

次世代RT-PCRを最適化する NxtScriptシリーズの機能

Application Note

December 2021

Alexander Latta, Ph.D, Neeraja Sammeta, Ph.D, Roche Diagnostics Corporation
Natalia Borkowska-Dorn, Roche Diagnostics GmbH

疾患や感染症の検出と同定には、逆転写 (RT) プロセスとして、PCRの前にRNAをDNAに変換するRNAターゲット分析が必要となります。従来、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) アッセイは2ステップのプロトコルに従っていました。まず1つの反応として逆転写を行い、その後、2つ目の反応のためにPCRミックスに添加します。

日常的な検査手順としてRT-PCRの普及が進むにつれ、アッセイの開発者は逆転写酵素の機能的限界を拡張してきました。特に重要な要求としては、より複雑なRNAターゲットの分析や、高レベルのDNA・RNAバックグラウンドが存在する中での、低コピー数RNAターゲットの検出能への期待が挙げられます。また、アッセイのターンアラウンドタイム (処理時間) 短縮も求められており、これは多くの場合でサンプル精製が不十分になり、プロセス中に高濃度のRTおよびPCR阻害物質が混入することにつながります。様々な要件を満たすため、M-MuLVなどの酵素は必要な特徴を備えられるように改良されてきました。

ターンアラウンドタイムを短縮するためのもう1つの開発戦略として、1ステップ (ワンポット) RT-PCRアッセイが注目されており、これはサンプルのハンドリング工程を減らせるという更なる利点があります。このアッセイでは、RTおよびPCRステップのすべてのコンポーネントが単一の反応ミックスに含まれます。1ステップRTPCRは、エンドユーザーにとってはより迅速かつ容易な方法と見られる一方で、いくつかの大きな制約があります。これについてはアプリケーションノート後半で説明します。

RT-PCRアッセイの成功には多くの要因が影響しますが、まずは用途に適した酵素を選択することが最も重要です。1ステップまたは2ステップのどちらのRT-PCRへの挑戦においても、ロシュ・カスタムバイオテックは、迅速で堅牢なRT-PCRアッセイを設計するための変異型M-MuLV RT製品を推奨します。本稿では、RT-PCRアッセイの最適化を支援する、M-MuLVベースの逆転写酵素「NxtScript」および「NxtScript 2G」の主な特徴を紹介します。

Table of contents

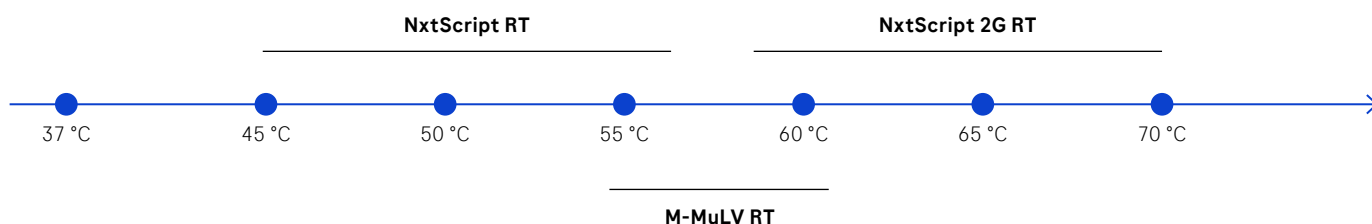
NxtScript の RT-PCR におけるIVDへの適合性	3
逆転写反応の温度	3
ダイナミックレンジとバッファ-適合性	4
ターンアラウンドタイムの短縮	6
凍結乾燥とダイレクトドライダウンプロトコルへの適合性	7
マルチプレックスへの適合性	9
阻害物質への耐性	10
困難な臨床サンプルの取り扱い	11
1ステップおよび2ステップRT-PCRアッセイにおける酵素選択の重要性	13
1-ステップ vs. 2-ステップ RT-PCR	13
1ステップおよび2ステップRT-PCRアッセイにおけるプラットフォームの選択と酵素の熱安定性の影響	14
1ステップ vs 2ステップRT-PCRプロトコルの選択に影響するその他の要因	16
結論	17
方法	17
リファレンス	18

NxtScriptのRT-PCRにおけるIVDへの適合性

逆転写反応の温度

アッセイにおいてターゲットとする遺伝子内の領域の選択には、開発者のコントロールが及ばないものを含め多数の要因が影響します。さらに、診断のためのターゲット数が増えるにつれ、RNAの複雑な領域へフォーカスすることも不可避です。明らかな二次構造を持つ配列などの複雑な領域では、ターゲットを直鎖化するために必要な高温に耐えることができる、より堅牢な試薬が求められます。

