

製品特集

リアルタイムPCR装置の 最新アプリケーション

リアルタイムPCRは、核酸の増幅量をリアルタイムにモニターし解析する方法としてmRNA発現解析、SNP解析、感染症診断など様々な目的で広く利用されるようになっています。本製品特集では、リアルタイムPCR装置の簡単な原理やその有用性について概論で解説すると共に、協賛企業記事では、関連装置・試薬の新しいアプリケーション例、実験のコツやトラブルシューティング等をご紹介します。



◆概論◆

リアルタイムPCR装置の活用法

谷口武利、森澤啓子 621

◆協賛企業記事◆

リアルタイムPCR装置を用いて遺伝子定量実験を行いましょう！

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 625

トータルプロデュースでリアルタイムPCRをより確実なものに

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社、アンビオン株式会社 629

リアルタイムPCRの遺伝子発現解析をより正確に行うために

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社 631

リアルタイムPCR法の新技術で信頼性の高いデータを

インビトロジエン株式会社 634

Thermal Cycler Dice™ Real Time SystemによるO157ペロ毒素遺伝子の迅速検出

～食品からの腸管出血性大腸菌O157およびO26の検査法～ タカラバイオ株式会社 636

◆協賛企業◆

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社
アンビオン株式会社
インビトロジエン株式会社
エッペンドルフ株式会社

株式会社エムエステクノシステムズ
タカラバイオ株式会社
日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

BIOバイオテクノロジー

ジャーナル

研究の現場で活用できる先端技術と実用化の情報誌

隔月刊

- ◆先端技術の動向を一望
- ◆すぐに役立つ製品情報や実験のコツが満載
- ◆バイオ産業・行政の動向も紹介

■隔月刊 ■奇数月1日発行
■定価(本体2,500円+税)

■A4変型判

2006年特集一覧

2006年11-12月号 (Vol.6 No.6) (2006年10月20日発行予定)

- ヒト細胞材料最新活用法(仮)
- バイオ研究に役立つ最新顕微鏡とイメージングツールの活用法(仮)

2006年9-10月号 (Vol.6 No.5)

- 研究・診断・治療・ヘルスケアに展開するDDS
- リアルタイムPCR装置の最新アプリケーション

2006年7-8月号 (Vol.6 No.4)

- タンパク質機能解析に役立つデータベースとウェブツール
- Biacoreによる分子間相互作用解析のさらなる挑戦

2006年5-6月号 (Vol.6 No.3)

- 知って役立つ糖鎖解析

2006年3-4月号 (Vol.6 No.2)

- プロテオーム研究を成功させる試料調製と解析法
- 発光イメージングの突破力

2006年1-2月号 (Vol.6 No.1)

- これで上手くいく! RNAi実験のTips



その他充実の連載

サイエンス・トピックス/バイオニュース/BTジャーナルインタビュー/テクノ・トレンド/分子標的薬開発への挑戦/テクノロジーレポート/最新蛍光イメージング活用術/特許戦略で失敗しないためのバイオ研究実践ガイド

年間定期購読の案内

年間購読なら10%off+送料サービス*

送料弊社負担

▶1年間 6冊: 14,175円(税込) ▶2年間 12冊: 28,350円(税込)

* 小社に直接お申し込みか、羊土社書籍常時取扱店にお申し込みの場合に限らせていただきます (海外年間購読料は送料実費をいただきます。詳細は営業部まで)

ご購読のお申し込みは書店、小社営業部(電話、FAX、ホームページ(www.yodosha.co.jp/btjournal/)まで!

<概論>

リアルタイムPCR装置の活用法

谷口武利, 森澤啓子

リアルタイムPCRは、PCRによる核酸の増幅量をリアルタイムにモニターし解析する方法であり、遺伝子発現の定量、感染症診断、遺伝子多型（SNP）解析などさまざまな目的で利用されている。ここでは、その原理と応用を紹介し、起きやすい問題点とその解決策を紹介する。特に、条件が定まらず苦労している方には、便利なサイトをご覧いただきたい。

リアルタイムPCRのこれまでの発展の歴史

遺伝子の発現とは、ゲノムDNAから転写され、翻訳過程を経て機能をもったタンパク質（酵素、転写因子など）となることである。この遺伝子発現過程では転写レベルでの調節がよく研究されていて、多くの場合遺伝子発現の律速段階と考えられている。最近では、タンパク質の機能に翻訳後修飾が重要な役割を果していることも明らかになりつつあるが、特定のタンパク質の生理活性などを定量できない場合、何と言っても遺伝子の発現量を予測するにはmRNA量を測定する方法が感度も良く、簡単である。mRNAは、細胞や組織から抽出され、粗面小胞体上のリボソームと結合したmRNAを用いて測定する。mRNAには安定なものと不安定なものがあり、必ずしも遺伝子の発現量を反映していないこともあるが、多くの場合遺伝子の発現量に一致する。

これまで、ノーザンプロットがよく用いられていたが、数十 μ gもの全RNAが必要で微量サンプルでの実験が難しかった。PCRの普及により、mRNAを逆転写（Reverse Transcriptase reaction）してPCRを行うRT-PCRが全盛となったが、RT-PCRでmRNA量を正確に測定することはなかなか難しかった。なぜなら、ノーザンプロットがmRNAそのものを測定

しているのに対し、RT-PCRは数十サイクルの増幅過程後の反応産物を測定している点にある。この増幅過程の効率がサンプルごとに違っていると、数十サイクル後には大きな差を生じてしまい正確な測定ができない。また、全く異なるmRNA量でも30サイクル後の反応産物は同じになってしまふこともよく経験する。そのため、25サイクル後から2サイクルごとにPCRを止めて、一部反応産物を取り出し、増幅過程を観察しながら測定したりしていた。

このような苦労を一挙に解決してくれたのがリアルタイムPCRである。その名のごとくPCRの増幅過程がリアルタイムでモニターに写し出されるため、増幅効率の違いも早く頭打ちになった反応も一目瞭然である。このように画期的な方法であるが条件が決まるまでに色々と苦労する。しかし、一度条件が決まると安定した測定が可能となり、細菌・ウイルス感染のような臨床診断には有効な方法かと思われる（636頁参照）。

リアルタイムPCRの簡単な原理

リアルタイムPCRでは、遺伝子が増幅されている様子がリアルタイムでモニターに表示される。この装置は、PCRの3ステップ（熱変性、アニーリング、伸長

反応）のうち、各アニーリング過程、あるいは伸長反応の最後で蛍光発光を検出し表示する。

検出方法には2種類あり、A：インターラーション法と、B：ハイブリダイゼーション法がある。インターラーション法では、SYBR[®]Greenなどの蛍光物質が伸長反応の終わったPCR産物の2本鎖DNAに入り込み発光する（図1-A）。この方法は、最も一般的で手軽にできるが、PCR産物が目的遺伝子以外の反応産物を合成してしまう場合には、目的とするRNAの定量はできない。その時は、特異性の高いハイブリダイゼーションプローブを用いる。ハイブリダイゼーション法には、①TaqMan[®]プローブ法と、②FRETプローブ法があり、ほとんどの装置は設定を変えるだけでどちらのプローブも利用できる。まず、TaqMan[®]プローブは、目的mRNAに特異的なオリゴヌクレオチドの5'末端が蛍光物質で、3'末端がクエンチャー（蛍光を消光させる物質）で修飾されている。これを反応系に加えると、アニーリング過程でTaqMan[®]プローブは、目的とするPCR産物にハイブリダイズするが、蛍光はクエンチャーにより抑制されている。伸長反応で、Taq DNAポリメラーゼのもつ5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により、ハイブリダイズしているTaqMan[®]プローブが分解され、クエンチャーによる抑制

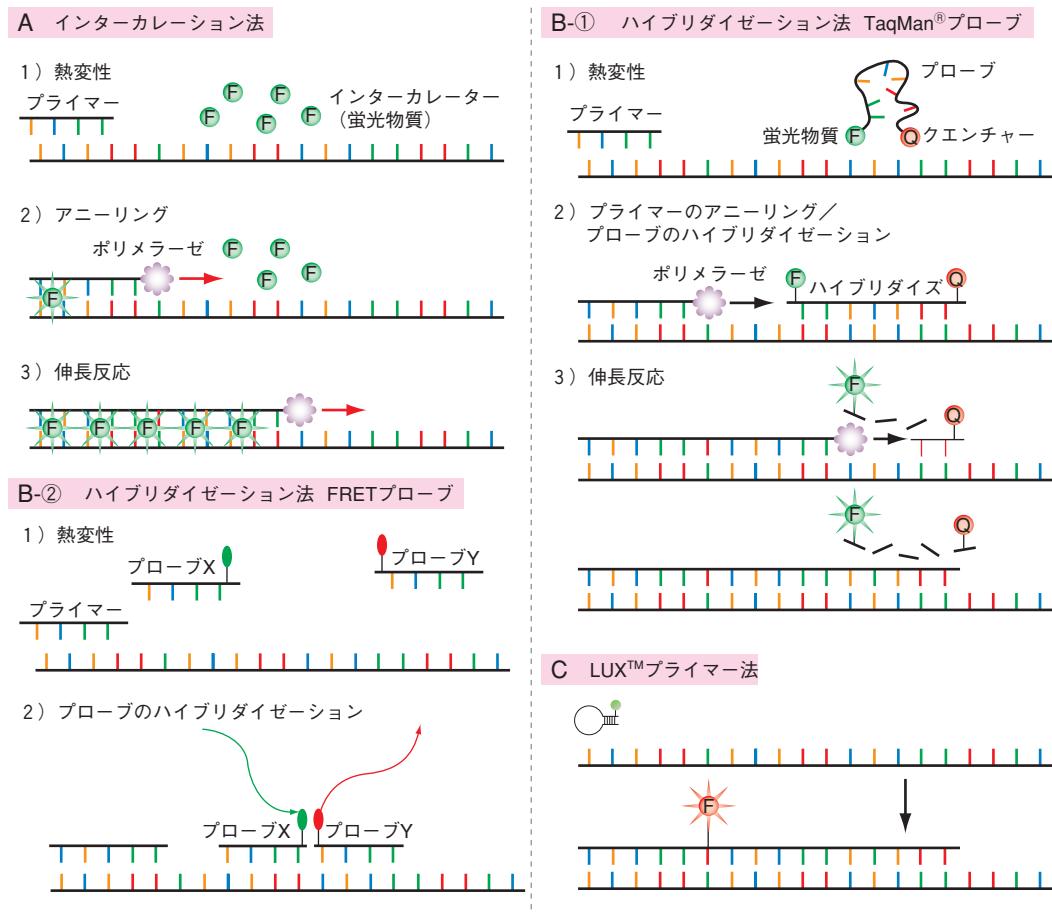


図1●リアルタイムPCRの検出法（本文参照）

A) インターカレーション法、インターラーサー：SYBR[®]Green, EtBrなど、B) ハイブリダイゼーション法、①TaqMan[®]プローブ法、②FRETプローブ法、C) LUX[™]プライマー法

