

LightCycler を用いた定量的 PCR 条件検討

高島節子、松川 茂（福井医科大学 実験実習機器センタ - ）

Setsuko Takasima, Shigeru Matsukawa:

Target sequence quantification of genome DNA and mRNA with a Light Cycler System

The Light Cycler System, a fast PCR amplification and analysis system, completes 30 PCR cycles within just 30min. It can determine the amount of target sequences in starting materials by real time measuring of DNA-SYBRGreen I fluorescence in the PCR log-linear phase. This report shows the optimization of experimental procedures for quantification of c-myc proto-oncogene DNA present and c-myc mRNA expressing in HL60 and K562 human leukemia cells with this system.

1. はじめに

微量なDNAサンプルの定量において,PCR法は非常に有用な方法であるが,精度の高いデータを得るには多数の希釈系列の調製や,電気泳動など煩雑な手作業が必要となる。現在,PCRプロダクトの増幅を蛍光シグナルとしてリアルタイムに検出し,PCRの対数直線増幅領域の蛍光測定をすることにより初期テンプレート中の目的遺伝子の定量を行う装置がいくつか発売されている。今回 LightCycler (Roche 製) を用い,癌遺伝子である c-myc の mRNA 発現量及び遺伝子レベルでの増幅 (gene dosage) の測定を HL60, K562 細胞を対象に行った結果と,条件検討の過程を報告する。

2. 原理

サンプルは円形のカローセル(32本)にセットし,ステッパーモーターにより検出部に移動し測定する。温度は中心部の加熱コイルとファンで高速にコントロール可能である。サンプル容器はキャピラリー型で,キャピラリーの根元の白色プラスチック部にサンプルをアプライして遠心し,キャピラリーの先端に落射照明して測定する。励起光源はLEDで,検出波長は3波長である(図1)。

蛍光フォーマットは,SYBRGreenI(dsDNA特異的に結合し蛍光強度が大きく増強する蛍光試薬)の蛍光をPCR1サイクルごとに検出することでPCR産物の増加量をモニターする(図2,3)。

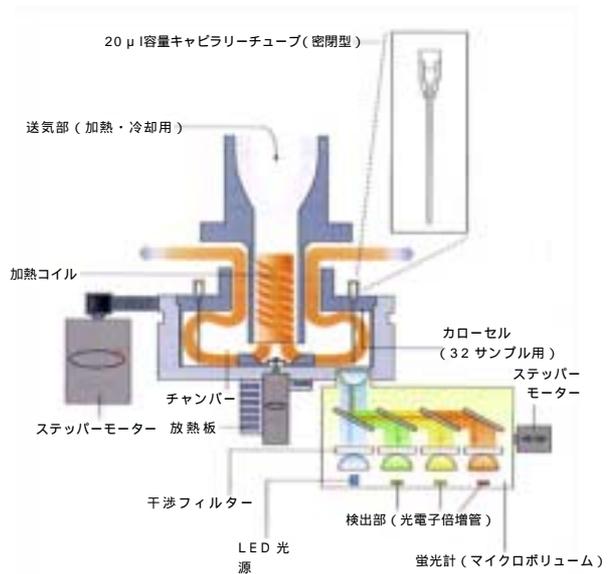


図1. 装置の模式図

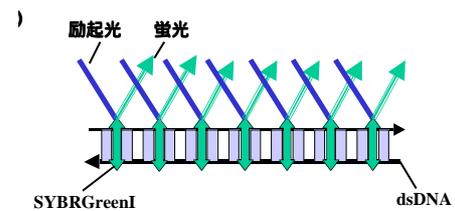


図2. SYBR Green I フォーマットの模式図

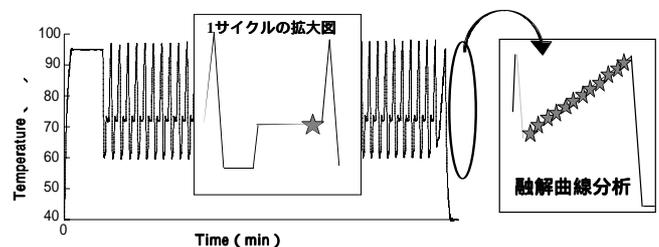


図3. SYBRGreenI フォーマットを用いた PCR の検出における典型的な温度サイクル

PCR40 サイクルと融解曲線分析をあわせて30分以内で完了。 は検出ポイントを示す。

3. 方法

1) サンプル調製: 正常ヒト血球細胞, ヒト白血病由来の株化細胞(K562, HL60)からDNA, totalRNAを抽出し A_{260} にて濃度を決定した。totalRNAはRT反応によりcDNAに変換したものをサンプルとして, その中に含まれるc-mycのcDNAを検出した。PCRプライマーはc-myc遺伝子exon3の一部分(173bp)を増幅するよう設計した(図4)。

