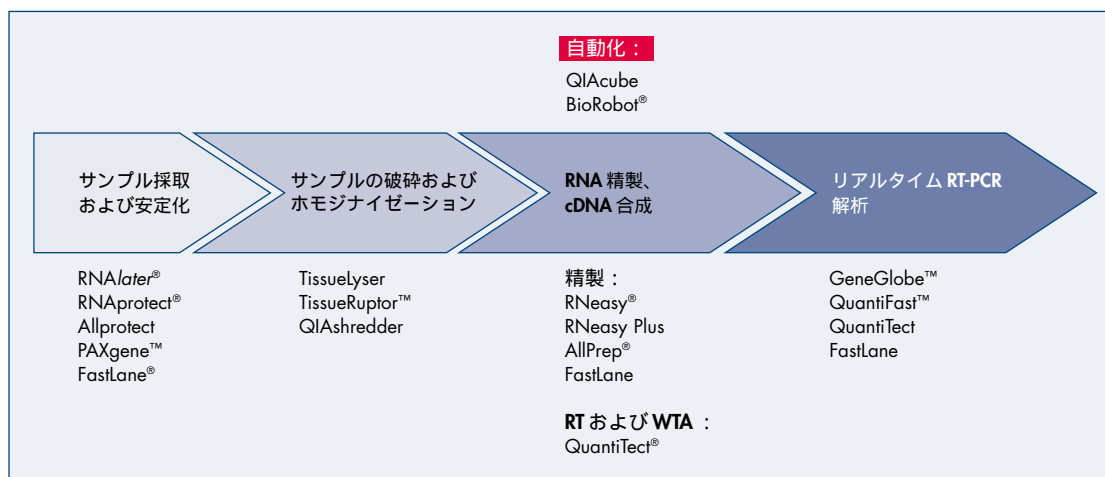
表 1. 遺伝子研究における課題と QIAGEN のソリューション

アプリケーション	課題	QIAGEN が提供する解決策
遺伝子発現解析	サンプル採取時に起こる人為的な転写物レベルの変動	簡便かつ迅速にサンプルを安定化する試薬
	限られたサンプル量を用いた解析	配列によるバイアスを最小限に抑えた全トランスクリプトーム増幅
	遺伝子発現解析に最適なアッセイデザイン	バイオインフォマティクスで検証済みのゲノムワイドなプライマーセット
	効率的な PCR 増幅の実現	サイクラーを選ばない至適化済みのリアルタイム PCR マスターミックス
	ハイスループット解析の実施	RNA 精製不要なリアルタイム RT-PCR 解析
RNAi/miRNA 研究	ノックダウン効果が高く、オフターゲット効果が最少の siRNA の入手	最新の知見を取り入れたデザインによる特異性の高いデザイン済み siRNA がオンライン上で簡単に検索・オーダー
	効果的な siRNA 導入	幅広い細胞株で実績のあるトランスフェクション試薬
	研究テーマに合った融通性のあるツール	定評のある各種ライブラリーや自由にカスタマイズできる siRNA プレートの提供
	新しい miRNA、smallRNA 研究分野における信頼性の高いツールの不足	miRNA、smallRNA に特化した精製およびリアルタイム RT-PCR 解析用ツール
エピジェネティクス	正確で再現性の高い DNA メチル化解析	完全な Bisulfite 変換 (非メチル化シトシンの 99% 以上)
	少量サンプルからでも高感度な結果	Bisulfite 処理中にユニークな DNA 保護を実現
	簡単に迅速な Bisulfite 変換	分注済みのバッファーを用いて能率的な 6 時間プロセス ; 自動化プロトコールも提供
	FFPE 組織サンプルからの DNA メチル化解析	FFPE 組織サンプルに特化した DNA 精製および Bisulfite 変換法



QIAGEN の標準化された遺伝子発現解析用製品群：

- in vivo での遺伝子発現プロファイルを正確に提示する RNA 精製
- 至適化実験なしに高い特異性と感度で転写物を定量
- 標準化された能率的なワークフローで比較できる再現性の高いデータを実現



