

## ■ リアルタイム PCR の予備実験

リアルタイム PCR がなかなかうまくいかない、という方の中には予備実験をされてない方が多くいらっしゃいます。実際に大量のサンプルをかける前に、下記のことをご確認ください。

<b>1. Total RNA の品質チェック</b>
<b>2. Standard Curve 解析</b>
☆ 定量可能範囲の決定
☆ 増幅効率と再現性のチェック
☆ No RT のチェック
以降のステップは SYBRGreen の実験系の方
☆ NTC(No template control)のチェック
<b>3. Dissociation Curve 解析</b>

### 1. Total RNA の品質チェック…「Total RNA 抽出の注意点」をご覧ください。

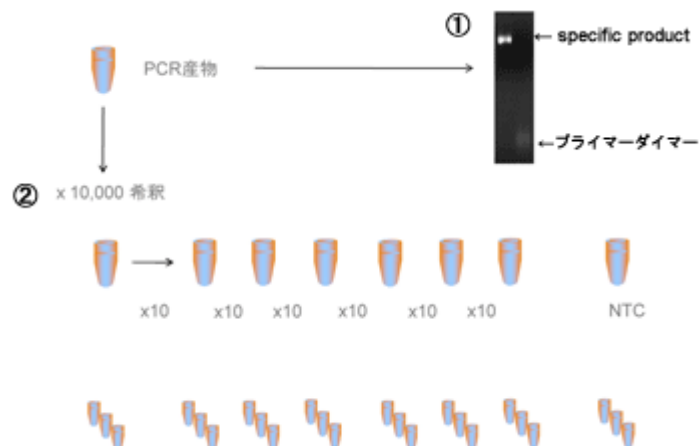
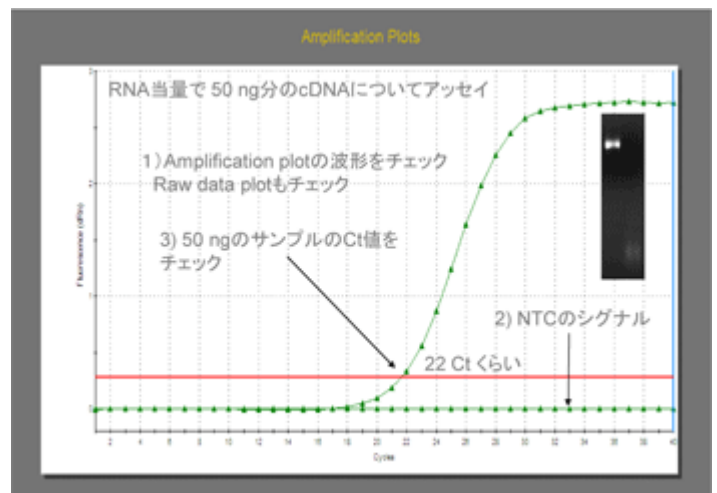
元々intactなRNAと壊れているRNAで発現の差をみようとしても、発現の差があるのか、壊れた結果の差なのか分かりません。毎回でなくて良いので、初めてその実験系をされる時は、その Total RNA 抽出の手技が大丈夫か確認するために、Total RNA の品質チェックを是非されて下さい。電気泳動では、すごく壊れている RNA はバンドのサイズが違うところにたくさん出てきて分かりますが、そこまででない RNA の壊れ具合は判別することができません。

### 2. Standard Curve 解析

プライマーごとに準備します。

- ・ cDNA (Total RNA 換算で) 50ng 1本
- ・ NTC(No template control) 1本
- ・ No RT\*1 1本

\*1 cDNA の元の RNA を逆転写する時、Reverse transcriptase(RT)を加えず、代わりに水を入れて他は全く同じように反応を行ったサンプルです。ゲノムが増幅されていないかの確認のために行います。



① 上記リアルタイム PCR でかけた PCR 産物を一部アガロースゲル電気泳動をし、非特異的なバンドがないか、プライマーダイマーがないかチェック。

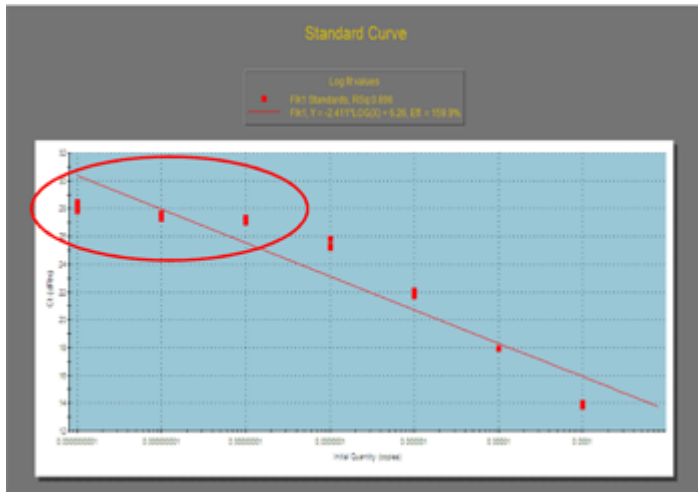
② またこの PCR 産物を 10,000 分の 1 希釈\*2、それを 1 として 10 倍希釈ずつ (トリプレケイト) したものをつくる。

