

通常のPCR装置を用いた微量mRNA定量

佐藤 浩

滋賀医科大学生命科学講座生物学研究室

抄 録

本研究はヒトの末梢血中に含まれるアポトーシス関連タンパクであるBcl-2のmRNAの微量定量を通常のPCR装置をつかって行うことを目的とした。3倍づつ濃度を変化させた4種類の既知濃度の競合鋳型 (competitor) を含む4種類の試験管を用意し、それぞれの試験管内に同量のサンプルを加えて反応 (PCR) を行った。サンプルの添加量を変化させ、PCR後に4本の試験管で増幅されたサンプルの合計とcompetitorの合計が等しくなるようにした。この条件下でサンプルと同量がPCRで増幅されたcompetitorの濃度を、グラフを使って求めることにより、微量のmRNAの値を再現性よく測定することができた。この方法では従来の廉価なPCR装置によって微量なmRNAを定量することができるだけでなく、サンプル中の不純物により定量目的でつくられたPCR装置によって定量がうまく行かないサンプルも、そのmRNA量の測定が可能であった。

序 論

定量目的で開発されたPCR装置を用いて測定を行うことにより、化学合成した鋳型DNAや精製したDNAの標品では、定量性、再現性のある測定値が得られたが、ヒトのリンパ球中のmRNAの測定では、サンプル中に含まれる不純物により、微量のmRNA量の定量を再現性よく行うことができなかった。われわれのサンプル中のmRNAは微量であり、mRNAの精製過程でその量が減少することによりサンプルの精製を行うことは困難であった。そこで競合鋳型 (competitor: サンプル中の目的とする分子と同じPCR primer対で増幅され、増幅された産物はサンプル中の目的のDNA分子と識別できるように工夫してある) を用いて、同一試験管内でサンプルとcompetitorのPCR反応を同時に行い、微量で不純物を含んだ試料を定量できるよう従来のPCR定量法を工夫、改善した。

試料と方法

T細胞cDNAの調製

ヘパリン処理した著者の静脈血からリンパ球をLymphoprep (Nycomed, Oslo) により調製し、T細胞はMiltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Germany) 製のHigh Gradient Magnetic Separation Column type LSにCD3 Microbeadsを充填して分離精製した。分離したCD3陽性T細胞の純度はFACS (fluorescence-activated cell sorting system) 分析 (Beckton Dickenson, San Jose, CA) で95-99%であった。T細胞からQIAamp RNA Blood Miniキット (Quiagen: Hilden, Germany) でRNAを分離し、そのcDNAはAmersham Pharmacia Biotech社 (Uppsala, Sweden) のFirst Strand cDNA合成キットを使って合成した。

PCRによるBcl-2 cDNAの定量

従来の競合的PCR法 (1-3) を以下に述べるように改良して定量を行った。実験に用いた競合鋳型

(competitor) はTaKaRa (Otsu) のcompetitive DNA作成キットを用いて合成した。本実験でリンパ球由来のBcl-2 cDNAとCompetitorのPCR増幅には、sense: 5'-CGA CGA CTT CTC CCG CCG CTA CCG C-3'とantisense: 5'-CCG CAT GCT GGG GCC GTA CAG TTC C-3'のプライマー対を用いた(4)。なお、cDNA由来のBcl-2バンドは319-bpの、competitor由来のバンドは450-bpの大きさになるようにプライマーとcompetitorを設計した。PCR反応は20 μ l中に0.5-3.0 μ lのcDNA溶液、それぞれ最終濃度が10 μ MのATP、GTP、CTP、TTP、1 μ lのcompetitor、0.2 μ Mのsenseおよびantisenseプライマー、0.5UのEx Taq DNA polymerase (TaKaRa, Otsu)、25mM-KCl、1mM-MgCl₂を、15mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)を含む反応液で行った。PCRは94度3分間の変性処理の後、94度30秒と72度1分間の反応を1サイクルとして40サイクルTaKaRaのThermal Cycler Personalで行った。PCR産物は4%アガロースによる(NuSieve 3:1 agarose: BMA Rockland, ME)電気泳動で分離し、Epi-Light UVFA 100 imaging analyzer (アイシン・コスモR & D, 刈谷)で増幅されたDNAバンドを定量した。