が解除され蛍光を発する（図1-B-①）。一方、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）プローブは、目的mRNAに特異的な2本のオリゴヌクレオチドのうち、一方の3'末端に蛍光物質Xが、他方の5'末端に蛍光物質Yが修飾されている。両者がPCR産物に同時にハイブリダイズすると蛍光物質Xの蛍光で蛍光物質Yが励起され強い蛍光を発する（図1-B-②）。プローブ法とインターラーザー法の間のような方法としてLUX[™]（Light Upon extension）プライマー法（invitrogen社から販売）がある。蛍光（LUX）プライマーと未標識のプライマーの2本でPCRを行い、検出する方法で、LUX[™]プライマーはヘアピン構造を取るように設計し

ておく。プライマーがヘアピン構造を取っている間は消光能力があるが、プライマーが2本鎖PCR産物に取り込まれると蛍光を発する。プローブ法よりも安価で、インターラーザー法よりも感度が高いため、これらのリアルタイムPCR法で測定した結果は、多くの国際誌がその信頼性を認めている（634頁参照）。

利用目的と今後の発展

リアルタイムPCRは、多くの場合mRNA量を測定する目的に利用されており、正確な測定が可能である。また、PCR産物を十分作製し、標準スタンダード

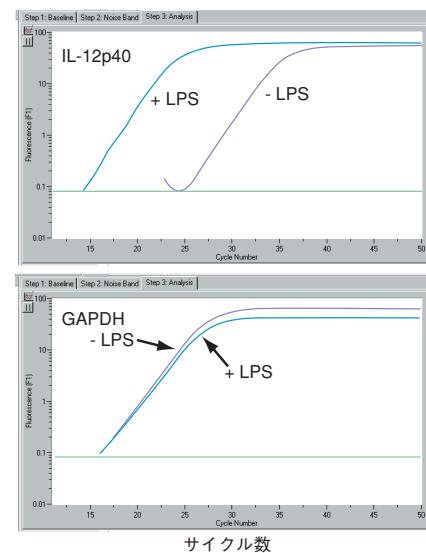


図2●リアルタイムPCRによるIL-12 mRNAの定量例

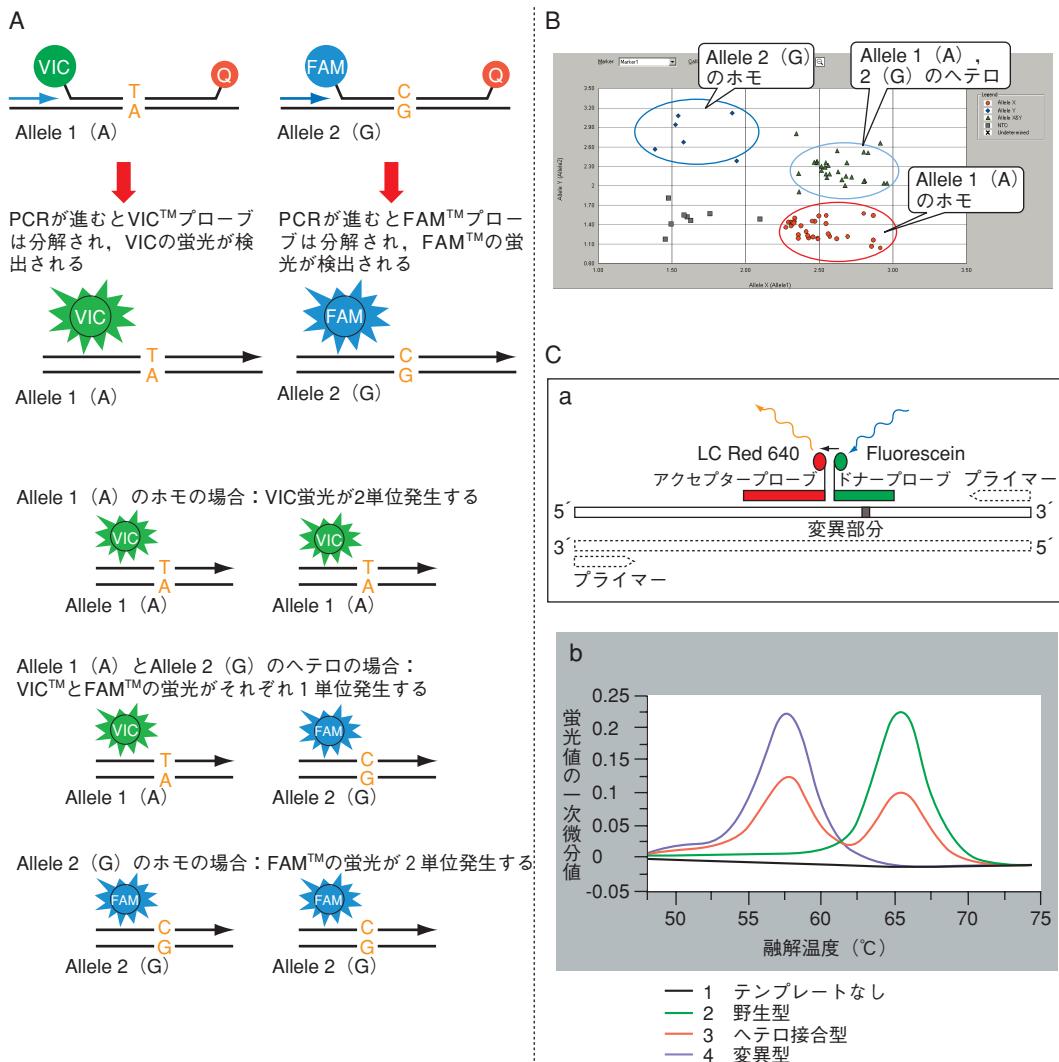


図3●リアルタイムPCRを用いたSNPタイピングの原理

A) B) TaqMan[®]プローブを用いたSNPタイピング。既報のSNPを確認するSNPタイピングでは、リアルタイムPCRを用いて、簡便で短時間に行える。まず、ゲノム上でSNPを含む領域を増幅できるPCR プライマーを1セットとゲノムDNAの1塩基変異 (A/G) に対応したAllele1とAllele2に相補的な配列を有するTaqMan[®]プローブを2種類用意する。これらのプライマーとTaqMan[®]プローブ、ゲノムDNAを混合し、リアルタイムPCRを行うことで、2種類のAlleleのSNPが検出できる。SNPタイピングではゲノム上の各AlleleをTaqMan[®]プローブで識別してSNPを検出するので、「A/Aのホモ」の場合はAというSNPを検出するTaqMan[®]プローブの蛍光 (VIC) のみが、G/Gのホモの場合はGというSNPを検出するTaqMan[®]プローブ (FAMTM) の蛍光のみ検出され、「A/Gのヘテロ」の場合はAとGの両方のSNPを検出する2種類の蛍光が検出される。しかし、通常のPCRと同じでサンプルの純度、量などではPCR効率が変わってくる状況がみられ、なかには判定しにくいサンプルも出てくるので、蛍光強度だけでなく、増幅曲線を確認して判定することが必要な場合もある。C) 融解曲線解析を用いたSNPタイピング。増幅産物の1塩基置換のシングルカラー検出。a: ハイブリプローブのデザインの模式図。b: 分析された配列の異なる遺伝子型の融解曲線解析。aのハイブリプローブを用いてゲノムDNAと共にリアルタイムPCRを行い、PCR反応が終了したら、分析された配列の異なる遺伝子型の融解曲線分析を行う。蛍光値の一次微分の負の値 [−d(F2/F1)/dT] を温度に対してプロットすると、異なるTmにピークが現れる (b)。融解曲線から、ハイブリプローブと完全に相同的な配列 (野生型・緑色) ではミスマッチのある配列 (変異型・紫色) よりTmが高い。両方の配列が含まれている試料 (ヘテロ接合体) では、2つのピークがそれぞれのホモ接合体のTmと同じ温度で検出される (赤色)。

ドとして保存しておき、スタンダードPCR産物を10倍希釈で5段階のスタンダードを測定ごとに入れておくと、どのサンプルにも同じスタンダードが利用できるので、実験ごとのばらつきを防ぐことができる（625頁参照）。特に、感染症診断などでは、正確な標準値を置くことができるので、判定が確実である。**図2**は、われわれが、ヒトマクロファージ系培養細胞（THP-1 cell）のLPS刺激によるIL-12の誘導をリアルタイムPCRで測定した結果である。コントロールとして測定したGAPDHは、LPS刺激で変化しないが、IL-12は、600倍にも増加していることがわかる。

ヒトゲノムにはさまざまな変異が存在する。この遺伝子多型の中で1塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）は、時に疾患の発生、進行を左右することがあり、SNPタイピングによる解析が行われている。SNPは、塩基配列の測定をせずに容易にリアルタイムPCRで判定できるので、その原理を簡単に紹介する。測定は、①アレル1、アレル2にそれぞれ異なる配列のTaqMan®プローブを使用する方法（図3-A）と、②変異がある部分を挟んだプライマーでハイブリプローブを用いてPCRを行い、その融解温度の違いにより解析する方法（図3-B）などがある。