標準化された遺伝子発現解析に関する詳細は www.qiagen.com/geneXpression をご覧ください。

遺伝子発現解析アプリケーション

遺伝子発現解析はバイオマーカー同定、ターゲット検証、新薬の開発を目的として、癌研究のような分野において非常に有用な役割を果たしています。簡単な操作ステップと最小限の所要時間で正確なリアルタイム PCR 結果が得られることが研究者にとって一番重要です。SYBR® Green 検出によるリアルタイム PCR は、高速サイクリング PCR 用に最適化されたバッファシステム（特許申請中）とデザイン済みのゲノムワイドなプライマーセットを組み合わせることで、高い特異性と感度を保持し、わずか 45 分で結果が得られます（図 2）。この革新的で迅速なリアルタイム PCR テクノロジーは、高速サイクラーだけでなく一般サイクラーでも高速性と正確さを実現し、SYBR Green あるいは配列特異的なプローブを用いても検出できます（図 3）。RNAi 検証のようなアプリケーションには、RNA 精製を排除してリアルタイム PCR の全作業工程を能率化し、一つの反応液中で複数ターゲットを解析できます（図 4）。これらの PCR テクノロジーは即使用可能なマスターミックスを導入し、時間のかかる最適化ステップを排除しています。

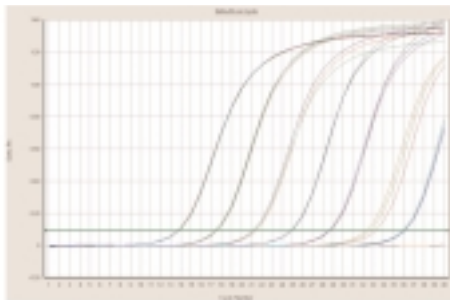
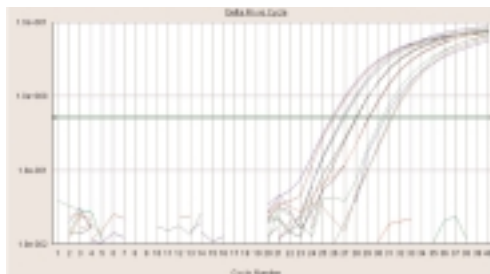


図 2. 幅広いダイナミックレンジをもつ SYBR Green 利用のリアルタイム RT-PCR

QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit は対応する QuantiTect Primer Assay とともに使用した時、HSP89 (a heat shock protein) 転写物を 10^7 倍までの希釈範囲で正確に定量できた。反応は、in vitro 転写物の 10 倍希釈液 (10^7 コピーから 10 コピーまで) を用いて Applied Biosystems® 7500 Fast System 上で triplicate で行なった。

A



B

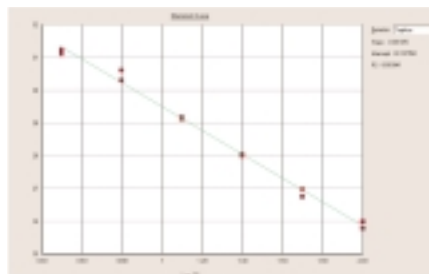


図 3. プローブ利用の迅速で正確なリアルタイム RT-PCR

QuantiFast Probe PCR Kit は、骨格筋由来の cDNA の 2 倍希釈液 (100 ng ~ 3.13 ng) を解析した際、各希釈液を明確に区別できる C_t 値 (A) および 90 % の PCR 効率を実現した (B)。反応は NFKB の TaqMan® 遺伝子発現アッセイを用いて ABI PRISM® 7000 上で duplicate で行なった (データ提供 ; Dr. Despina Constantin and Dr. Tim Constantin, University of Nottingham Medical School, United Kingdom.)