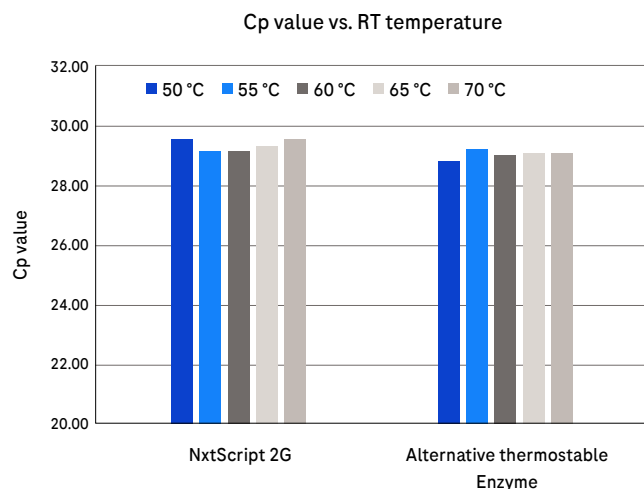
野生型M-MuLV逆転写酵素は、分子生物学研究で広く使用されている逆転写酵素です。M-MuLV酵素は37°Cから42°Cの温度で逆転写を行うことができますが、これは効率的な逆転写のため困難なRNAターゲットを直鎖化するには不十分な場合があります。現代の遺伝子診断アッセイへの要求に応えるために開発されたNxtScriptやNxtScript 2GのようなM-MuLVベースの変異型逆転写酵素は、より高い熱安定性を示し、最大70°Cの温度でcDNA合成を行うことが可能です。(Fig1)



01
ロシユが提供する M-MuLV 型逆転写酵素の温度プロファイル

これらの変異型M-MuLV酵素は、高温域で機能するだけでなく、幅広い温度範囲にわたって一貫したパフォーマンスを示します。

Fig2は、50~70°Cの温度範囲において、NxtScript 2Gおよびその他の熱安定性酵素から得られたCp値を示します。Cp値は両方の酵素で各温度で一貫しており、NxtScript 2Gが他の熱安定性を持つ逆転写酵素とほぼ同等性能であることを実証しています。



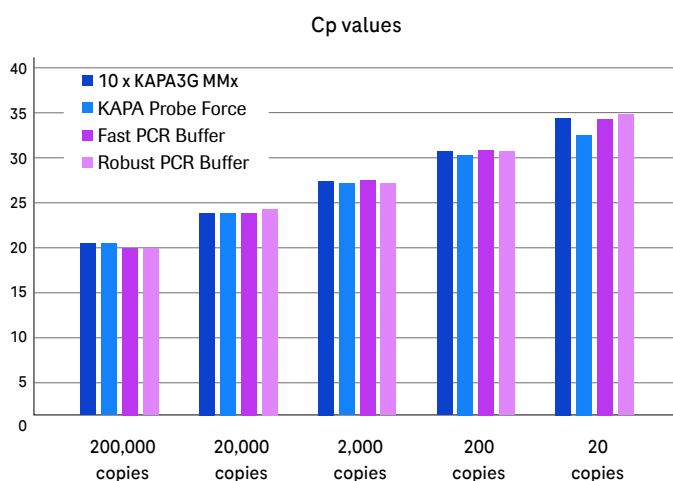
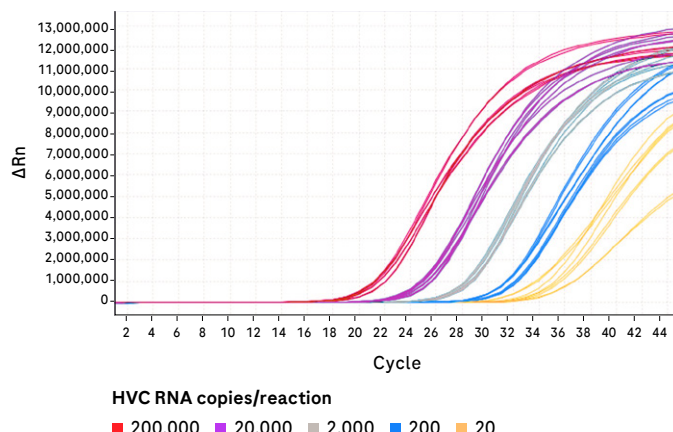
一連の高温逆転写温度で実行された1ステップRT-PCRテストから得られたCp値。50から70°Cの温度にわたって、値の変動は0.5未満でした。

02
NxtScript 2Gは、一連の高温RT温度にわたり1ステップRTPCRにおいて一貫したCp値を示し、同様の熱安定性逆転写酵素と比較可能な性能を示します。(社内評価データ)

ダイナミックレンジとバッファー適合性

より低い検出限界への需要の高まりは、すなわちRT-PCRアッセイが、より少ないターゲットRNAコピー数をサンプル中から検出しなければならないことを意味します。アッセイの開発者は同時に、アッセイ全体のターンアラウンドタイムを短縮させようとしており、そのために低コピー数ターゲットRNAからcDNAの合成ができ、かつ1ステップRT-PCRアッセイで高速サイクリングが可能で、次世代DNAポリメラーゼとも適合する逆転写酵素が求められています。