リアルタイムPCRを行う際に苦労する点と解決策

刺激によりコントロール遺伝子の発現量が変動したり、臓器、組織によりコントロール遺伝子の発現量が異なる場合があるので、コントロール遺伝子のなかから変動のない遺伝子を探すことも必要になってくる（631頁参照）。

増幅曲線から定量を行うリアルタイム

PCRの場合、サンプル間の増幅効率のばらつきは正確な定量を行う際に致命的になる。サンプルの純度が重要であり、抽出操作はできるだけすみやかに行い、保存が必要な場合には分解酵素系が働くかないう気をつける。また、精製の際のタンパク質や有機溶媒の混入により、増幅効率が下がることもあるので、この点にも注意を払うことが必要である。

発現レベルの低い遺伝子の定量には、注意が必要である。確かに感度が良くなってきており、わずか2コピーでも検出可能であるというデータもみられるが、40サイクル以上の検出はわずかなブレが大きくなり再現性に乏しくなる。

定量性にはピペットингの技術も大きくものをいうので、ピペットの検定も欠かさないようにする必要である。

効率的なPCRを行うためには、PCR条件の最適化が重要である。プレデザインされたプローブや至適化サービスを使うと便利である（629頁参照）。

リアルタイムPCRに関して現在利用できる製品やサービス

アプライドバイオシステムズではプレデザインプライマー、プローブの検索サイトがあり、プログラム条件を変えないで測定できるプローブキットが多くデザ

インされている（<https://products.applied-biosystems.com/ab/en/US/direct/ab?cmd=ABGEKeywordSearch&catID=600689>）。

ロシュ・ダイアグノスティックスのホームページでは、ユニバーサルTaqMan®プローブライブラリーがあり、自分が測定したい動物種とアクセション番号を入れると、すでにデザインされた条件まで決まったTaqManプローブを購入できる（Universal Probe Library Assay Design Center；<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>）。

日本遺伝子研究所では、mRNAを逆転写したcDNAを送ると、プライマー、プローブの設計のみならず至適化条件の設定まで行ってくれるサービスがある。料金は、通常合成より高いが条件が決まらず実験をし続けるよりは賢明な選択に思う〔日本遺伝子研究所のプライマー、プローブの設計、至適化サービス（<http://www.ngrl.co.jp/>）〕。

また、自分のサンプルを解析してもらうリアルタイム解析受託サービス（タカラバイオ社など）やリアルタイムPCRの技術を習得するテクニカルワークショップ（タカラバイオ社など）も実施されており、設備投資ができない場合や実験に慣れていない場合は、利用すると便利である。



谷口武利（Taketoshi Taniguchi）

高知大学総合研究センター教授。
ミシガン州立Wayne State UniversityでPh. D.の学位を終え、京都大学医化学教室早石修教授のもとでポストドクター時代を過ごした。その後、再びNIH国立癌研究所Ira Pastan博士の研究室で当時遺伝子調節部門のチーフだったB. de Crombrugghe博士のもとでポストドクター。その後、できたばかりの高知医科大学へ赴任し27年が過ぎ、今年から高知大学・総合研究センター・生命機能物質部門・生体機能解析分野となり、現在 部門長。

リアルタイムPCR装置を用いて 遺伝子定量実験を行いましょう！

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 小林五月

リアルタイムPCR法は、現在の分子生物学にはなくてはならない手法の1つになっています。しかし、その原理には、直感的に理解しにくい部分があります。本稿では、弊社（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）に寄せられた質問のなかから、リアルタイムPCR法を理解する上で重要なものをいくつか選んで説明させていただきます。本稿が少しでも研究者の皆様のお役に立てれば幸いです。

はじめに

リアルタイムPCR装置とはいいったい何で、何をしてくれるものなのでしょうか？私は、装置（機械）としては、「蛍光強度計にPCR装置（温度上げ下げ装置）が付属したものです」、また、この装置は、「ある蛍光フォーマットを通して、PCR增幅を観察する時、その装置の蛍光強度計の閾値に達する（つまり見えるようになる）には、何サイクルPCRをすればよいかのサイクル数〔立ち上がりサイクル数（Cp: Crossing Point値）〕を与えてくれるもの」と説明しています。当たり前のように感じられるが、增幅と共にコンピュータ画面に描かれるシグモイドカーブばかり気になって、この本質が忘れられていることが多いように思います。したがって「遺伝子を定量する装置」といった一面的な捉え方をすると、「リアルタイムPCRは正しいとか、信用できない」といったような本末転倒な議

論に陥ってしまいます。

本稿では、遺伝子定量を中心にリアルタイムPCR法の原理について、「質問に回答する」形式で、できるかぎり具体的に記載させていただきます。

検量線を引くための標準物質としては何が適切でしょうか？

皆様は、何をご使用になられていますか？「PCR增幅産物を精製して使っています」、「そのPCR增幅産物をプラスミドに組み込んで使用しています」、「プラスミドは、切断してリニアにしています」、「存在量もしくは発現量が多い検体から希釈系列を作成して使用しています」といった回答のほか「全く違うPCRで作成した検量線を使用しているので…」、「PCRの効率をごちゃごちゃ言ってもナンセンスなので私は1サイクルで2倍に増えるものと割り切って計算していますよ」など、さまざまな答えがあるかと思

います。しかしこのなかに完璧な正解はありません。逆に考え方次第ですので、どれも間違ってはいません。リアルタイムPCRで作成される検量線とは、何を意味しているのでしょうか？これは、「使用した標準物質の希釈系列（濃度）範囲内におけるその標準物質の増幅の平均的効率を示している」というように説明できます。つまり、その実験の諸条件により醸し出される「PCR効率」を示しているにすぎないのです。図1に（RT-）PCRに影響を及ぼすファクターを示しますが、われわれがPCR増幅産物やそれをプラスミドに組み込んで使用したりしているのは、単に実際の検体を増幅するプライマーで、同じ配列部位を増幅すれば、実検体でのPCR効率にニアリーアイコールになるであろうという考え方からきているのです。したがって、もし2つの検体の差が知りたいのであれば、その実験のPCR効率が1.9で、Cp値の差が3.2サイクルであれば $1.9^{3.2} = 7.8$ 倍違うと簡単に計算できてしまいます。

では絶対値が欲しい場合はどうでしょう？ゲノムの数などを測定する場合などであれば、ある程度は可能ですが、どんなケースでも「誰がその1コピーを定義したの？」顕微鏡を覗いて数えたの？」という疑問が生ずる為、リアルタイムPCRの定量の世界では“いわゆる”

検体	→	RNA	→	cDNA	→	PCR産物
検体調製		核酸抽出		逆転写反応		PCR増幅
<input type="checkbox"/> 調製方法		<input type="checkbox"/> 抽出方法		<input type="checkbox"/> 効率		<input type="checkbox"/> 効率
<input type="checkbox"/> 保存方法		<input type="checkbox"/> 精製度		<input type="checkbox"/> 酶素の種類		<input type="checkbox"/> 抽出方法
		<input type="checkbox"/> 保存方法				<input type="checkbox"/> アッセイの直線性

図1 ●RT-PCRに影響するファクター

絶対定量は難しいと考えるのが妥当であると思われます。もし数えられるのであれば、皆さん数えますよね！数えられない、もしくは見えないので、増幅をかけて見えるようにしたり、数えられるようにしているのですから。

遺伝子発現の相対定量法について教えて下さい

遺伝子発現定量では検体濃度の絶対的数値は重要ではありません。ノーザンブロッティング法など従来の技術では、全細胞内で比較的安定して発現しているハウスキーピング遺伝子の転写物であるリファレンスに対し標的遺伝子量を比率で表し、これを複数の検体間で比較します。同一のコンセプトがリアルタイムPCRを使用した定量法にも適用できます。それでは、どのように計算すればよいのでしょうか？まずはそれぞれの遺伝子について既知濃度（実際は前述の通り、その数値自体には意味がなくてもよい、つまり値は希釈倍率の逆数などで可）の外部スタンダードから作成された検量線に照らして各遺伝子量を求め、「標的遺伝子量／リファレンス遺伝子量」を計算するといった方法が最もオーソドックスです。

ところが既知濃度の外部スタンダードといつても簡単に手に入りませんし作成するのも面倒です。また、異なる実験間でのデータを比較する際、毎回安定した検量線を引くのは至難の業です。ここで、思い出して下さい。リアルタイムPCRにおける検量線とはいって何を意味していたのでしょうか？もし可能であれば、測定したい各検体について希釈系列を作成し、「検量線もどき」を作成し、「その検体群での平均的なPCR効率」を求めておけばよさそうに思えませんか（図2）？つまり、いろいろな意味での

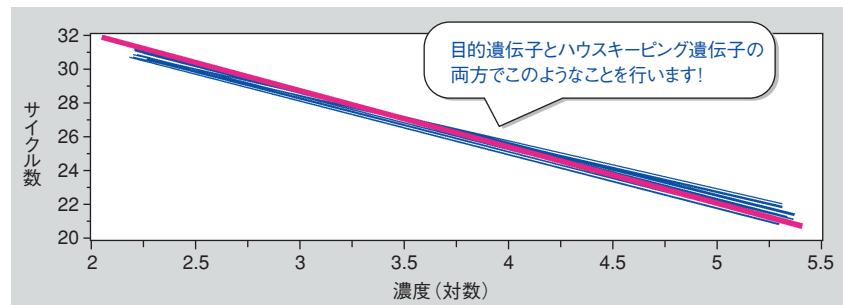


図2●複数のサンプルで“検量線もどき”を描いた時のイメージ図

誤差（実験間差、検体間差、日差、ヒト差など）を含んだ検量線（PCR効率）をあらかじめ引いておけば、毎回検量線を引く必要はないというわけです。

しかし、まだ外部スタンダードの入手については解決していません。お勧めなのは、その実験で測定したいリファレンス遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）と標的遺伝子を両方発現しているような不死化セルラインから抽出した核酸の使用です。これはキャリブレータと呼ばれ、一定の尺度を提示することにより最終結果を標準化するために使用される一種の「陽性サンプル」と定義できます。キャリブレータは標的、リファレンス遺伝子の検出間の一定の差異（例えば蛍光プローブのアニーリング効率、標識蛍光物質