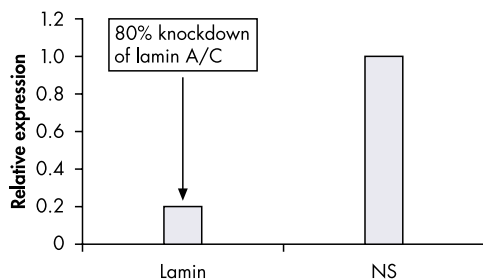


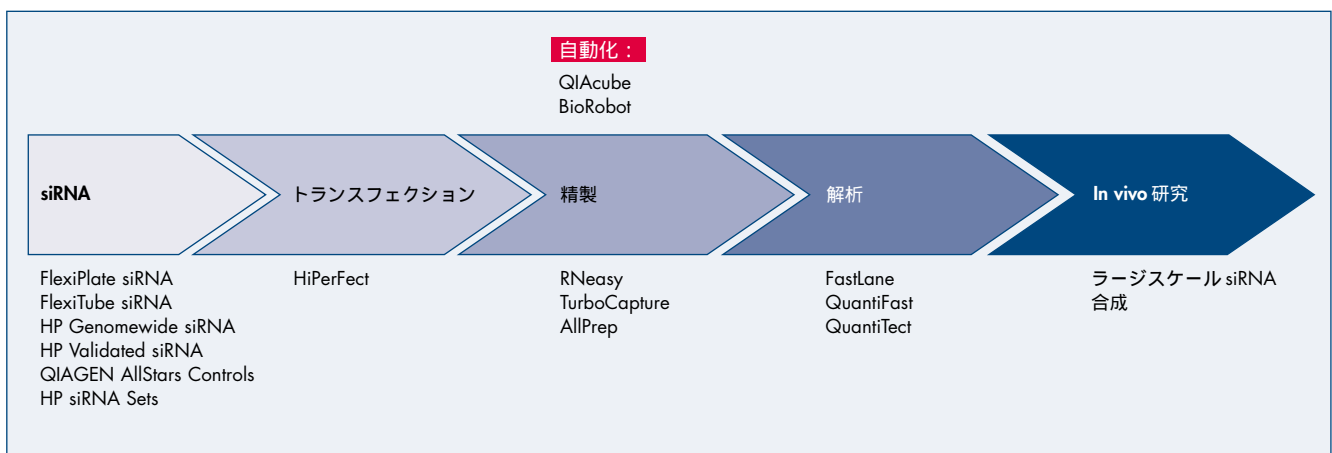
図 4. 信頼できる遺伝子サイレンシング検証

HCT116 細胞の入った 96 ウェルプレートのウェル 5 つに lamin A/C siRNA (Lamin) あるいは nonsilencing siRNA (NS) をトランスフェクトした。FastLane Cell Multiplex Kit および lamin A/C (構成タンパク質) と 18S rRNA (内因性コントロール) 用の TaqMan アッセイを用いて細胞をマルチプレックス・リアルタイム RT-PCR 解析した (データ提供 ; Angela Quinn, Genzyme Corporation, USA.)



QIAGEN の定評ある RNAi 用製品群：

- 革新的な siRNA デザインでオフターゲット効果を最小限に抑えた効果的な siRNA を提供
- ニーズに応じて siRNA 収量、フォーマット、プレートレイアウトが選択可能
- 低濃度の siRNA でも非常に高いトランスフェクション効率を実現



信頼できる最高級の RNAi ソリューションについては www.qiagen.com/siRNA をご覧ください。

siRNA トランスフェクション

RNAi 研究を成功させる重要なファクターの一つがトランスフェクションです。お使いの細胞、実験フォーマットに合わせて、コントロール siRNA を用いた最適化実験を行なうことで、信頼性の高い結果を得ることができます。HiPerfect Transfection Reagent は一般的な細胞であれば非常に低濃度での実験ができ、siRNA 濃度の観点からのオフターゲット効果を最小とすることができます。QIAGEN では様々なプレートフォーマット、実験系に合わせたプロトコールをご用意しています。

プロトコール例：

- 付着細胞への迅速な siRNA トランスフェクション (96/384 ウェルプレート)
- マクロファージ細胞株への siRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)
- Jurkat や K562 などの浮遊細胞株への siRNA トランスフェクション (24 ウェルプレート)
- 付着細胞への大量 siRNA トランスフェクション (100 mm ディッシュ)
- siRNA を用いた長期の RNAi 実験 (24 ウェルプレート) など