③ ②に試薬を入れて、Standard Curve をかく。

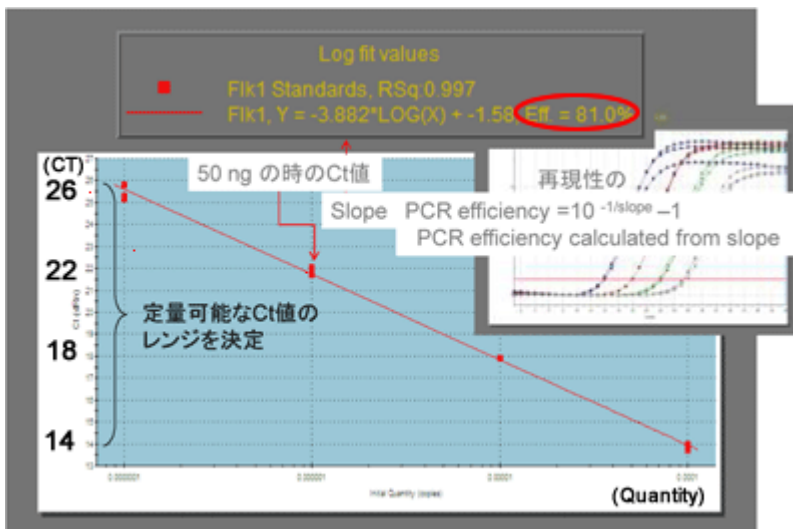
\*2 PCR をかけているのですごく濃いことと、SYBRGreen や Taq の蛍光色素を希釈するためです。

\* PCR 産物の希釈系列を作成中に水・マスターミックス・プライマーなどにコンタミを起こしやすいので、希釈系列の作成はそれらが無い場所で行う、またコンタミ防止用の UNG 仕様のマスターミックスを利用するなどして下さい。

③



赤く囲んでいるところは、Standard Curve に傾きがないので定量がありません。ここの部分を削除したものが下表になります。



☆ 定量可能範囲の決定

cDNA を 50ng 使用した時の CT 値は 22 でした。左表より、定量可能な Ct 値のレンジは 14ct~26ct の間であることが分ります。

CT 値	14	18	22	26
cDNA 量(ng)	5512	525	50	4.76

Efficiency は 81% です。(下図 1 )より ct 値 1 サイクルの差は初期濃度が 1.8 倍の差となります。

本番で使用する cDNA のおおよその目安になります。プライマーごとに検討していますので、サンプルの中には微量しか発現しないものもあると思います。ケース by ケースでお考え下さい。

**ΔΔCt method** Efficiency corrected method

$$\frac{\left(1 + 100\%\right)^{Ct(\text{Gene A}) - Ct(\text{Normalizer})}}{\left(1 + 100\%\right)^{Ct(\text{Gene A}) - Ct(\text{Normalizer})}}$$

$$= \frac{2^2}{2^1} = 2$$

☆ 増幅効率と再現性のチェック

PCRの増幅効率(Efficiency)を確認します。100%以下で安定した増幅効率(再度3回繰り返し実験を行って同様の結果が出る)であれば以降の実験はΔΔCt法で行うことができます。

← ΔΔCt法の『1Ctの差が初期濃度2倍の差』というのは増幅効率が100%で計算されています。実際の増幅効率を100%のところに入れてExcelで計算して下さい。

上記の計算ができるExcelファイルを支援センターで準備していますので必要な方は声かけて下さい。

増幅効率(Efficiency)	100%	90%	80%	70%
ΔCt	2	1.9	1.8	1.7
2	4	3.6	3.4	2.9
4	16	13	10.5	8
6	64	47	34	24
8	256	169	110	70
10	1024	613	357	201

(図1)