バッチのロット間差やFRET効率）を補正してくれます。難しくなってきましたが、とにかくキャリブレータは簡単かつ大量に手に入りますし、cDNAにしておけば保存も比較的簡単です。このキャリブレータを使用して、前述のようにいろいろな意味で検体数（n数）をかせいで、各遺伝子について検量線を作成し平均的なPCR効率を求めておけば、後は毎回の実験に自分が基準とする濃度のキャリブレータを入れて実験を行い、そのキャリブレータ換算で「何個分の発現」といったような表現が可能となります。また共同実験者にそのキャリブレータを提供すれば、同じ尺度で計算された値、つまり場所が違っても比較可能なデータを得ることが可能となります。

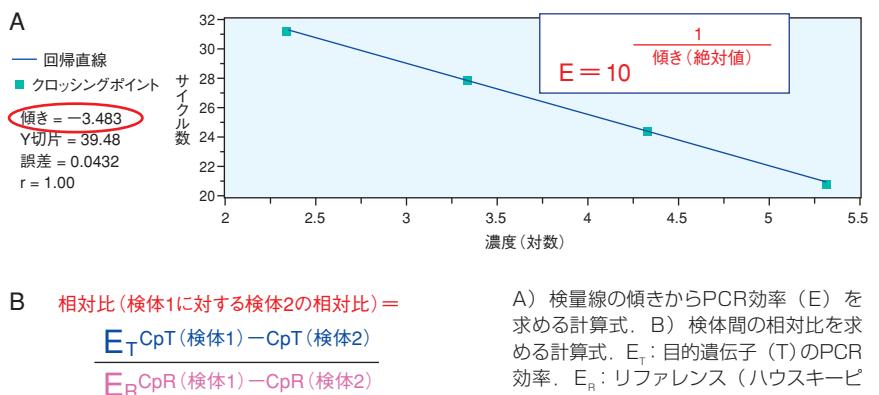


図3●PCR効率の求め方および相対定量の計算法

A) 検量線の傾きからPCR効率（E）を求める計算式。B) 検体間の相対比を求める計算式。E_T：目的遺伝子（T）のPCR効率。E_R：リファレンス（ハウスキーピング）遺伝子（R）のPCR効率

キャリブレータは必ずしも不活性セルラインから抽出した核酸である必要はありません。高発現している検体が手に入ればそれを使用すればよいですし、ようは「相対定量において何か基準（モノサシ）を決めましょう！」ということなのです。実際にはすべての検体を適量入手することは困難ですし、キャリブレータから求められるPCR効率はキャリブレータのPCR効率に過ぎません。すべては常に、少しでもリアルワールドに近づけようという努力の一端であることを忘れてはいけません。

実際の計算はどのようにするのでしょうか

まず検量線からPCR効率を求める方法を図3-Aに示します。LightCycler®のソフトウェアで表示される検量線の傾きはグラフの軸の取り方から「10倍になるのに何サイクルかかるか？」というサイクル

数を示しています。したがって傾きの絶対値が3.32であればPCR効率は約2、つまり1サイクルで2倍に増えていることになります。

次に、相対定量の計算の仕方を示します（図3-B）。一見して非常にややこしく見えますが、よく式を味わってみて下さい。2つの検体間（大きく分母分子間）で、各検体の「標的遺伝子の差異/リファレンス遺伝子の差異」（小さな分母分子間）を計算しているといった単純なものです。Cp値の差異とPCR効率がわかっていていれば計算できるという原点に返ってこの式を眺めてみて下さい。

おわりに

リアルタイムPCRについてその方法論が記載された参考書は意外に見当たりません。また学術論文では、本当は知りたい計算方法などが「Methods」の項に詳しく記載されないといった現状があります。しかし、複雑で直感的に理解しにくい部分もありますが、逆にそれほどトリッキーでもないよう思います。また機会がありましたら、その他の事項についても紹介できればと思います。

参考文献

- 1) Richie, S. et al.: Clinical Cancer Res., 7: 3423-3429, 2001



小林五月 (Satsuki Kobayashi)

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 AS事業部（研究用試薬・機器）ジエノミクス・システムグループ マネージャーPh.D. LightCycler®システムをはじめ、研究用機器、システム試薬の日本における製品学術、マーケティングを担当。

お問い合わせ: E-Mail : Tokyo.biochemicals@roche.com

URL : <http://www.roche-biochem.jp>

リアルタイム定量PCRを見直してみませんか？

真実に補正はいらない…



LightCycler® 480 システム

- 最高の正確性、スピード、再現性、汎用性
- 384/96スループットに適応（プレートタイプ）
- エッジ効果を排除
- 画期的なサーマルブロックデザイン
- 優れた光学システム

いますぐアクセスを!!

<http://www.universalprobelibrary.com>

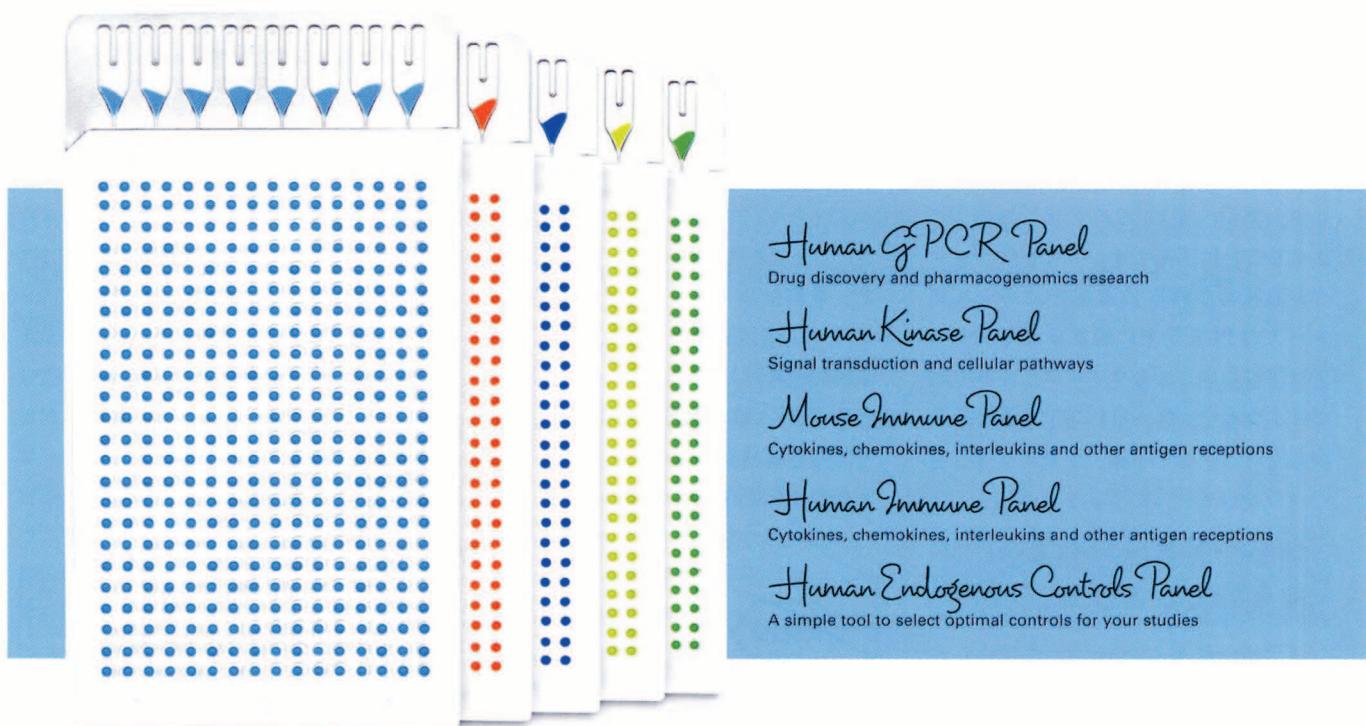


Universal ProbeLibrary

- 165種類のプレバリデートされた加水分解プローブ
- ヒトを始め7種の生物種のほぼ全ての転写産物を定量可能
- ネット上の専用ProbeFinderソフトウェア（無料）で、プライマーの設計と、適切なプローブの検索が可能

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

New! TaqMan® Low Density Array Gene Signature Panels



Real TaqMan® Assay performance in a real easy format

リアルタイム PCR TaqMan® アッセイがとても便利でお求めやすいカードフォーマットでご利用いただけるようになりました。TaqMan® Low Density Array ジーンシグネチャーパネルは、研究用途ごとに厳選された TaqMan® アッセイが 384 ウェルフォーマットのカードに装填されています。同時に 96 ~ 380 の遺伝子を定量できるので、重要な遺伝子群を対象にしたスクリーニングで威力を発揮します。40,000 以上のラインナップをほこる TaqMan® Gene Expression Assays からお好みのアッセイを選択して、オリジナルパネルを作り上げることも可能です。もう、高価な分注ロボットも煩わしいピッティングも必要ありません。

詳しくは <http://www.appliedbiosystems.co.jp> をご覧ください。



アプライドバイオシステムズジャパン株式会社

本社：〒104-0032 東京都中央区八丁堀 4-5-4

TEL.03(5566)6100 FAX. 03(5566)6501

大阪：〒564-0052 大阪府吹田市広芝町 10-28

TEL.06(6389)1201 FAX. 06(6389)1206



*研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

Notice to Purchaser This product is a Licensed Probe. Its use with an Authorized Core Kit and Authorized Thermal Cycler provides a license for the purchaser's own internal research under the 5' nuclease patents and basic PCR patents of Roche Molecular Systems, Inc. and F Hoffmann-La Roche Ltd. No real-time apparatus or system patent rights or any other patent rights owned by Applera Corporation, and no rights for any other application, including any in vitro diagnostic application under patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F Hoffmann-La Roche Ltd claiming homogeneous or real-time amplification and detection methods, are conveyed expressly, by implication or by estoppel. Applied Biosystems and AB (Design) are registered trademarks and Applera is a trademark of Applera Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.

