

Naica Systemアプリケーションノート 1-step RT-PCRによるmRNAの定量

COLO201 Total RNAからmRNAの抽出

ヒト結腸腺癌由来のCOLO201細胞より、全RNAを抽出したものをを用いてmRNAの定量を行った。mRNA中のハウスキーピング遺伝子(*GAPDH*, *RPL13A*, *IGF2R*)を選択的に検出するTaqManプローブを用い、ドロップレット内で1-step RT-PCR試薬による逆転写反応とPCRを同時に行い、測定した。検出感度をNaica System(dPCR)およびリアルタイムPCR (qPCR) を用いて比較した。

サンプル調整

RNA Sample	1.0 μ L
PCR Primer (25 μ M)	1.0 μ L
Fluorescence Probe (25 μ M)	0.25 μ L
Fluorescein (1 μ M)*	2.5 μ L
qScript XLT 1-Step RT-qPCR ToughMix	12.5 μ L
Water	9.75 μ L

*: qPCR時はWaterを用いた。

PCR条件

55°C 10min

95°C 2min

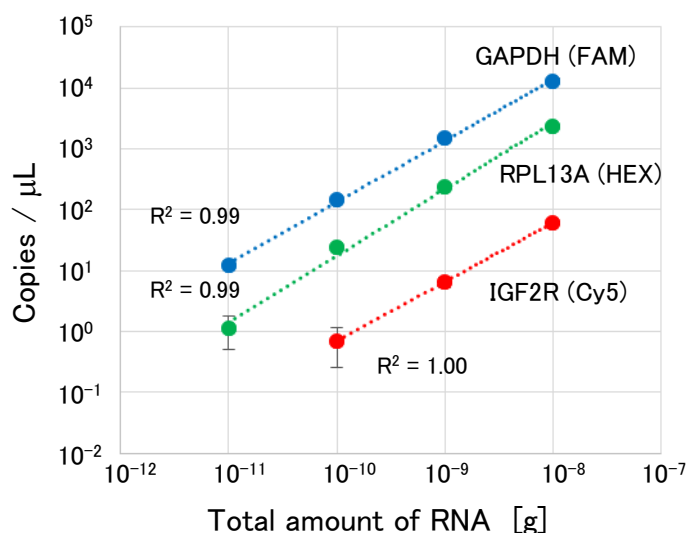
95°C 30sec

58°C 15sec

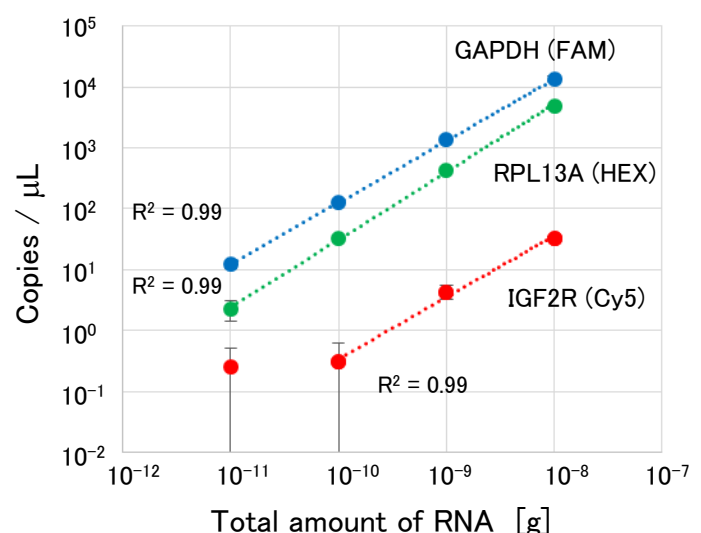
× 44

dPCRによるmRNAの定量

今回測定した1-step RT-PCRによる測定結果を左に、2-step RT-PCRによる測定結果を右に示す (Naica Systemアプリケーションノート: Crystal Digital PCRによるmRNAの定量を参照)。今回、10pgのサンプルでは*IGF2R*の発現を確認できなかったが、他は同程度の感度で定量できている。