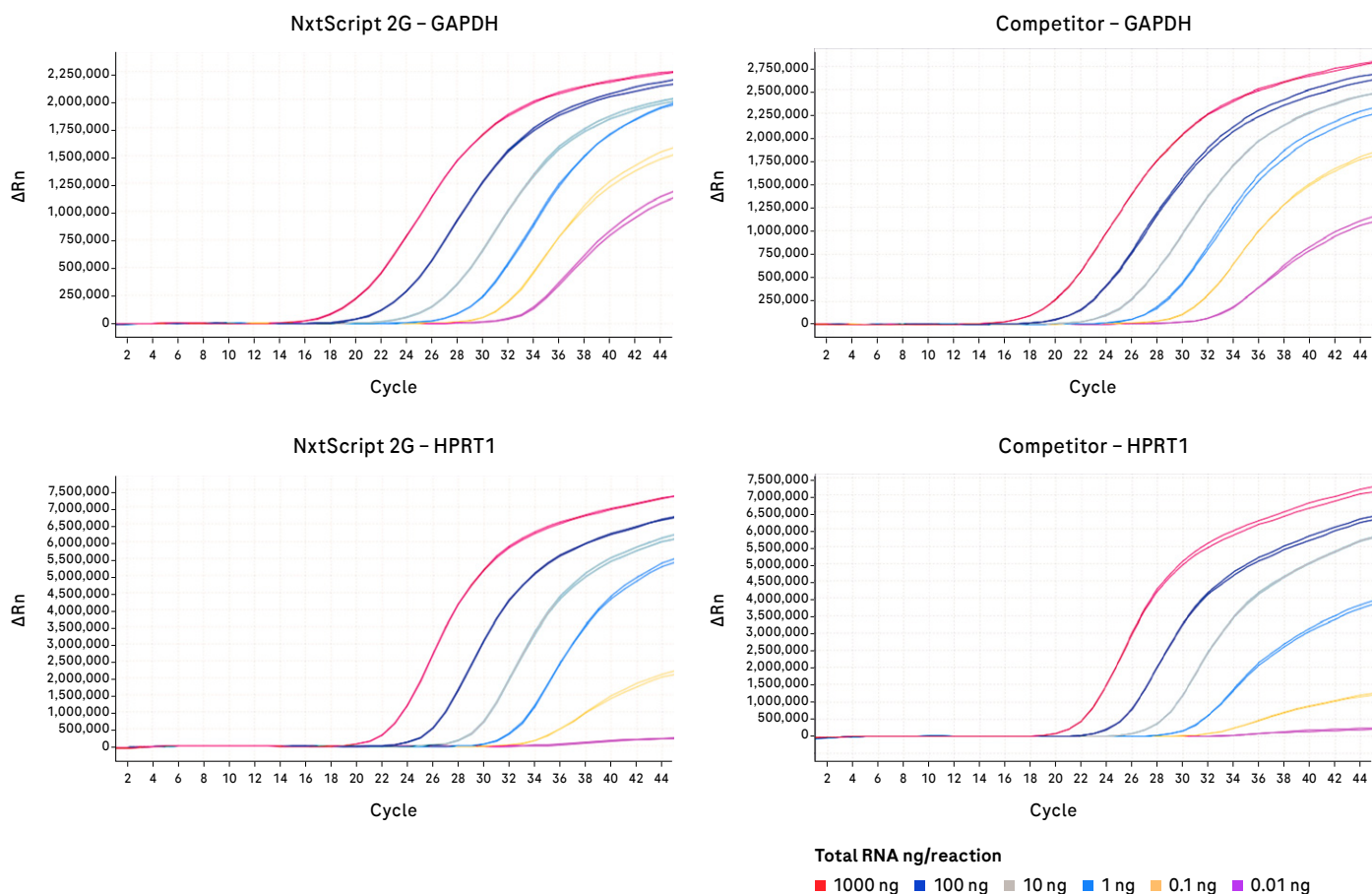
NxtScriptおよびNxtScript 2GをKAPA3G DNAポリメラーゼと組み合わせることで、低濃度テンプレートを検出できる高速アッセイの基準を満たすことができます。またそのスピードと感度を実証するために、50 UのNxtScript 2Gを異なるKAPAバッファーおよびマスターミックスに用いてRT-PCRを実施しました。Fig3の増幅プロットは、すべてのテスト条件のRT-qPCRカーブを、初期テンプレートRNA量ごとに色分けして重ね合わせたものであり、棒グラフは同じ実験で得られたCp値を、バッファーまたはマスターミックスごとに色分けして示したものです。テストしたすべての条件でターゲットRNAの効率的な検出が示されました。