RNAi アプリケーション

RNAi には特定のパスウェイおよび創薬におけるハイスループットスクリーニングを含む幅広いアプリケーションがあります。例えば、RNAi スクリーニング実験により抗癌療法でターゲットとされる可能性の高いキナーゼが同定されました (図 5)。また、マイクロアレイ実験において発現が誘導あるいは抑制されることが判明した遺伝子の追加実験としても RNAi 解析は利用されています。

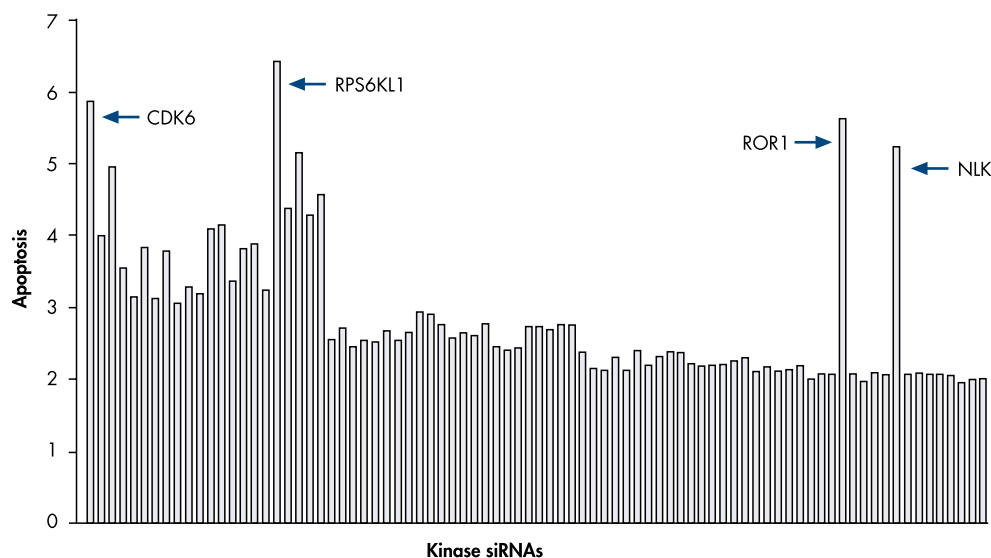
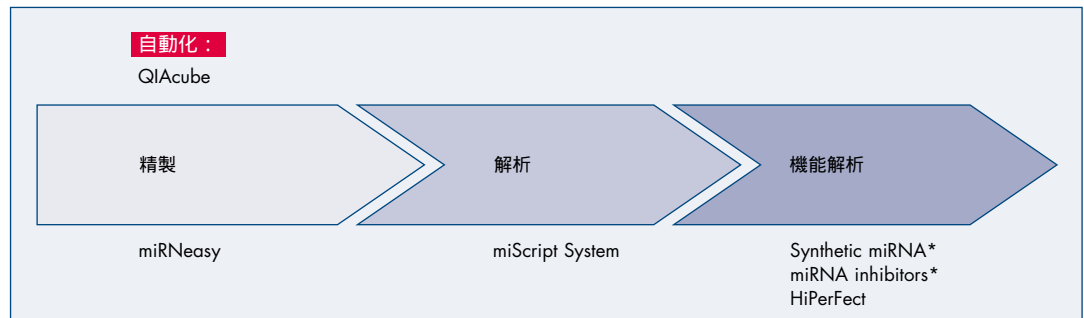


図 5. ヒト・キナーゼの RNAi スクリーニングにより抗癌療法の新規標的を同定

これらのデータは、QIAGEN の Human Kinase siRNA Set を細胞にトランスフェクトした後、ヒストン結合 DNA の切断化を測定する ELISA でアポトーシスを測定した結果の一部である。表記した 4 種類の survival キナーゼの抑制はアポトーシス増大を引き起こす。これらの 4 種類のキナーゼのうち 2 種類は全く新しく機能が未知である (RPS6KL1 と ROR1)。(データ提供； Jeffrey P. MacKeigan, Leon O. Murphy, and John Blenis, Harvard Medical School, USA.) この研究の詳細は以下の文献を参照； MacKeigan, J.P. et al. (2005) Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat. Cell Biol.* 7, 591.