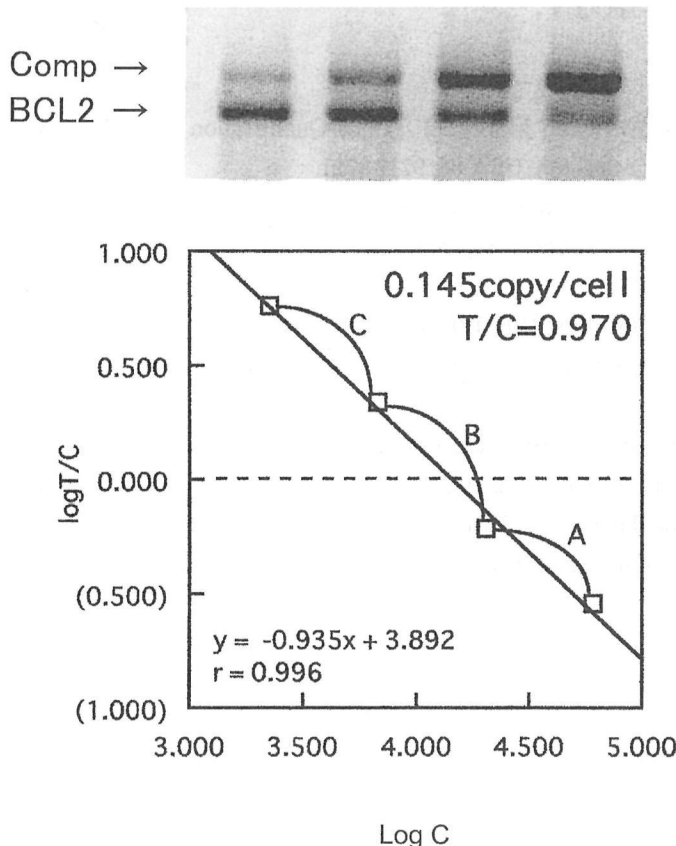
実際の測定ではまず予備実験として、1 μ lと3 μ lのcDNAサンプルを使い、それぞれに対して1 μ lの1.83X10⁵分子/ μ lのcompetitor溶液を3分の1づつ薄めた溶液を4種類の反応チューブをそれぞれのcDNAサンプルに用意し(合計8本のチューブ)、PCRを行った。Bcl-2の増幅産物(以下、Targetの頭文字でTと表示)とcompetitor由来の増幅産物(C)の比の対数(log T/C)をy軸に、添加したcompetitor濃度の対数(log C)をx軸にとりグラフを作り、4点を結んだ回帰直線とlog T/C = 0の直線の交点から試料中のBcl-2の濃度を求めた。測定は再現性のよいBcl-2値が得られるまでPCR反応液中に加えるcDNA及びcompetitor量を変化させ、実験をくり返した。

試料中に既知量のBcl-2を加えた付加実験をする目的で、以下のように精製ヒトBcl-2調製した。ヒトT細胞からBcl-2 cDNA断片をPCRで増幅し、PCR2.1-TOPOベクター(TOPO-TA Cloningキット、Invitrogen, Carlsbad, CA)に組み込み、大腸菌により増幅した。ベクターからEcoRIでBcl-2 cDNA断片を切り出し、Bcl-2の精製標品を作成した。ヒトのBcl-2であることは塩基配列から確認した。精製標品の濃度は電気泳動と吸光度の2つの方法で標品の濃度が一致していることから確認した。