50 U の NxtScript 2G と KAPA3G を用いて、4種のバッファーで連続希釈したC型肝炎ウイルス(HCV) RNA を検出。NxtScript 2GとKAPA3Gは、テストしたすべての条件で20コピーのターゲットを増幅しました。

03
異なるバッファーにおいて、50 UのNxtScript 2GおよびKAPA3Gを使用したRT-PCRのPCR曲線およびCp値(社内評価データ)

NxtScript 2Gは、市場で入手可能な他の熱安定性逆転写酵素と同等またはそれ以上の性能を発揮します。 NxtScript 2Gを用いたアッセイでは、反応テンプレートとしてわずか10 pgの Total RNA を使用した場合でも、高発現ターゲットであるGAPDHを検出しました。さらに、わずか100 pgの Total RNA を反応に使用した場合も、低発現ターゲット（HPRT1）を確実に検出しました（Fig4）

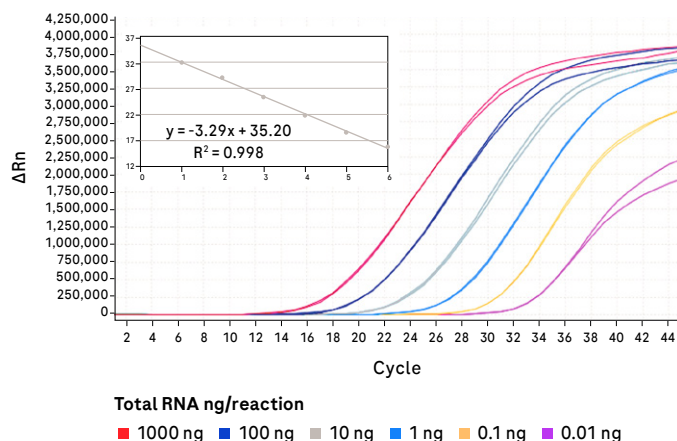


04

高発現および低発現ターゲットの検出における、NxtScript 2Gと他社熱安定性逆転写酵素の性能比較(社内評価データ)

ターンアラウンドタイムの短縮

1ステップRT-PCRプロトコルの使用や高速PCRサイクリングに加え、アッセイ全体のターンアラウンドタイムをさらに短縮するためにRTステップの短縮が試みられています。NxtScriptおよびNxtScript 2Gは、5分という短いRTステップでも使用することができます。このスピードでの堅牢性を検証するため、5分間のRTホールドで、幅広いRNAテンプレート濃度の1ステップRT-PCRを実行しました。反応効率は101%であり、短いインターバルにもかかわらずRTステップが完了できたことの証明となりました (Fig5)。



50 UのNxtScript 2G と 10x KAPA3G HotStart Masterを使用し、65°C・5分間の短いRTホールド時間で行った1ステップRT-PCR。反応効率は101%であり、最大で1 μgの Total RNAからの反応であっても、短いステップ内でRTが完了したことを示しています。

05

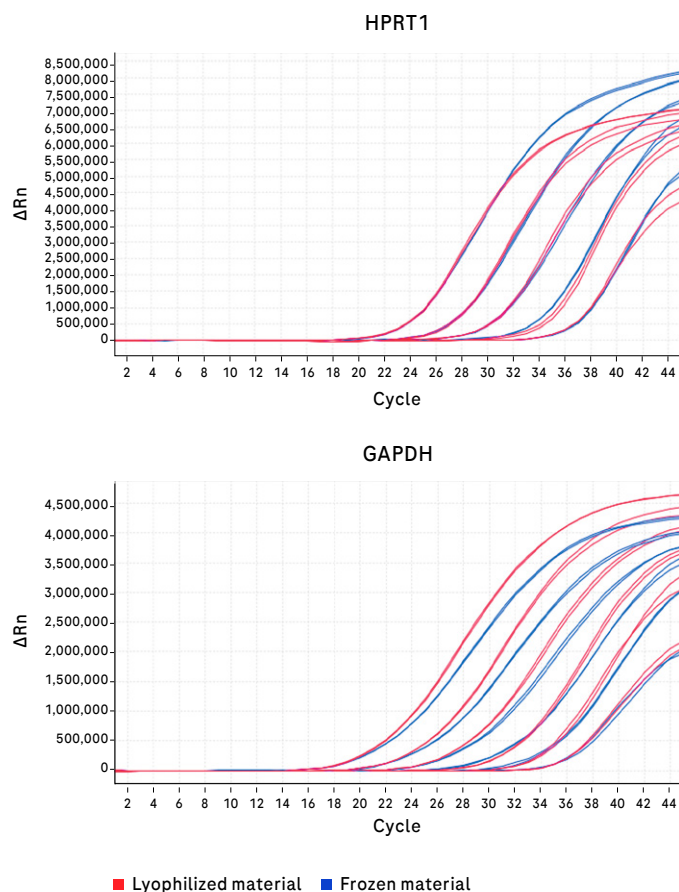
5分の逆転写反応で 50 UのNxtScript 2Gを使用したRT-PCRの性能
(社内評価データ)