QIAGEN の miRNA 研究を促進する製品群：

- あらゆる種類の動物組織や細胞から miRNA を効果的に精製および濃縮分離
- 高感度で特異的な miRNA の検出および定量
- 1 回の cDNA 合成から複数の miRNA を迅速かつ簡便に定量
- 同一 cDNA 合成反応液から mRNA と miRNA の両方を定量



* お問い合わせください。

miRNA アプリケーション

一度の cDNA 合成により多数の miRNA 発現を高い特異性で定量できる miScript System は、発現プロファイル研究に最適です。モデルシステムとして Jurkat 細胞を用いて、328 種類の miRNA (miRBase V 8.0 ; <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences> から選択) の発現を解析した結果、111 種類の miRNA が Jurkat 細胞で検出されました (図 6)。また、未処理の Jurkat 細胞、phorbol myristyl acetate (PMA) で処理した細胞、PMA と Ionomycin (CI) で処理した細胞で、処理 24 時間後に、miRNA 発現レベルの変化を検出できました (図 7)。miRNA 発現の変動は T 細胞活性化に大きく関与している可能性があります。

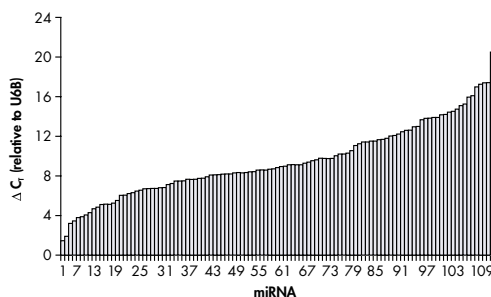


図 6. Jurkat 細胞中で発現している様々な miRNA
miRNeasy Mini Kit を用いて Jurkat 細胞からトータル RNA を調製した。328 種類の miRNA のリアルタイム PCR 解析には miScript System を用い、1 反応液あたり様々な miScript Primer Assay と cDNA 0.5 ng を利用した。このグラフは標的 miRNA のリファレンス (small nuclear RNA である U6B) の C_T 値に対する相対的な値を示している。

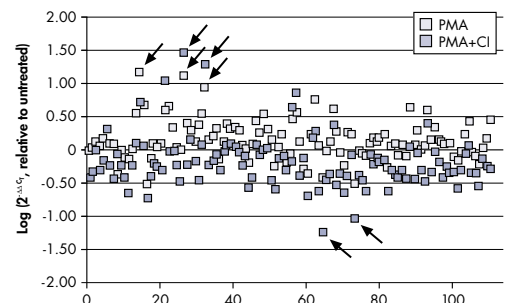


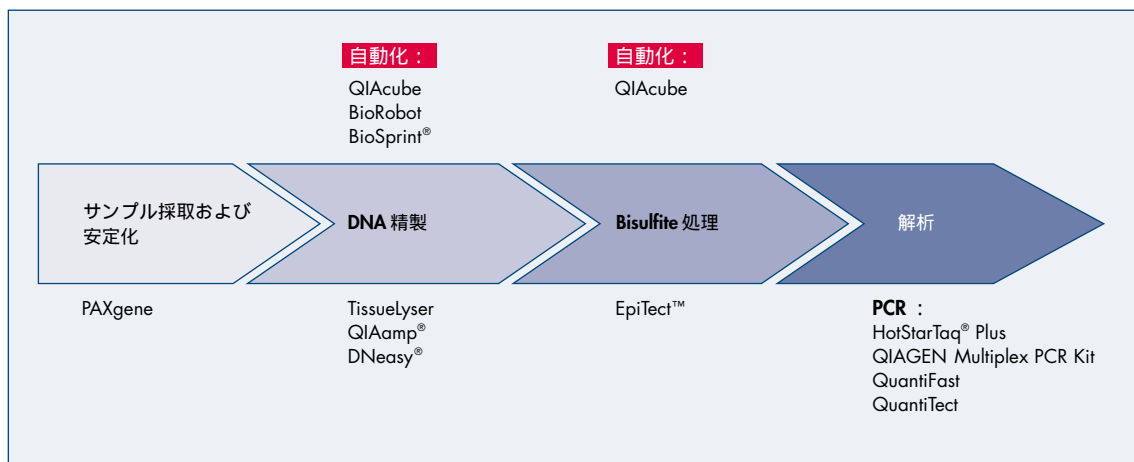
図 7. 異なる処理による miRNA 発現の変動を検出
Jurkat 細胞を未処理、あるいは PMA、PMA と CI で処理した。24 時間後に miRNeasy Mini Kit を用いてトータル RNA を精製した。様々な miScript Primer Assay とともに miScript System を用いて 328 種類の miRNA のリアルタイム PCR 解析を行なった。Jurkat 細胞内で発現していた 111 種類の miRNA データを U6B の発現データに対して相対化し、処理後の発現レベルを未処理細胞のそれに対する相対的な値 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$ 対数値) として表している。