© 2006 Applied Biosystems. All rights reserved. Micro Fluidic Card developed in collaboration with 3M Company.

インタビュー

トータルプロデュースでリアルタイムPCRをより確実なものに

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社 杉本 光
アンビオン株式会社 阿部 誠

FASTリアルタイムPCRという言葉を生み出し、発現プロファイリングの分野で研究者の要望に応え続けてきた Applied Biosystems社。同社はRNA研究分野で革新的な製品を提供しているAmbion社と合併し、サンプル調製から検出解析までのトータルプロデュースをさらに加速させている。（編集部）

リアルタイムPCRの普及のために

リアルタイムPCRを用いた研究の現状をどうお考えですか？

現在、リアルタイムPCRを使用されている研究者は増えていますが、間違えた理解をされている方も少なくないようです。当社のHP上では「今だからこそリアルタイムPCR」と題したオンラインマガジンを連載しているのですが（図1）、この閲覧者数が非常に多く、基礎的な知識を求めている方が我々の予想以上に多いようです。もっとリアルタイムPCRを理解していただけるよう努力することの必要性を感じています。

具体的な取り組みとしては？

機器の性能やコストというハード面だけに着目するのではなく、サポート面の充実が非常に重要だと考えています。もちろん機器の性能には自信をもっていますが、実験系の構築の工程で結果が左右されることも事実です。そこで当社では、正しいデータを得るために最も大切な実験系構築のサポートに力を入れてきました。今日ではプライマーの設計も必要な環境になりましたが、ハードとソフト、両面でのサポート体制をもっと充実させることで、リアルタイムPCRを初めて行う人でも必ず結果が出せるようなソリューションを提供しています。

もはやマイクロアレイはいらない

では、御社製品のTLDAについてお聞かせください

1つの遺伝子を追いかけるのではなく、複数の遺伝子を捉え網羅的に解析をすることが大切であるとわれわれは考えています。そしてこのような立場で開発した究極の技術がTLDA（Taqman® Low Density Array）です（図2）。

TLDAは複数のサンプルに対して数十から数百の遺伝子の発現を同時に解析できるリアルタイムPCRのカスタムアレイで、マイクロアレイがもつ網羅性とリアルタイムPCRがもつ定量性という、相反する2つの強みを併せもつことに成功した製品といえます。現在のところ定量性のあるカスタムアレイはTLDA以外に存在しません。実際にかなりの研究者の方から注目いただいており、今後は診断への応用を目指した臨床研究においても貢献できるものと期待しております（ユーザーVoice）。

再現性に関してはどうでしょうか？

もともと再現性に強みをもつTaqMan® プローブを採用しているので、マイクロアレイとは比べ物にならない優れた再現性を有しています。また少ないピペッティング操作でセットアップできるため誤差を抑えられ、試薬代・時間ともに節約

できます。相対定量ソフトウェアを搭載しており、このようにハード面だけではなく、実験操作・解析の労力を軽減することで本当の意味でのFAST PCRを実現しています。

拡大するRNA研究への貢献

TaqMan® microRNA Assaysとはどのような製品でしょうか？

TaqMan® プローブがもつ1塩基単位で鑄型を区別する高い認識特異性に注目して開発したアプリケーションの1つです。これにより非常に近似した配列をもつmiRNA遺伝子の発現解析を行うことができます。現在、Applied Biosystemsでは論文で発表されているほとんどのmiRNAのリストをもっているので、miRNAを研究しているすべての研究者にお使いいただける製品です。

Applied Biosystems社とAmbion社の統合によって、どのようなことが期待されますか？

RNAベースの研究用試薬で業界をリードしているAmbion社との統合により、RNA抽出などのサンプル調製の段階からソリューションを提供することが可能となりました。

特に、非常に小さなmiRNAの定量では、抽出というファーストステップが最も重



図1●アプライドバイオシステムズジャパンのホームページで連載中のオンラインマガジン

リアルタイムPCRの基本原理からアプリケーションまでをわかりやすく解説している (<http://www.appliedbiosystems.co.jp/>)

要です。かつてmiRNAのような200bp以下の分子はゴミと見なされ、カラムを使った抽出方法で回収できないことも、それで良しとされていました。Ambion社ではこの問題を解決するために、10bpのRNAも効率的に回収できる抽出・精製キットを販売しています。

siRNAに関してはどうでしょうか？

品質管理には絶対の自信をもっています。強制発現した細胞の中でsiRNAの効率を測っているところが多くありますが、Ambion社では内在性遺伝子のノックダウンを81%という高い効率で維持しています。

ユーザーVoice

大阪大学医学系研究科眼科学視覚科学教室 橋田徳康先生

マイクロアレイは有用なツールですが、情報量が膨大すぎて臨床には不向きです。臨床で使うには数を絞り込んだ50から100くらいの遺伝子が適当なのですが、そのスケールで正確に解析するツールがこれまではありませんでした。

しかしTLDAはこの問題を解決しました。実際にTLDAを用いることによりマイクロアレイの結果を再現性良く確認することができました。TLDAによる発現解析の結果が、今後新しい診断法・治療法の開発につながるものと期待しています。



図2●Taqman® Low Density Array (TLDA)

8回のピッティング操作で384ウェル分注できる特徴的なデザイン。反応容量は1ウェルあたり2μl以下と少ないため、cDNA量が少ない場合にも有効だ

最近、目的以外の遺伝子にもRNAiが起きるという問題点があげられています

その点においても抽出・濃縮といった技術がとても重要です。化学修飾によって影響を抑えるといった方法もありますが、それでは完璧ではありません。大事なことはsiRNAをより低濃度で使用することです。100~200nmolという高濃度で使用すると、どうしても目的のもの以外もノックダウンされ、インターフェロン応答も出てきてしまいます。また、どれだけ良い配列をもっているかというのも重要です。Ambion社ではNCBIのデータに基づいたほぼすべてのsiRNAのデータベースをもっています。低濃度で高効率の配列をもつsiRNA、これにより最適な結果を得ることができます。

しかし、そこまで気を付けてRNAiをコントロールしたとしても、検証結果が間違っていたら元も子もありません。そこでわれわれは、WEB上でAmbion社のものもsiRNAのデータベースとApplied BiosystemsのTaqMan®プローブのデータベースを双方向にリンクさせ、RNAi効果をリアルタイムPCRで検証する際にどのプローブを使えばよいかを簡単に探せるようにし、データ検証の面でのサポー

トにも対応しています。

おわりに

1996年に弊社がリアルタイムPCRを開発して10年になりますが、この間に技術の進歩もあり、より高性能で使いやすく、かつお求めやすいシステムになりました。Applied Biosystemsはこれまででも研究者のニーズに応えたソリューションを提案し続けてきましたが、このたびAmbion社の優れた商品群が加わったことで真の意味でのトータルソリューションに近づきました。今後も先進の技術と皆様に満足いただけるサポートを通じてリアルタイムPCRを普及させていきたいと考えています。

AB Applied Biosystems

アプライドバイオシステムズジャパン
株式会社
テクニカルサービス部
〒104-0022
東京都中央区八丁堀4-5-4
TEL: 03-5566-6100
FAX: 03-5566-6501

リアルタイムPCRの遺伝子発現解析をより正確に行うために

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社 副島正年, 井口潤一

リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析では、プライマーデザインやテンプレートとなるRNAの量などが実験の正確性や再現性を上げる鍵です。しかしこの他にも実験のうえで見落とされがちなものを含め、良い研究成果を得るために考慮すべき点がいくつかあります。ここでは相対的定量法を用いた発現解析の方法と、RNAの品質が発現解析に与える影響について紹介します。

相対的定量を用いた遺伝子発現解析

遺伝子発現量の測定は、基礎研究から臨床まで広範囲に利用されています。特にサンプル間の発現量の変化は、研究者の興味の対象としては大きいものではないでしょうか。リアルタイムPCRは発現量のサンプル間比較に最も適した手法であり、発現量を求めるための算出方法がいくつか開発されています。

ある特定の遺伝子の発現量をサンプル間で比較する場合、絶対的な量を調べる必要はないので、通常は相対値で示すことになります。また相対的定量では、サンプル間で発現量が一定とされているハウスキーピング遺伝子をリファレンスと

して、その発現量を基準としてサンプル間での標的遺伝子の発現量比を求めます。相対的定量にはいくつかの手法がありますが、まずは検量線を用いた算出方法を示します。

検量線を用いた相対的定量

目的の遺伝子とハウスキーピング遺伝子それぞれでスタンダードとして既知量のcDNAやプラスミドなどを用意します。それらのスタンダードを用いて検量線を作成します。検量線からサンプルごとに標的遺伝子とハウスキーピング遺伝子の相当量を求め、サンプル間の実験誤差をハウスキーピング遺伝子の発現量を基準にNormalization（規格化）して、標的遺伝子の相対的な発現量比を算出します。検量線を用いるメリットとしては、

毎回PCRが正常に実行されていることが確認できることですが、デメリットとしては毎回検量線のためにスタンダードを用意する必要があります。スタンダードにある程度のウェルを必要とするので、同時に測定できるサンプル数が制限されてしまいます。

比較Ct法 (Livak法)

遺伝子発現解析の相対的定量で、Livak法は広く用いられており、Ct (Threshold Cycle) 値だけをもとにすることで、スタンダードを毎回用意する必要がなく実施が容易です。ただしこの方法では、標的遺伝子およびハウスキーピング遺伝子はPCR增幅効率がそれぞれ5%の誤差内で、それぞれほぼ100%であることを前提としています。Livak法を適用する前には、必ず標的遺伝子とハウスキーピング遺伝子の增幅効率がほぼ100%に近似していることを確認しておく必要があります。

比較Ct法 (Pfaffl法とVandesompele法)

相対的定量を算定するためのLivak法は、標的遺伝子とハウスキーピング遺伝子の増幅効率が近似している場合のみ、有効となります。増幅効率が近似していない場合、検量線法を用いるか、Livak法とは別の方法を用いなければなりません。Pfaffl法は標的遺伝子とハウスキーピング遺伝子の増幅効率を加味して算出することができるので、より正確な相対的定量結果を得ること