凍結乾燥とダイレクトドライダウンドプロトコルへの適合性

現代の診断用アッセイ（特にポイント・オブ・ケア [POC] 領域）での使い勝手、保存そして輸送は、ドライダウンまたは凍結乾燥可能な試薬によって容易に実現します。これは、冷蔵・冷凍庫がすぐに利用できない場所においては特に重要です。伝統的に、逆転写酵素やDNAポリメラーゼはグリセロールのような保水性素材を用いブレンドされてきましたが、これはミックスが乾燥した後に水分を引き寄せてしまう可能性があります。さらに問題となるのは、グリセロールは室温で非揮発性の液体であるため、グリセロール自体は蒸発せず、ミックスを完全に乾燥させることができないことです。このようなコンポーネントはドライダウンを困難にしますが、多くの場合に強力な酵素安定剤として頻繁に使用されています。⁵

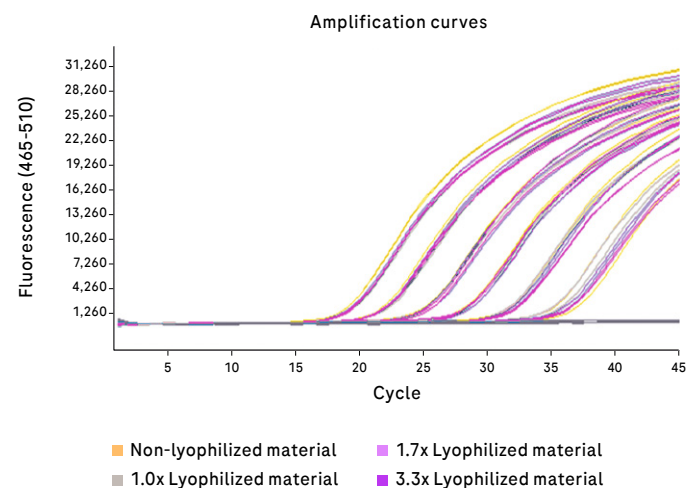
NxtScriptとNxtScript 2Gはどちらも、乾燥プロセスにおける問題を回避する処方を用いています。NxtScriptは、グリセロールを含んではいるものの、高濃度仕様のため、酵素がRT-PCRの使用濃度に希釈されたときにはグリセロール含有量が無視できるレベルとなります。また、NxtScript 2Gはグリセロールフリー組成です。NxtScript (Fig6) とNxtScript 2G (Fig7) は共に、RT-PCRアッセイ開発のための高性能な凍結乾燥に対応した、Lyo-ready オプションとなっています。

凍結乾燥アッセイの構築における大きな落とし穴は、凍結乾燥製品の再溶解後にほぼ不可避免的に発生する活性の低下です。しかし、適切な条件下であれば、NxtScriptとNxtScript 2Gはどちらも活性の損失を最小限に抑えて凍結乾燥することができます。



テンプレート濃度 1 μg~10 pg/反応のRNAを、Duplex RT-PCRによって増幅しました。凍結乾燥されたNxtScriptは、AptaTaq Genotyping Master mixを使用した反応に再溶解されました。凍結乾燥されたNxtScriptを使用した反応は、同じ材料で凍結乾燥せず-20°Cで保存されたものを使用した反応と並行して行われました。すべての場合において、反応効率は97から103%の間であり、NxtScriptによるcDNAの一貫した堅牢な生成を示しています。

06 凍結乾燥されたNxtScript (赤) と非凍結乾燥のNxtScript (青) を含む反応のRT-PCRカーブの比較(社内評価データ)