miRNA 研究を促進する情報に関しては www.qiagen.com/miRNA をご覧ください。



QIAGEN の革新的なエピジェネティクス解析用製品群：

- FFPE 組織切片を含むどのようなサンプルからでも高品質な DNA を精製
- 微量 DNA からでも DNA を保護し完全な Bisulfite 変換 (図 8、9)
- 簡便で特異的な PCR テクノロジーで正確な結果を実現



エピジェネティクス研究に関する詳細は www.qiagen.com/epigenetics をご覧ください。

図 8. DNA 保護により Bisulfite 処理した微量 DNA からでも大量の PCR 増幅産物

QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いて血液からヒト・ゲノム DNA を精製し、様々な量の DNA (1 ng ~ 1 µg) を EpiTect Bisulfite Kit (Bisulfite 処理用に斬新な DNA 保護溶液を含む) を用いて変換した。変換した DNA を増幅するようにデザインしたプライマー、2 セットと HotStarTaq Plus Master Mix Kit を用いて PCR を行なった。各 PCR 反応液の 5 µl を 1.3 % アガロースゲルにロードした。EpiTect Bisulfite Kit を用いた DNA 変換にはわずか 1 ng の DNA で十分であった。C : 未変換のゲノム DNA (ネガティブコントロール), M : マーカー

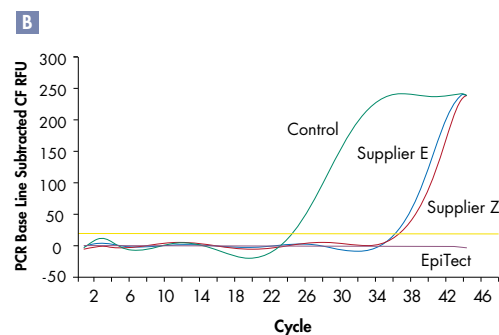
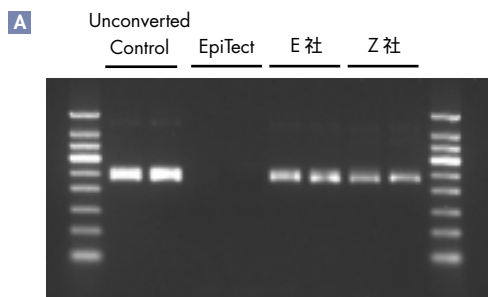
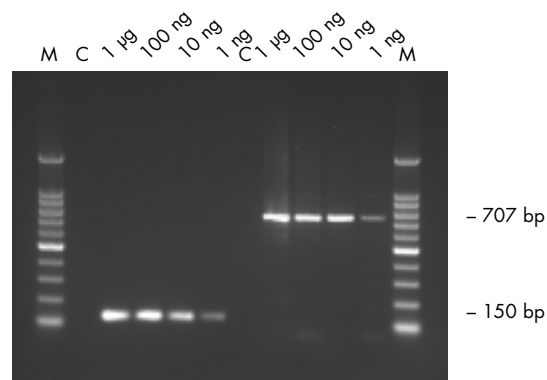