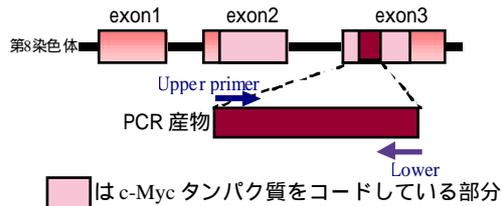


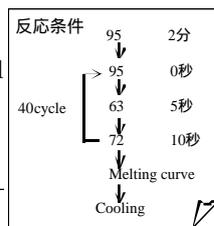
図4 . c-myc 遺伝子の構造

2) 最適 $MgCl_2$ 濃度決定: $MgCl_2$ 濃度を1, 2, 3, 4, 5mMにして同量のテンプレートを増幅し, その効率や特異性より最適濃度を3mMに決定した。多くのテンプレートは, ブロック式PCR装置の条件よりも高めに設定された。条件が特殊なので, 必ずプライマーごとに検討する。

3) サンプルの定量: 検量線は正常DNAの希釈系列 30pg, 300pg, 3ng, 30ng(ヒトゲノム10copies ~ 10,000copiesに相当)を用い, サンプルは検量線に乗るよう適宜希釈した。プライマー濃度はブロック式PCR装置の条件と同様に設定した。anti-Taq抗体を使ったホットスタート法にてプライマーダイマー形成を防いだ。

反応系

DNA Master SYBRGreenI	2 μ l
anti-Taq 抗体(1 μ g/ μ l)	0.2 μ l
$MgCl_2$	3mM (final)
primers	0.5 μ M each (final)
D. W.	
Total	18 μ l
Add template	2 μ l



4. 結果

1) 融解曲線分析は増幅サイクルの完了後, 生成したPCR産物について自動的に行われる。サーマルチャンパー内の温度を低い温度から開始し, 徐々に上昇させていく。この間, 各チューブの蛍光強度を細かいインターバル(今回は0.2ごと)で測定する。これにより, キャピラリー内の融解の様子が詳細にモニターできる。DNAが熱変性を開始するとSYBRGreenI色素はdsDNAから放出され, 蛍光強度が減少する。各dsDNA産物は, 固有の特異的融解

温度(T_m ; 50%のDNAが一本鎖である温度)を持つのでPAGEでPCR産物が目的の大きさであるか, シングルバンドであるかをチェック(図5)すれば, 次からは T_m 値を解析することで特異的か非特異的かを判断できる。今回はホットスタートを用いてアニーリング温度63でPCRした後, 産物を95にて変性させてから67でアニーリングし, 毎秒0.2

で95までゆっくり加熱した。この時随時蛍光測定され, モニターされる。この曲線の負の一次微分値($-dF/dT$)をとると, ピークが一つで特異的な産物のみが確認されたので定量分析に入った。条件検討の段階でアニーリング温度63(ホットスタートなし)でPCRしたとき, 同じくアニーリング温度57(ホットスタートなし)でPCRしたときの融解曲線にはプライマーダイマーが見られ, 定量には適さないことが分かった(図6)。

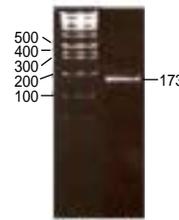


図5 . PCR ProductのPAGE
シングルバンドであり, プロダクトの長さも一致した。

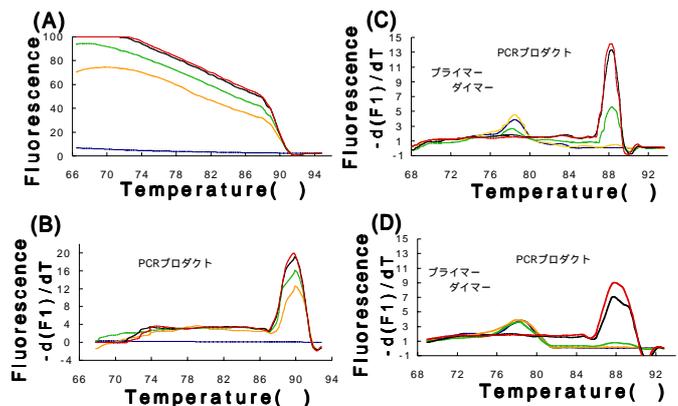


図6 .c-myc PCR断片のLightCyclerによる融解曲線分析
ホットスタートを用いてアニーリング温度63でPCRした後, 産物を95にて変性させてから67でアニーリングし, 毎秒0.2で95までゆっくり加熱する。(A)この時随時蛍光を測定しモニターした融解曲線。(B)融解曲線の負の一次微分値($-dF/dT$)。ピークが一つで特異的な産物のみが確認された。(C)条件検討でアニーリング温度63(ホットスタートなし)でPCRしたときの融解曲線。プライマーダイマーがある。(D)同じくアニーリング温度57(ホットスタートなし)でPCRしたときの融解曲線。プライマーダイマーがある。