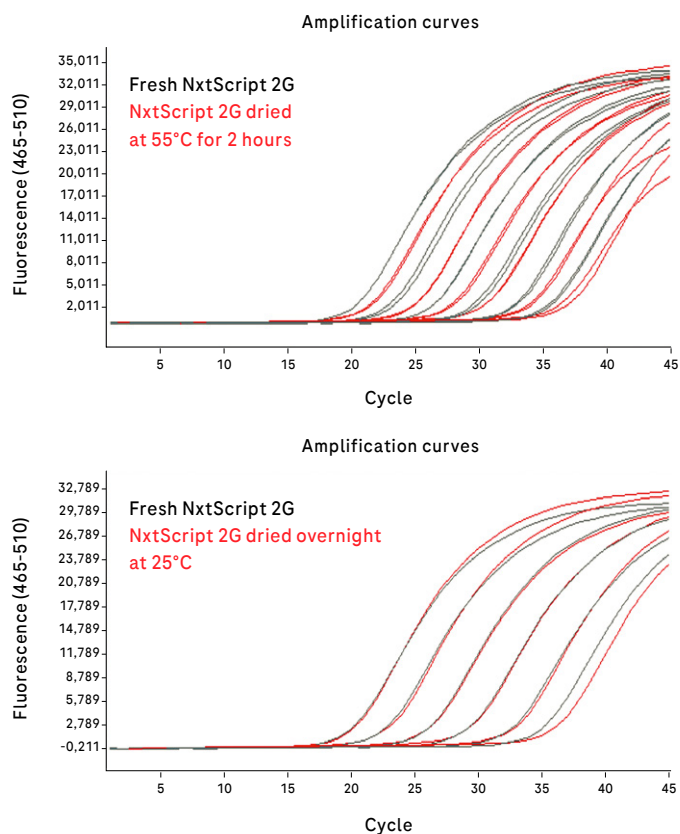


NxtScript 2Gを1.0x、1.7x、および3.3xの濃度で凍結乾燥および再溶解し、その後生じる活性損失をテストするために1.0x濃度の非凍結乾燥材料と比較しました。すべての条件でCp値の変動は0.5未満であり、性能にほとんどまたは全く差がないことを示しています。さらに、より濃縮された凍結乾燥材料はCp値のシフトを示さず、RNAテンプレートからのcDNA生成を完了させるには1.0xの濃度でも十分であったことを実証しています。

07 異なる濃度で凍結乾燥されたNxtScript 2Gと、非凍結乾燥材料との性能比較(社内評価データ)

凍結乾燥は利点があるにもかかわらず、そのプロセスは単調で煩雑であり、一貫した性能のためにメンテナンスが必要な高価な機器を使用しますが、NxtScript 2Gは、凍結乾燥を行わずに乾燥させることもできます。

これを実証するために、2つの条件下でNxtScript 2Gを乾燥させました。1つ目は、55°Cで2時間加熱しながらの乾燥です。2つ目は、25°Cで一晩の温度保持です。結果は、高温ではある程度の活性低下が示されましたが、より低温で長時間の乾燥による活性低下はほとんどまたは全くありませんでした (Fig8)。乾燥プロトコルは、アッセイや製造プロセスの仕様に合わせて最適化されるべきといえます。