結果と考察

図はPCR産物の電気泳動パターンと、サンプル中のBcl-2(target)から増幅されたPCR産物の量(T)とcompetitorのPCR産物量(C)の比の対数と反応チューブに添加したcompetitorの分子数の対数との関係を示している。4点で回帰直線をもとめ、この直線上でlog T/C = 0の点、つまり、T = Cの点をグラフで求め、サンプル中のBcl-2量を計算した。またこの図で、各competitor濃度間の領域を便宜的に3つにわけ第I、II、III領域と名付けた。加えたサンプル量を変化させて、Bcl-2量を測定したところ、第I、II、III領域内にlog T/C = 0の点が得られる場合ではそれぞれBcl-2量は0.366, 0.145, 0.108 copy/T細胞であった(図では領域IIでlog T/C = 0になった場合のみ表示してある)。このようにどの領域内でlog T/C = 0の点がくるかによってBcl-2量変動することがわかった。それぞれの領域で4本の反応チューブで増幅されたtargetとcompetitor量の総和の比(T/C)を調べたところ、領域I、II、IIIでそれぞれ2.541, 0.970, 0.377であった。競合的PCRでは同じ試験管内でtargetとcompetitorが同一量だけ増幅された場合に、はじめのPCR反応液中のtargetとcompetitorが同じ量あったとみなす。従って、この実験では領域IIにlog T/C = 0がきた、T/Cが0.97の0.145 copy/T細胞が正しい値であることが推定された。

この推定を確かめる目的で、精製された既知量のBcl-2とcompetitorを使ってモデル反応系で検討したところ、log T/C = 0が領域IIにくる場合は、増幅されたtargetとcompetitorの比が0.7-1.5の間におさま



定量PCRによる T 細胞Bcl-2の測定

縦軸はPCR増幅後のtarget (サンプル中のBcl-2分子) とcompetitor (競合鋳型) の比の対数 (logT/C)。横軸はPCR反応液に加えたcompetitorの分子数の対数 (logC)。点線はT/C = 0を示す。写真はPCR後のtargetとcompetitorの電気泳動像をしめす。Comp: Competitor。

り、加えた精製Bcl-2の量を1とした場合に得られた値は $1.16 + 0.061$ ($n = 16$) となり、再現性があり、精度の高い値を求めることができた。領域Iでは常に実際の値よりも高い値が、領域IIIでは低い値がえられた。さらにT細胞から調製したcDNAサンプルに既知量の精製Bcl-2を添加して、測定値の変化を調べたところ、 $\log T/C = 0$ が領域IIにくる場合は、加えたBcl-2は104%の回収率(2回の実験の平均)であった。

Target量が今回の実験で使用した量の100倍の定量PCRで、Souazeらは反応開始時の反応液中のT/C比が0.66と1.5の間の値の場合のみ、誤差が10%以内におさまる測定値が得られることを報告している(5)。本実験で微量のtargetの測定においても、反応開始時ではなくて、反応後のtargetとcompetitorの量の比が0.7-1.5におさまっていれば、target量が正確に測定できることが分った。この方法は、われわれが行っているT細胞中のmRNA測定のように、targetが微量であり、サンプル中にPCRの阻害物質が含まれている場合には特に有効な方法であることを確認した。

謝 辞

この研究は肝臓疾患医療研究財団の助成をうけ行われた。T細胞の純度検定をしていただいた本学輸

血部の程原啓子博士に感謝します。

文 献

1. Wang A.M., Doyle, M.V. and Mark, D.F. (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9717-9721
2. Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. and Bunn, H.F. (1990) Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2725-2729
3. Nagano, M. and Kelly, P.A. (1994) Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitive analysis by polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 269, 13337-13345
4. Aggarwal, G. and Gupta S. (1998) Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: Altered expression of Fas (CD95), Fas Ligand, Bcl-2, and Bax. *J. Immunol.* 160, 1627-1637
5. Souzae, F., Ntodou-Thome, A., Tran, C.Y., Rostene, W. and Forgez, P. (1996) Quantitative RT-PCR: Limits and accuracy. *BioTech.* 21, 280-285