2) 定量分析は、LightCyclerの解析プログラム上で行った。以下に示す要領でサンプルのc-myc量を決定した。

STEP1: 蛍光モニターした値のバックグラウンドを補正する。STEP2: コンピューターが全てのデータポイントに対して対数値を計算しプロットする。次にノイズバンドを設定し、PCRが対数直線増幅期にあることを示す蛍光シグナル(log)の増加地点を定義する。STEP3: このノイズバンドを越えるデータポイント(2点)を通る直線を引き、すべてのスタンダードに対してノイズバンドと交差する点を決定する。STEP4: これらの交差する点(Cycle Numberで表示)を、濃度またはコピー数(log表示)に対してプロットし、検量線を描く。スタンダード及び未知濃度サンプル(点線)の濃度は、各サンプルの交点(Cycle Number)とスタンダードの交点を比較することにより得られる(図7)。

3) c-mycのmRNA発現量は、正常細胞に比べK562では4倍、HL60では31倍に増加していた。染色体DNA中のc-myc遺伝子は、正常細胞に比べK562では有意な差はなく、HL60では4倍に増加していた(図8)。この結果はFISH法で検出されたc-myc遺伝子の増幅(転座)の程度を反映しているものと思われる(図9)。

5. まとめ

対象DNAの測定濃度は10コピー以上(正常細胞では5cellsに相当)が最適といえる。同一の反応混合液を5本のキャピラリーに分注して、同時に増幅させた場合、解析結果の平均分散係数(CV)は8.9%であった。従ってSYBRGreenIを用いた検出法では、1.5倍程度の増減では5回以上の測定が必要であり、2倍以上の差であれば容易に比較できるといえる。

以上のように、癌細胞における染色体DNA上の癌遺伝子の増幅や、mRNAの発現量の増加、減少を精度よく測定することができ診断にも役立つことが期待される。また、今回は正常ヒトgenomeを検量線作成用に用いたが、他に目的遺伝子のPCR産物を用いることも考えられる。

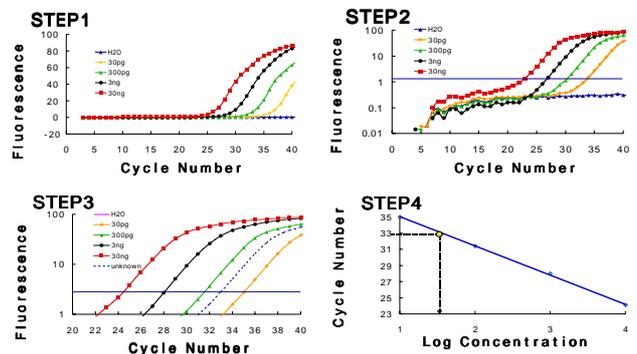


図7. LightCycler解析プログラムでの定量分析

STEP1で蛍光モニターした値のバックグラウンドを補正し、STEP2ではコンピューターが全てのデータポイントに対して対数値を計算しプロットする。次にノイズバンドを設定してPCRが対数直線増幅期にあることを示す蛍光シグナル(log)の増加地点を定義する。STEP3でこのノイズバンドを越えるデータポイント(2点)を通る直線を引き、すべてのスタンダードに対してノイズバンドと交差する点を決定する。STEP4ではこれらの交差する点(Cycle Numberで表示)を、濃度またはコピー数(log表示)に対してプロットし、検量線を描く。スタンダード及び未知濃度サンプル(点線)の濃度は、各サンプルの交点(Cycle Number)とスタンダードの交点を比較することにより得られる。

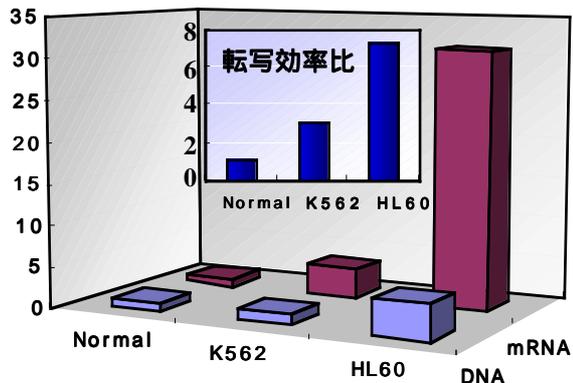


図8. c-myc量の比較と見かけの転写効率比

正常細胞のmRNA,DNAを1としたときのK562,HL60のc-mycの値を示す。転写効率比は、mRNA量をDNA量で割った値である。



図9. FISHレーザー顕微鏡写真

紫色は核、緑色は第8染色体のセントロメア、赤色はc-myc遺伝子である。(提供: 機器センター山本)