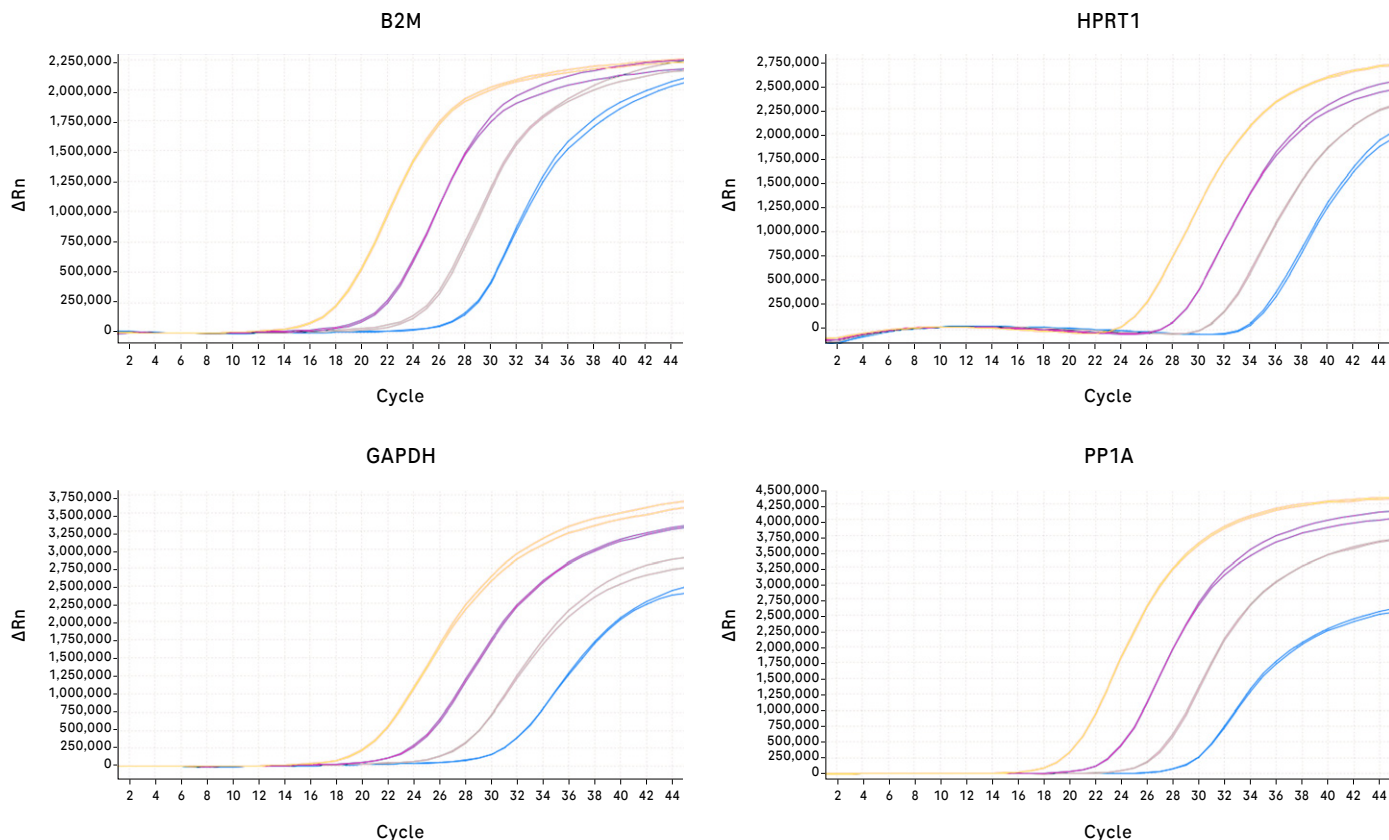


NxtScript 2Gを、熱を使用した2つの異なる条件下で乾燥させました。乾燥に続いて再溶解し、B2M mRNAをターゲットとするRT-PCRに使用しました。テンプレートRNA濃度は、反応あたり500 ngから0.005 ngの範囲でした。乾燥された試薬の性能を、非乾燥のものと比較しました。非乾燥試薬と比較して、55°Cで乾燥させたNxtScript 2Gから若干の活性が失われていました。しかし、25°Cで一晩乾燥させた場合、活性低下はほとんどまたは全く検出されませんでした。

08
2つの異なるプロトコルを使用して直接乾燥させたNxtScript2Gと非乾燥との性能比較(社内評価データ)

マルチプレックスへの適合性

診断用のアッセイを効率化するための取り組みの中でも、検出反応からより多くの情報を得る方法のひとつが、複数ターゲットの同時検出（マルチプレックス）です。技術が普及していく中で、マルチプレックスRT-PCRに使用される異なる化学反応の成否は、DNAポリメラーゼの能力に大きく依存しています。しかしながら、DNAポリメラーゼは、同様に重要な逆転写酵素により合成されたcDNAターゲットしか増幅できません。NxtScriptおよびNxtScript 2Gは、マルチプレックスRT-PCRアッセイにおいても良好に機能します。既知の発現レベル⁶（低～極高レベルまで）の遺伝子ターゲットを使用して、1ステップの quadruplex（4重）RT-PCRアッセイにおけるNxtScriptの性能を実証しました（Fig9）。



50 UのNxtScriptを使用した quadruplex RT-PCRにおいて、様々なRNAテンプレート濃度で4つの遺伝子ターゲットを同時に増幅しました。低発現ターゲットの検出が高発現ターゲットによって損なわれないことを確認するため、4つのターゲットは異なる発現レベルで選択しました。NxtScriptは、100 pgの低インプット濃度から4つのすべてのターゲットcDNAを合成しました。すべてのターゲットの反応効率、一般的に許容される90-110%の範囲内でした。

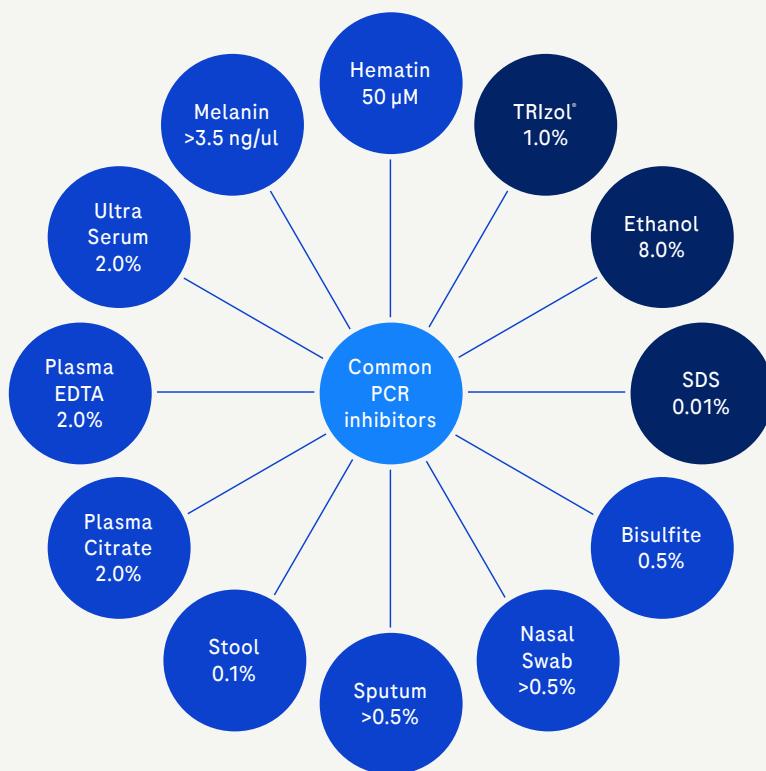
遺伝子	発現レベル	Total RNA ng/reaction
GAPDH	Very high	100 ng
PP1H	High	10 ng
B2M	Medium	1 ng
HPRT1	Low	0.1 ng