←増幅効率が違うとこんなにも初期濃度の差は変わってきます！

☆ No RT(逆転写反応なしのサンプル)のチェック

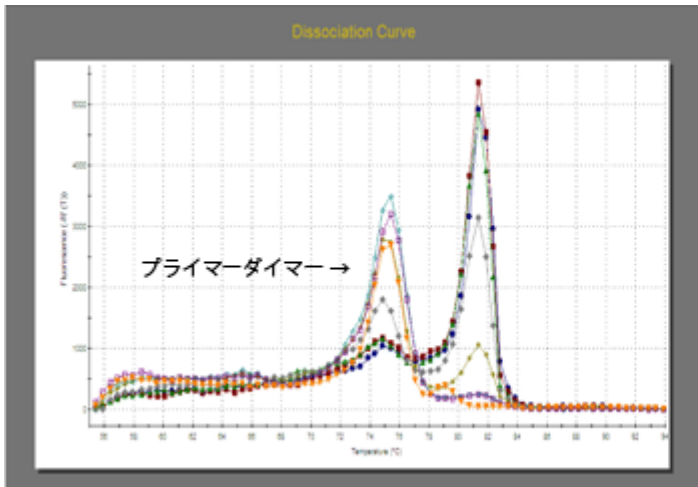
No RTでシグナルが出た場合、ゲノムのコンタミの可能性があります。unknownのCt値よりNo-RTのシグナルによるCt値が6.6Ct以上大きければ1%以下(PCRの増幅効率が100%の場合)の影響なので無視できる範囲内です。unknownとNo-RTのCt値の差が近い時はプライマーのデザインを再検討された方が良いでしょう。

・・・ DNase 処理について ・・・

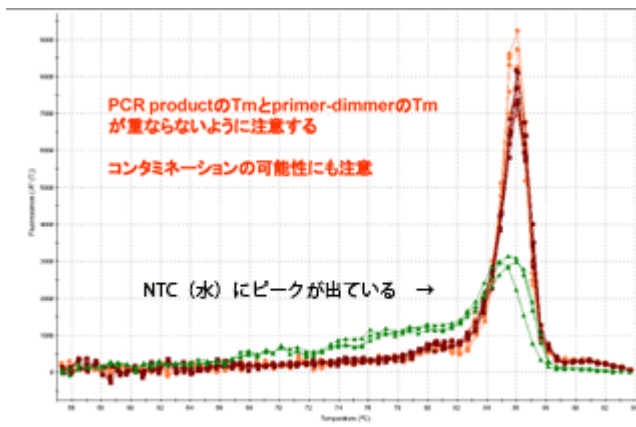
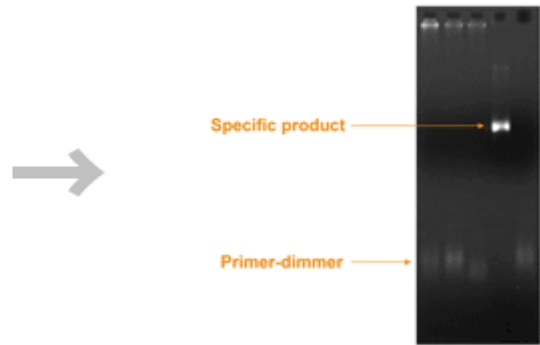
エタ沈でサンプルをロスする可能性があります。どうしてもno-RTで増幅が出てしまう場合は、DNase処理するよりはプライマーデザインの変更がファーストチョイスで、どうしてもない場合にDNase処理をして下さい。その場合には、ハウスキーピング遺伝子についてもDNase処理したものでやり直して下さい。

以降のステップは SYBRGreen の実験系の方

☆ NTC(No template control)のチェック



Primer-dimers on agarose gel electrophoresis



NTCでシグナルが出た場合、コンタミとプライマーダイマーの2種類の可能性があります。Dissociation Curve やアガロースゲル電気泳動でどちらの原因かを考えます。

- ・ プライマーダイマーの場合・・・プライマーの再検討
- ・ コンタミが疑われる場合・・・試薬・primer・水など新しくしてみてもコンタミの除去を検討。

### 3. Dissociation Curve 解析

SYBRGreenの時は必須です。SYBRGreenは2本鎖DNAにインターカレートするので、プライマーダイマーや非特異的PCR産物も蛍光を発します。

GC含量が多いものや、プライマーサイズが長いものはTm値が高くなります。またcDNA少なかったり、発現量少なかったりすると、蛍光量のピークも低いです。

ピークが複数本出現していたり、何かおかしい現象のときにはプライマーの再検討など必要になってきます。

\* 上記「リアルタイムPCRの予備実験」はアジレントテクノロジー株式会社ライフサイエンス部門 吉田 悟 氏よりアドバイスいただきました。