図 9. 高いシトシン変換率により未変換のゲノム DNA は不在

EpiTect Bisulfite Kit あるいは他社の Bisulfite キット (E 社、Z 社) を用い、メーカーの指示に従って 1 µg のゲノム DNA を変換した。続いて、各サンプル同等量中の未変換 DNA の存在を以下の方法で測定した。A HotStarTaq Plus Master Mix Kit によるエンドポイント PCR、B QuantiTect SYBR Green PCR Kit を用いたリアルタイム PCR。EpiTect Bisulfite Kit で処理した DNA は完全に変換されていたが、E 社や Z 社のキットで処理した DNA にはかなりの量の未変換 DNA が含まれていた。

エピジェネティクス・アプリケーション

DNA 修復、細胞周期制御、発生生物学、癌やその他の疾病を含む多くの研究領域において DNA メチル化は非常に注目されています。多くの年代ものの組織サンプルはパラフィン中に固定されて保存されており、これらのサンプルは従来の手法を用いて解析するのが困難であることが実証されています。しかし、EpiTect Bisulfite Kit を用いれば FFPE 組織サンプルでも Pyrosequencing® 解析のようなアプリケーションで信頼できる解析が行なえ、凍結組織サンプルと同様の結果を実現します (図 10)。

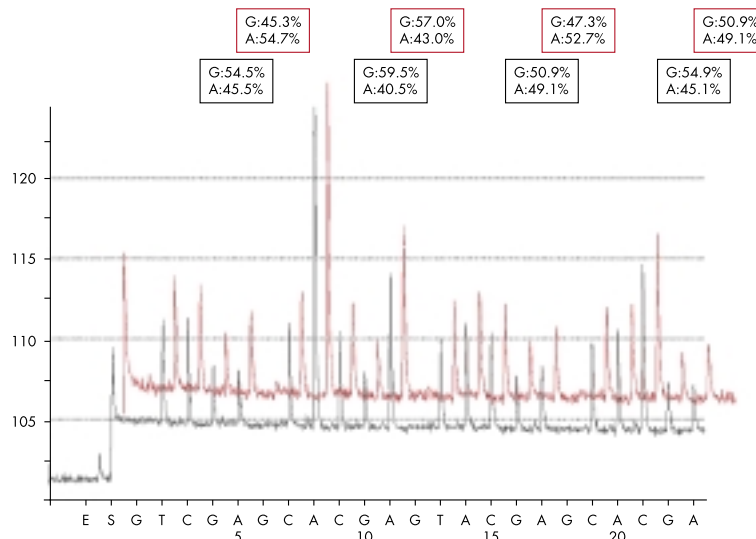


図 10. 凍結組織サンプルと FFPE 組織サンプルから同等の Pyrosequencing 結果を実現

同じ組織で凍結サンプル (黒) および FFPE サンプル (赤) から Pyrogram が得られた。本質的に同一結果が得られ、長期保存された組織中の MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) 遺伝子のメチル化を正確に解析できる可能性が開かれた (データ提供; Dr. Thomas Mikeska, Department of Neuropathology, University of Bonn, Germany)。

有用なウェブリンク

一般情報

- GeneGlobe ウェブサイト
(siRNA、miRNA およびリアルタイム RT-PCR アッセイ)
www.qiagen.com/GeneGlobe
 - 印刷物、引用文献、アドバイスや有用なツールなど
www.qiagen.com/support
 - 実験のニーズに最適な QIAGEN 製品の検索ツール
www.qiagen.com/ProductFinder
 - リアルタイム PCR 成功のための重要なファクター [PDF]
www.qiagen.com/criticalfactorsJA
 - マルチプレックス・リアルタイム PCR 成功のための重要なファクター [PDF]
www.qiagen.com/criticalfactorsMPJA
- ### RNAi
- 様々な細胞株でのトランスフェクション用データベース (英語)
www.qiagen.com/TransfectionTools
 - ハイスループット RNAi ユーザーフォーラム (英語)
www.qiagen.com/htRNAi
- ### 自動化ソリューション
- 自動化関連製品ページ
www.qiagen.com/automation
 - QIAGEN スピンカラム自動化装置、QIAcube
www.qiagen.com/myQIAcube

遺伝子発現解析

- SYBR Green を用いたリアルタイム RT-PCR
www.qiagen.com/SYBRGreen
- マルチプレックス、リアルタイム RT-PCR
www.qiagen.com/multiplex
- 高速リアルタイム RT-PCR
www.qiagen.com/fastPCR
- RNA 精製不要なリアルタイム RT-PCR
www.qiagen.com/FastLane

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。

“RNAlater[®]” is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents.

