

標準 DNA を用いた real-time PCR による mRNA の定量法

大野 美紗 大学院 化学応用学専攻 博士後期課程 / 小山 文隆 工学部 応用化学科 教授

キーワード: キチン, 哺乳類キチナーゼ, quantitative real-time PCR

概要

近年, 遺伝子発現解析には, real-time PCR が用いられている。従来の方法は, 一種類の mRNA レベルを housekeeping 遺伝子の mRNA レベルで標準化し, 発現レベルとしていた。しかし, この定量法では二つ以上の mRNA レベルを直接比較することはできない。我々は, 複数遺伝子の mRNA レベルを同じスケールで定量する方法を開発した。

具体的には, 定量する cDNA [Chit1, AMCase, housekeeping 遺伝子 (GAPDH と β -actin), 対照遺伝子 (pepsinogen C)] の PCR 増幅部位を 1 分子ずつ連結し, 一本の標準 DNA を作製した (図 1)。そして, real-time PCR に組み合わせることで新規の定量法を確立した。確立した定量法は, 複数の遺伝子発現レベルを同じスケールで, 絶対定量できた。この方法の分析感度は, 100 分子以上とごく微量であった (図 2 と図 3)。この方法は, 五種類の遺伝子を, 同じスケールで定量できるので, 複数遺伝子の mRNA レベルを直接比較できる。

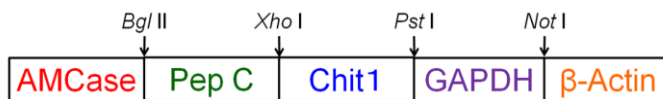


図 1. マウスの標準 DNA の構築

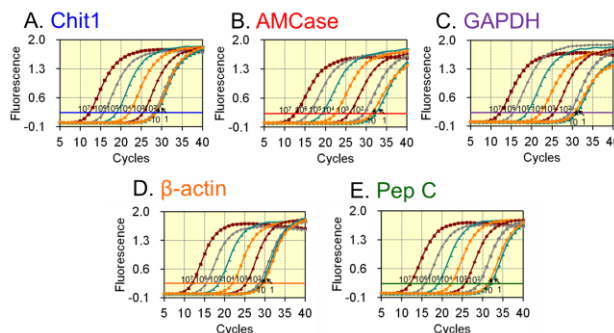


図 2. 標準 DNA の増幅曲線

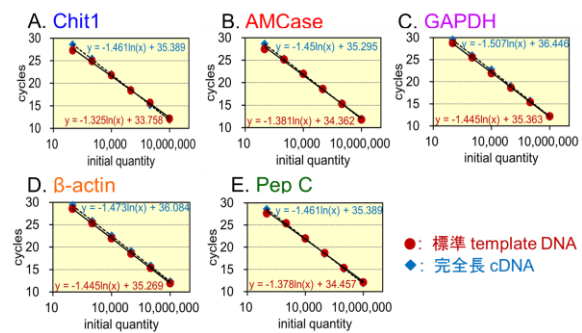


図 3. 標準 DNA の標準曲線

アピールポイント

我々は, 複数遺伝子の mRNA レベルを同じスケールで定量する方法を開発した。確立した方法は, 標準 DNA の作成や検証過程に関して複数のステップが必要である (図 2 と図 3)。しかし, この方法は複数の mRNA レベルを直接比較できる遺伝子発現データとして得られる。また, 確立した方法は, 高感度で, 定量性において, 広いダイナミックレンジを与える。

利用・用途 応用分野

この定量法は, 同一の尺度で複数遺伝子間の mRNA レベルの定量と比較に適している。確立した方法は, 医用生体工学や臨床サンプルにも適用可能である。

関連情報

● 関連論文 = Ohno, M., Tsuda, K., Sakaguchi, M., Sugahara, Y. and Oyama, F. (2012) Chitinase mRNA levels by quantitative PCR using the single standard DNA: acidic mammalian chitinase is a major transcript in the mouse stomach. *PLoS ONE* 7: e50381.

● 関連 URL = <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0050381>

工学院大学 総合研究所 研究推進課

東京都八王子市中野町2665-1 〒192-0015

TEL:042-628-4940 FAX:042-626-6726

E-Mail:liaison_soumu@sc.kogakuin.ac.jp URL:<http://www.kogakuin.ac.jp>