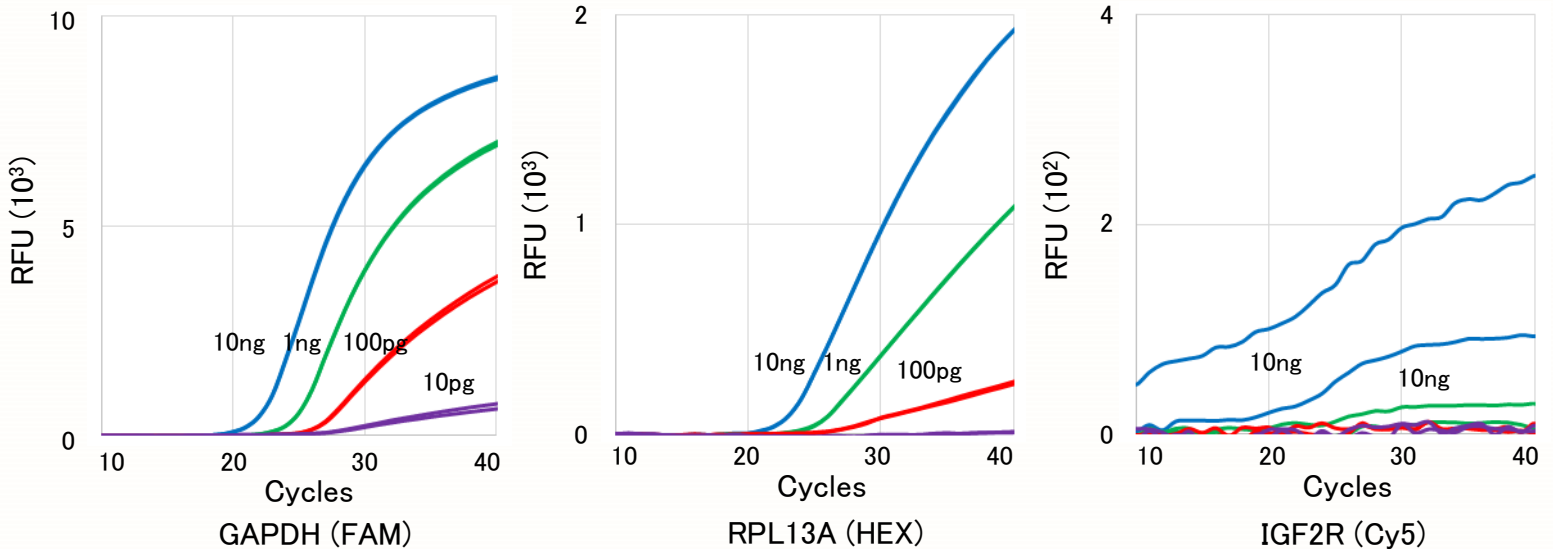
左図: 1-step RT-PCRによるmRNAの定量



右図: 2-step RT-PCRによるmRNAの定量

qPCRによるmRNAの定量

qPCRではGAPDHのみ10pgまで測定することができたが、RPL13Aは100pg、IGF2Rについては10ngまでしか検出できなかった。これは、qPCRでは、dPCRに比べ、最大で100倍ほど感度が劣ることがわかった。qPCRでは、ターゲット以外のRNAが増幅を大きく阻害してしまっているが、dPCRでは微小空間での増幅となることから、qPCRのように増幅効率に大きく影響されないことがわかった。



まとめ

mRNAの逆転写反応を用いてCOLO201細胞のハウスキーピング遺伝子であるGAPDH, RPL13A, IGF2RをdPCRおよびqPCRで検出することができた。また、dPCRはqPCRに比べ、条件によっては100倍ほど検出感度が優れていた。

1-stepによるRT-PCRは、RNAウイルスの検査や細胞の発現解析などで、処理の簡略化、コンタミの防止等、非常に有効な実験手段である。従来のqPCRでは、複数のターゲットを同時に測定する場合の条件検討が非常に難しかったが、dPCRでは1分子から反応が可能な微小空間での増幅を行うため、従来よりも容易に複数のターゲットを高感度に測定することができる。

Ref…2~10℃保存 F…-20℃保存 80…-80℃保存 表示が無い場合は室温保存です。
 特定 I…特定毒物 II…毒物 III…劇物 毒…毒薬 劇…劇薬 危…危険物 向…向精神薬 特…特定麻薬向精神薬原料 カルタヘナ…カルタヘナ法
第1…化審法 第一種特定化学物質 第2…化審法 第二種特定化学物質 化兵1…化学兵器禁止法 第一種指定物質 化兵2…化学兵器禁止法 第二種指定物質
 覚せい剤取締法…「覚せい剤原料研究者又は取扱者」の免許を取得して、ご購入に際しては、譲受証及び譲渡証による受け渡しが必要となります。関
 国民保護法…生物・毒素兵器の製造、使用防止のため、「毒素等」を試験研究用に使用することを確認する証を頂戴しております。毒薬等
 上記以外の法律及び最新情報は、弊社試薬サイト (<https://labchem-wako.fujifilm.com>)をご参照下さい。

- 本文に記載しております試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるもので、「医療品」、「食品」、「生活用品」などとして使用できません。
- 希望納入価格には消費税等が含まれておりません。

富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL 06-6203-3741 (代表)
 東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL 03-3270-8571 (代表)

- 九州営業所
- 東海営業所
- 筑波営業所
- 北海道営業所
- 中国営業所
- 横浜営業所
- 東北営業所

フリーダイヤル 0120-052-099
 試薬URL: <https://labchem-wako.fujifilm.com>

■ FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation
 1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237, USA
 TEL: +1-804-714-1920 FAX: +1-804-271-7791
 ■ FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
 Fuggerstr 12, 41468 Neuss, Germany
 TEL: +49-2131-311-0 FAX: +49-2131-311-100