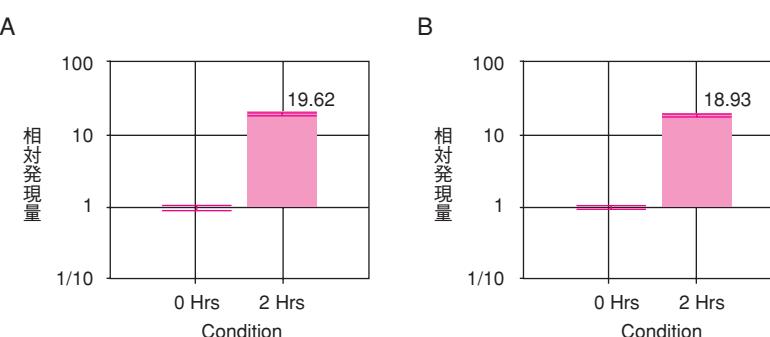


図1●Livak法とPfaffl法による結果比較

ヒト培養細胞に対して薬剤処理を行い、コントロール0時間と処理2時間後のチューブリン遺伝子発現量比をLivak法（A）とPfaffl法（B）にて算出しました。ハウスキーピング遺伝子としては β -アクチン遺伝子をリファレンスとしています。Pfaffl法で適用したチューブリン遺伝子の増幅効率は98.4%， β -アクチン遺伝子の増幅効率は96.9%でした。0時間を1とした場合の処理2時間後の発現量比はLivak法では19.62でしたが、PCR増幅効率を加味した算出方法のPfaffl法では18.93でした。

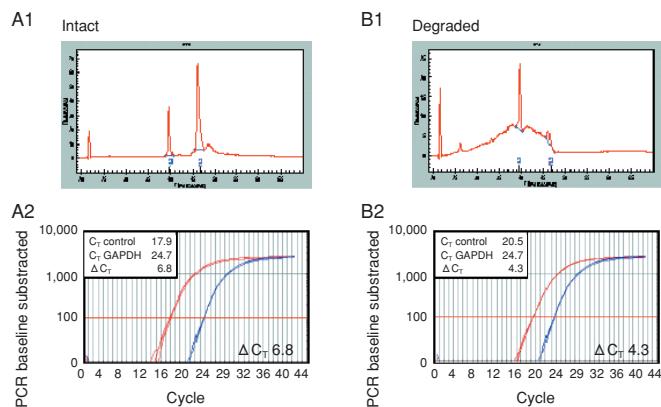


図2●リアルタイムPCRにおけるRNAサンプルの品質による影響

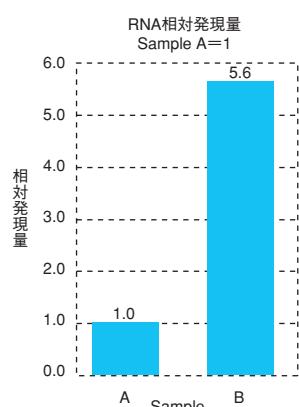


図3●比較Ct法による相対定量

ができます（図1）¹⁾。

またPfaffl法を改良したVandesompele法は、複数のハウスキーピング遺伝子をリファレンスとして利用することができます。1つのハウスキーピング遺伝子のみをリファレンスした場合と比べて、より安定した定量結果となります²⁾。バイオ・ラッドのiQ5リアルタイムPCR解析システムの解析ソフトウェアはVandesompele法を採用していますので、毎回検量線を設定する必要もなく、簡便かつより正確なデータ解析が可能です。

RNAの品質がリアルタイムPCRに与える影響

リアルタイムPCRを用いた遺伝子発現解析では、抽出されたRNAの量と質が実験の再現性（データのばらつき）に大きな影響を与えます。RNAサンプルに問題があると、最悪の場合には間違った結論が導き出される可能性があります。一般的には抽出されたRNAは分光光度計にてA₂₆₀とA₂₆₀/A₂₈₀の比を測定し濃度・精製度が確認されます。これに対してRNAの「品質」、つまりRNAが分解しているか否かをPCRの前に確認することは少ないようです。

RNAの品質がリアルタイムPCRにどのような影響を与えるかを確認するために下記の実験を行いました。

サンプルとしてGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) に特異的なsiRNAとネガティブコントロールとして特定の遺伝子の発現を抑制しないsiRNA (scrambled control) が導入されたHeLa細胞からRNAを抽出しました。このうちコントロールのsiRNAを導入した細胞から抽出されたRNAの一部を比較のために熱をかけて分解させています。RNA品質確認用の電気泳動は弊社ラボチップ型全自動電気泳動システムExperionを用いて行いました。Experionは1 μ lのRNAサンプルを有機溶媒など使うことなく泳動～解析まで自動で行う装置です。図2-A1は完全なRNAをExperionで電気泳動したElectropherogramで18S rRNA（中央左）、28S rRNA（中央右）にシャープなピークが見られ、完全なRNAであることを示しています。一方、図2-B1は部分的に分解したRNAのElectropherogramです。28Sのピークが埋没しており、分解が進んでいることを示しています。A1・B1で分析されたサンプルをリアルタイムPCRにかけた結果を図2-A2とB2に示します。図2-A2は分解していないRNAサンプルでの増幅曲線です。この時のGAPDHとControlとのCtの差である Δ Ct値は6.8でした。これに対し、コントロールの細胞からとったRNAが分解していた場合の増幅曲線が図2-B2です。RNAの分解によりコントロールのCt値が大き

くなり、 Δ Ct値は4.3でした。この違いをより直感的にご理解頂くために、両方を比較Ct法による発現量をグラフ化したものを図3に示します。本来、全く同じサンプルを測定していますので同じ数値になるはずですが、Aの発現量1に対してBでは5.66倍もの大きな差（ばらつき）がでています。サンプルRNAが分解しているだけで、得られる相対定量値に大きな影響を与えます。

このようにRNAの品質をチェックすることは、遺伝子発現解析データの信頼性・再現性を今までよりも大きく向上させることにつながります。

参考文献

- Michael, W.: Nucleic Acids Research, 29 : 45, 2001
- Vandesompele, J. et al.: Genome Biology, 3 : 11, 2002

BIO-RAD

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
ライフサイエンス事業本部
〒116-0014
東京都荒川区東日暮里5-7-18コスモパークビル
TEL : 03-5811-6271
FAX : 03-5811-6272
<http://discover.bio-rad.co.jp>

RNA実験の新たなスタンダード法

ラボチップ型全自动電気泳動システム

ExperionTM

遺伝子発現解析ワークフロー

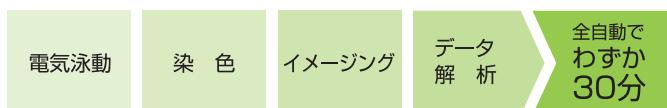


RNAサンプル、分解していませんか？

吸光度の測定では、タンパク質などのコンタミネーションをチェックすることはできますが、RNAの分解の度合いを確認することはできません。再現性、信頼性の高いデータを出すためには、電気泳動でRNAが分解していないことをチェックする必要があります。

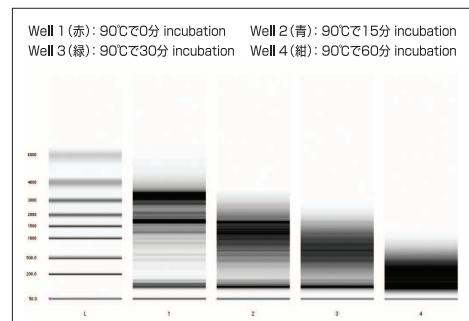
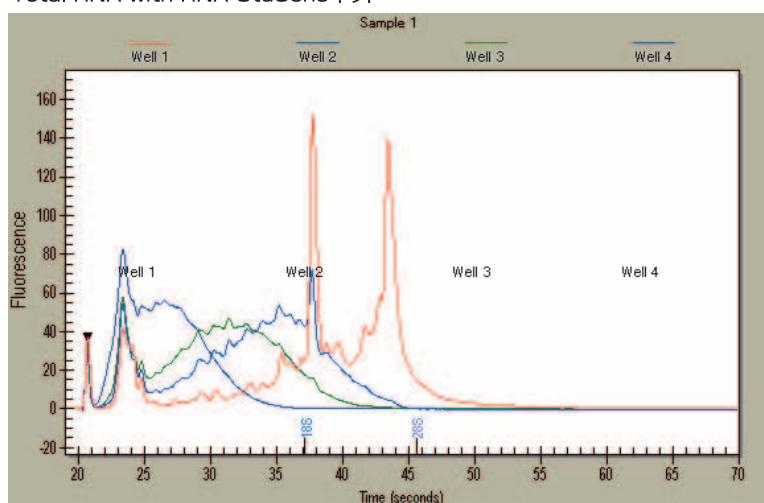
電気泳動に時間と手間をかけていませんか？

高速、全自动の電気泳動システムExperionは、皆様の研究をさらに加速させます。



- 分離から検出、解析までが全自动でわずか30分
- RNAの濃度やrRNA比などを自动で算出
- サンプルはわずか1 μ lのみ
- 電気泳動中のRNaseによる分解の心配なし
- 有機溶媒、危険物の取扱いが不要

Total RNA with RNA StdSensキット



RNAサンプルの分解の度合いをチェックした例
エレクトロフェログラム(左)
ゲルView(右)

バイオ・ラッドはRNAの抽出から定量解析まで、遺伝子発現解析を行う上で必要な様々な製品とアプリケーション情報をご提供します。

Visit us on the Web at Discover.bio-rad.co.jp

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス事業本部 116-0014 東京都荒川区東日暮里5-7-18