Trademarks: QIAGEN[®], QIAamp[®], AllPrep[®], BioRobot[®], BioSprint[®], DNeasy[®], EpiTect[®], FastLane[®], GeneGlobe[™], HotStarTaq[®], QuantiFast[™], QuantiTect[®], RNAprotect[®], RNeasy[®], TissueRuptor[™] (QIAGEN Group); ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®] (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); PAXgene[™] (PreAnalytiX GmbH); Pyrosequencing[®] (Biotope AB); SYBR[®] (Molecular Probes, Inc.); TaqMan[®] (Roche Group).

The QuantiTect Whole Transcriptome Kit is for use only as licensed by Amersham Biosciences Corp (part of GE Healthcare Bio-Sciences) and QIAGEN GmbH. The Phi 29 DNA polymerase may not be re-sold or used except in conjunction with the other components of this kit. See U.S. Patent Nos. 5,854,033, 6,124,120, 6,143,495, 5,001,050, 5,198,543, 5,576,204, and related U.S. and foreign patents.

Purchase of this product (QuantiFast SYBR Green Kits, QuantiTect SYBR Green Kits, and FastLane Cell SYBR Green Kit) is accompanied by a limited, non-transferable immunity from suit to use it with detection by a dsDNA-binding dye as described in U.S. Patents Nos. 5,994,056 and 6,171,785 and corresponding patent claims outside the United States for the purchaser's own internal research. No real-time apparatus or system patent rights or any other patent rights, and no right to use this product for any other purpose are conveyed expressly, by implication or by estoppel.

This product (QuantiFast Probe PCR Kits, QuantiTect Probe Kits, QuantiTect Multiplex Kits, FastLane Cell Probe Kit, and FastLane Cell Multiplex Kits) is an Authorized 5' Nuclease Core Kit without Licensed Probe. Its purchase price includes a limited, non-transferable immunity from suit under certain patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd, for using only this amount of the product in the practice of the 5' nuclease process solely for the purchaser's own internal research when used in conjunction with Licensed Probe. No right under any other patent claims (such as apparatus or system claims) and no right to use this product for any other purpose is hereby granted expressly, by implication or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Purchase of this product (QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit, QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QuantiTect Probe RT-PCR Kit, QuantiTect Multiplex RT-PCR Kits, FastLane Cell SYBR Green Kit, FastLane Cell Probe Kit, and FastLane Cell Multiplex Kits) is accompanied by a limited, non-transferable license under RT and Reverse Transcription-PCR patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd to use it for the purchaser's own internal research. No real-time patent rights of any kind, no right under any other patent claims (such as apparatus or system claims), and no right to use this product for any other purpose is hereby granted expressly, by implication or by estoppel.

This product (QuantiTect Primer Assays) is compatible for use in the 5' nuclease process or the dsDNA-binding dye processes covered by patents owned by Roche or owned by or licensed to Applied Biosystems. No license under these patents to practice the 5' nuclease process or the dsDNA-binding dye processes are conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product.

siRNA technology licensed to QIAGEN is covered by various patent applications, owned by the Massachusetts Institute of Technology, the Carnegie Institute of Washington, Alnylam Corporation, and others.

Use of methylation specific PCR (MSP) is covered by US patents 5,786,146, 6,017,704, 6,200,756, 6,265,171, and corresponding foreign patents and applications. No license under these patents to use the MSP process is conveyed to the purchaser by purchasing this product.

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。

弊社顧客情報の取り扱いに関しては、www.qiagen.com/goto/PrivacyPolicy をご覧ください。 © 2007 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