TEL : 03-5811-6270 FAX : 03-5811-6272

BIO-RAD

リアルタイムPCR法の新技術で 信頼性の高いデータを得る

インビトロジェン株式会社 神田東作

リアルタイムPCR法の2つの主要な方法であるインターカレーター法と蛍光プライマー法各々の代表的方法であるSYBR® Green I 法とTaqman®法には限界がありました。ここに紹介するSYBR® GreenER™はSYBR® Green I よりPCR反応への阻害も少なく蛍光も強く、また最適化されたバッファー系は特異性を高めます。また蛍光プライマー法のD-LUX™ (Select) 法はTaqman®法と違って融解曲線分析ができ、構成がよりシンプルです。信頼性のより高いデータを得るために、これらの新技術をここに紹介します。

SYBR® Green I に代わる新色素SYBR® GreenER™

SYBR® Green I の濃度が低すぎるとリアルタイムPCRの感度が制限されますが、逆にSYBR® Green I の濃度が高すぎるとPCR反応が阻害されてしまいます。そのためSYBR® Green I を用いた他社製品では決定できないターゲットがありましたが、弊社の新色素SYBR® GreenER™はPCR反応への阻害も少なく蛍光も強いので、8ターゲットすべてのCt値^{※1}を決定できました（表）。Ct値もSYBR® Green I と比べ約2サイクル早く高感度でした。マニュアルには約10コピーのターゲットを検出するとありますが、1コピーの特定のターゲットも96%以上という高

い再現性で検出できたという実績があります。その一方、高濃度のターゲットでも增幅プロットは等間隔で（図1）、広いダイナミックレンジをもちます。

評価上問題になる非特異的增幅は融解曲線分析^{※2}により検出できますが、SYBR® GreenER™ qPCR SuperMixではバッファー系を最適化することにより、非特異的産物の形成を最小化しているので（図2）、データの信頼性が格段に向上しています。

スペクトル特性はSYBR® Green I とほとんど同一なので、機器やフィルターの設定を変える必要はありません。

SYBR® GreenER™ qPCR SuperMixは、4°Cで長期保存できるのも魅力です。さまざまな機器に対応したキットがあります。

Taqman®プローブ法に代わる蛍光プライマー D-LUX™ Select (進化したLUX™プライマー)法

SYBR® Greenと違い蛍光プライマーは配列特異的でマルチプレックス検出もできます。有名なTaqman®プローブ法では融解曲線分析ができませんが、LUX™プライマー法ではできます（図3）。Taqman®プローブ法では1対のプライマーに加えて二重標識プローブが必要ですが、LUX™プライマーは1対のプライマーで済みます（図4）。LUX™プライマーでは、付加させた相補鎖によりヘアピンを形成すると、標識した蛍光が相補鎖により消光されますが、PCR産物に組み込まれると消光が解かれ、

表●SYBR Green® I を用いた他社製品より、SYBR® GreenER™を用いたキットはCt値が小さく高感度

	遺伝子名	インプット量	SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix	A社 A製品	B社 I製品	E社 Q製品	S1社 S製品	S2社 B製品
ゲノムDNA	AMPD	50pg	27.3	29.1	28.7	30.0	28.1	27.6
	β-actin	50pg	27.5	Not determined	32.0	31.7	29.9	29.9
	OXTR	1ng	29.6	Not determined	Not determined	Not determined	35.6	Not determined
	DMPK	50pg	31.2	Not determined	36.3	33.9	33.7	35.6
cDNA	ODC	100pg	25	28.8	26.5	26.9	25.9	25.7
	VEGF	100pg	27.7	Not determined	28.8	30.7	30.8	27.9
	IL-8	100pg	30.5	32.3	31.4	30.8	30.2	31.4
	SDHA	100pg	27.2	28.9	28	27.8	Not determined	27.7
決定できたPositiveなCt値			8中8	8中4	8中7	8中7	8中7	8中7
SYBR® GreenER™に対するCt値の遅れの平均				2.3	2.2	2.2	2.1	1.3

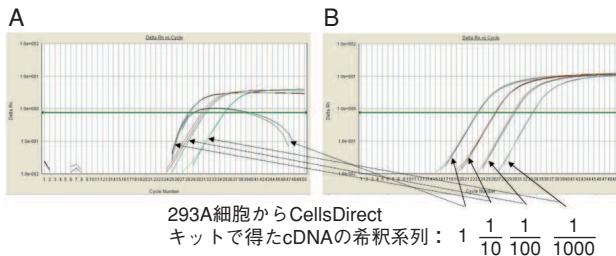


図1●高濃度での増幅プロットも等間隔

A) SYBR[®] Green I qPCRキットでは最高濃度（1希釈のサンプルに対し、上向きに弧を描いたもの）が見られたB) SYBR[®] Green ER[™] qPCRキットでは等間隔であった

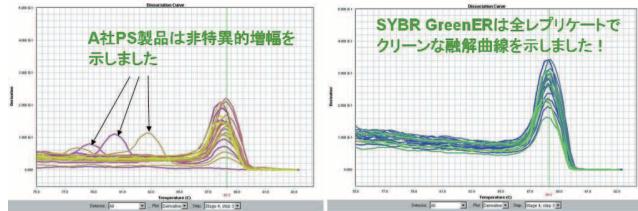
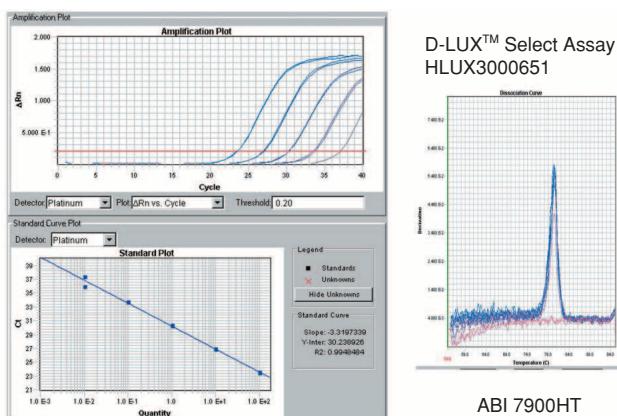
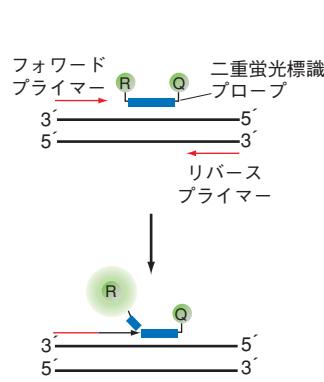
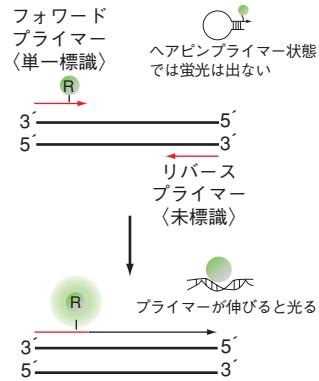


図2●新しく最適化したバッファーにより、PCR反応の特異性が向上

図3●D-LUX[™] Select法で増幅プロットも融解曲線も良好TaqMan[®]検出LUX[™]検出図4●Taqman[®]プローブ法とLUX[™]プライマー法の比較

蛍光が増大します。

さらに改良されたD-LUX[™] Designer（進化したLUX[™]プライマー）では、チミン塩基だけでなくシトシン塩基も蛍光標識できるようになったため、相補側のグアニン塩基により強く消光でき、設計の自由度も上がりました。さらに効果確認済みのCertified LUX[™]データに

よりアルゴリズムが格段によくなりました。D-LUX[™] Select法では遺伝子名ごとに最高候補が1~3セットしか表示されないので選択が簡単です。D-LUX[™] Select法の良好な結果をご覧ください（図3）。

ヒト、マウス、ラット用に13万種あります。ヒットのないものや他の生物

種に対してはD-LUX[™] Designerでデザインできます。

*1 : Ct値

増幅曲線で閾値を蛍光が通過するサイクル数。Ct値が低いほど対象が多量であることを示す。

*2 : 融解曲線分析

反応後のPCR産物を熱処理、解離し、その後冷却し、アニールする。その間の蛍光をモニタリングする。非特異な産物が含まれると複数のピークが生じるので、産物の特異性を確認することができる。

 **invitrogen[™]**
神田東作 (Tousaku Kanda)

インビトロジエン株式会社
テクニカルサービス部
〒108-0022
東京都港区海岸3-9-15 LOOP-Xビル
TEL: 03-5730-6511
FAX: 03-5730-6520

Thermal Cycler Dice™ Real Time SystemによるO157ベロ毒素遺伝子の迅速検出 ～食品からの腸管出血性大腸菌O157およびO26の検査法～

タカラバイオ株式会社 吉崎美和，中筋 愛

タカラバイオ株式会社では、Perfect Real TimeシリーズとしてリアルタイムPCR用試薬やプライマーなどを販売していますが、新たに96ウェルプレート対応のリアルタイムPCR装置Thermal Cycler Dice™ Real Time Systemを発売開始しました。本稿では、Thermal Cycler Dice™ Real Time Systemの優れた性能と、O157など腸管出血性大腸菌（EHEC）食中毒の原因遺伝子（ベロ毒素遺伝子：VT1/VT2遺伝子）を、サイクリングプローブ法を用いてリアルタイムPCRで検出する方法を紹介します。

リアルタイムPCR装置の新星登場

Thermal Cycler Dice™ Real Time Systemは、タカラバイオ社が今春より発売を開始したリアルタイムPCR装置で、コンパクトで低価格ながら非常に高い性能を実現しています。加熱冷却システムにはペルチェ素子を使用し、検出には上方から同時測定するカメラ撮影方式を採用しているため、反応・検出において96ウェル間で高い均一性が得られます。また、出荷時には、1台1台の装置につい

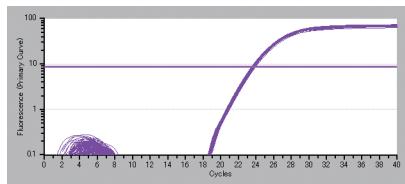


図1●96ウェル間の均一性

96ウェルすべてで同一の反応を行い、Threshold Cycle (Ct値) の変動係数 (%CV) を求めることで、全ウェルでの反応および検出における優れた均一性を確認しました (N=96)。錆型：入DNA 500 fg、試薬：SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) [製品コード RR041A/B]、平均Ct値=23.6、標準偏差=0.0931、変動係数 (%CV) = 0.39

てリアルタイムPCRによる精度試験を行っています（図1）。

高い解析精度を提供

性能の高い試薬と組み合わせることで、2倍の濃度差を確実に検出する高精

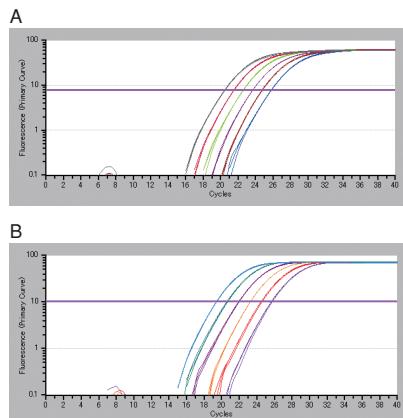


図2●2倍の濃度差の検出

cDNAの2倍希釈系列（6段階）を作製し、2倍の濃度差の検出を確認しました (N=3)。
A) SYBR® Green Iでの検出。錆型：マウス total RNA 312.5pg～10ng相当のcDNA。
ターゲット：Gapd遺伝子。B) サイクリングプローブでの検出。錆型：ヒト total RNA 312.5pg～10ng相当のcDNA。ターゲット：CYP2E1遺伝子

度なリアルタイムPCR解析が可能です。図2では、当社のSYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) を用いたSYBR® Green I 検出ならびに CycleavePCR® Core Kitを用いたサイクリングプローブ検出での2倍差の検出例を示しています。

サイクリングプローブ法

サイクリングプローブとはDNAとRNAからなるキメラプローブで（図3）、非常に特異性の高い検出が可能であり、SNP解析やファミリー遺伝子の発現解析などできわめて有効な手法となります。

リアルタイムPCRは発現解析だけではなく、その迅速性とコンタミネーションリスクの低さを活かして、各種の検出実験にも広く利用されています。以下はその一例です。

サイクリングプローブを用いたVT遺伝子迅速検出の実施例

従来の腸管出血性大腸菌の検査方法は、培養法と血清型による検出と判定が中心であり、結果を得るまでにかなりの日数を要していましたが、リアルタイム

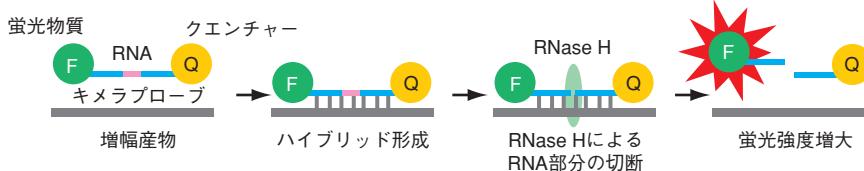


図3 サイクリングプローブ法の概略

PCRを使用することで迅速に検出することが可能となりました。腸管出血性大腸菌のペロ毒素遺伝子VT1/VT2を、当社のCycleavePCR® O-157 (VT gene) Screening Kitを用いてサイクリングプローブ法で検出した例を以下に紹介します。

●操作方法

牛挽肉増菌液^{*1}に純粹培養菌^{*2}を接種したサンプルを遠心し、得られた沈渣からDNA抽出試薬TaKaRa DEXPAT®を用いてDNA抽出を行いました。これを鋳型として、リアルタイムPCRに使用しました。

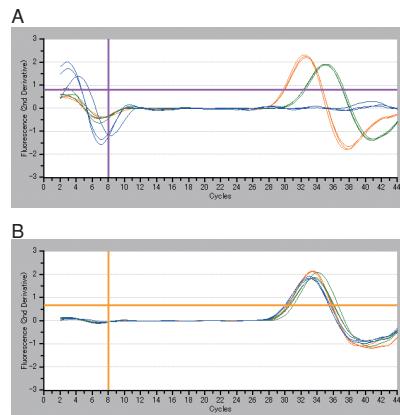
●PCRと判定

プロトコールに従ってリアルタイムPCRを行い、2nd Derivative Maximum法で増幅を確認しました。レポート結果のCt値表示から判定を行いました。

●検出結果

以上の結果より、VT1、VT2、VT1/2产生株において高感度にVT1/VT2遺伝子の検出が可能でした。また、反応所要時間は約1時間であり、迅速性においても優っていました。

なお、本キットでは、O157だけでなく、O26やO111など同じ毒素遺伝子(VT gene)をもつ菌もスクリーニングできます。



菌株	CFU/tube	VT検出(陽性) (N=3)	IC検出
O157 (VT1)	15	3/3	3/3
	1.5	3/3	3/3
	0.15	2/3	3/3
O157 (VT2)	13	3/3	3/3
	1.3	3/3	3/3
	0.13	0/3	3/3
O157 (VT1/2)	20	3/3	3/3
	2	3/3	3/3
	0.2	1/3	3/3
O26 (VT1)	14	3/3	3/3
	1.4	3/3	3/3
	0.14	0/3	3/3
O26 (VT1/2)	20	3/3	3/3
	2	3/3	3/3
	0.2	2/3	3/3

図4 サイクリングプローブ法の結果

A) VT遺伝子検出例 (FAM). B) Internal Control検出例 (ROX). C) 判定

終わりに

Thermal Cycler Dice™ Real Time Systemの性能や使い勝手の良さをお試しいただけるよう、実機を用いたデモンストレーションを承ります（ホームページからお申込いただけます）。

参考文献

- 1) タカラバイオ株式会社ホームページ <http://www.takara-bio.co.jp/>
- 2) 「検出と定量のコツ」(森山達哉／編), 実験医学別冊:羊土社, 2005

SYBRはMolecular Probes Inc.の登録商標です。

*1: 培地N+mECにて42℃で20時間培養したものです。

*2: 菌株をTSBにて37℃で18時間培養して菌数を測定したうえ、PBSで希釈系列を作製しました。



Thermal Cycler Dice™ Real Time System

タカラバイオ株式会社

吉崎美和 (Miwa Yoshizaki)
中筋 愛 (Ai Nakasuzi)

タカラバイオ株式会社
テクニカルサポートライン
〒520-2193
滋賀県大津市瀬田3丁目4-1
TEL: 077-543-6116
FAX: 077-543-1977
URL: <http://www.takara-bio.co.jp/>



Say “hello” to MixMate!

The all-around mixer for small volumes

17x23x13cm—わずかこれだけの大きさのミックスメイトが、様々なアプリケーションに対応します。

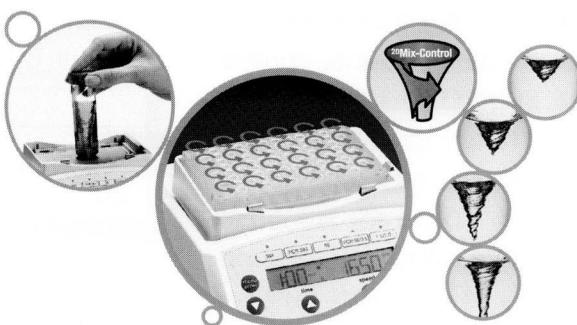
Product Features

- ミキシング、ボルテックスの機能があります。
- 0.5ml、1.5/2.0ml、PCRチューブ用の3種類のチューブホールダーが付属します。
- 384ウェルまでのPCR、MTP、DWPプレートをミキシングします。
- 自動で不均衡を検出します。
- デジタルディスプレイです。
- 非常に静かです(<50 dB(A))
- 独自の2D Mix-Control
 - 最適なミキシングを実現
 - こぼれにくいAnti-spill technology
- 色々なフォーマットに適したプログラムが予め設定されています。
- LCD 準拠しています。
- 2年間の保証付きです。

Application

- PCRの前処理ミキシング
- ペレットの再懸濁 (e.g., バクテリア, DNA, 細胞ペレット)
- 培養(e.g., ELISA assays)
- 比色法によるタンパク質の定量分析 (e.g., BCA, Lowry, Bradford)
- リポーター遺伝子解析(e.g., β -galactosidase, luciferase アッセイ)
- 制限酵素反応の前処理
- 様々なチューブでのボルテックス

ミックスメイト	
振動数 / ストローク	300 - 3,000 rpm / 3 mm
ボルテックス	3,500 rpm
ミキシング瞬間	15 s to 99.5 h; continuous
ノイズ	< 50 dB(A)
大きさ (WxDxH) / 重さ	17 x 23 x 13 cm / 4.2 kg
電源 / 電圧	100V 50-60 Hz / 40W



eppendorf
Japan

エッペンドルフ株式会社

本社 : Tel 03-5825-2361 · Fax 03-5825-2365

大阪 : Tel 06-6990-4821 · Fax 06-6990-4824

e-mail info@eppendorf.jp

home page <http://www.eppendorf.com/jp>

BIONEER

求めていたリアルタイムPCRシステムが、ここに。

ExiCycler™

ハイエンドスペックモデルが、
もっと身近になります。



5 multiplexing

5波長同時検出可能なので、様々な
アプリケーションに対応します。

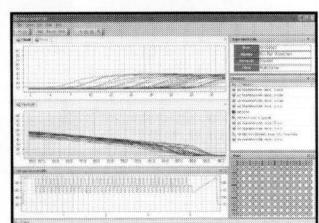
High-Throughput

96ウェル、グラジェント機能付き
サンプルブロックを搭載。



Accurate

光源を全ウェル均一に照射、全ウェル同時検出で、
ウェル間の差を抑制します。

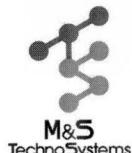


Easy-to-use Software

ユーザーフレンドリーなGUI採用のソフトウェアで、
運転中に過去のデータ解析も可能です。

*ノートPCでの使用が可能です。

株式会社 エムエステクノシステムズ



東日本: 〒162-0805 東京都新宿区矢来町113

TEL(03)3235-0673

西日本: 〒532-0005 大阪市淀川区三国本町2-12-4

TEL(06)6396-6616

e-mail: technosales@technosaurus.co.jp

URL: <http://www.technosaurus.co.jp/techno/>