09
異なるインプットRNA量からの、NxtScriptとKAPA3G Hot Start Masterを組み合わせたquadruplex RT-PCRの増幅曲線(社内評価データ)

阻害物質への耐性

臨床サンプルは、通常、抽出核酸のロスや分解防止を確実にするため時間を要するプロトコルで精製されます。このステップは、開発者が精製を簡素化または省略することによって時間を節約しようと試みるポイントでもあります。ただし、その試みの欠点は、サンプル中に存在する阻害物質の濃度が上昇し、アッセイ失敗の原因となってしまう可能性があることです。そのため、通常存在する阻害物質に対して耐性を持つ試薬のみが、低純度の臨床サンプルでも安定して増幅することができます。

阻害物質耐性の確認のために、患者サンプル、採血管やサンプル調製方法に由来する幅広い阻害物質に対して、NxtScript と NxtScript2Gをテストしました。Fig10は、テストに用いた各阻害物質に対するNxtScriptおよびNxtScript 2Gの検証された耐性レベルを示しています。これらの実験において、阻害物質への耐性は、Cp値のシフトが3未満であり、かつ全体の蛍光シグナルの減少が50%未満であることと定義しています。



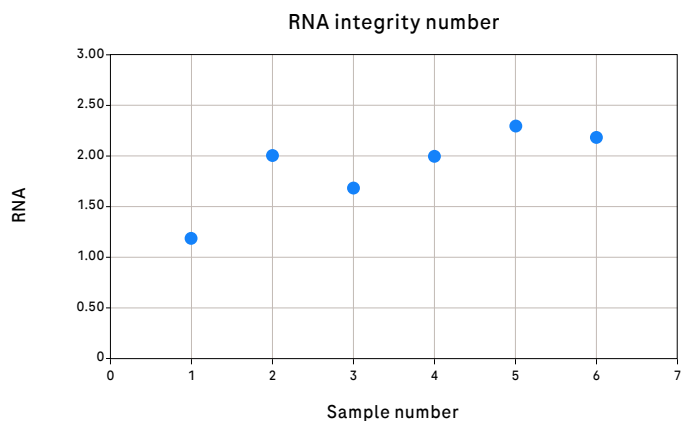
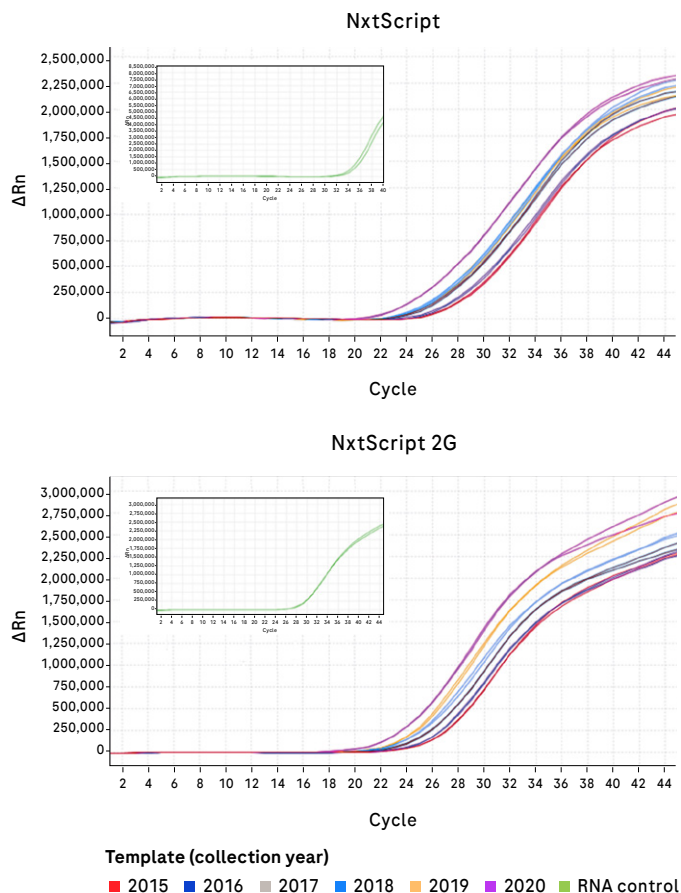
阻害物質の由来（色で区別）

- サンプル調製法に由来
- 患者サンプル、採血管等に由来

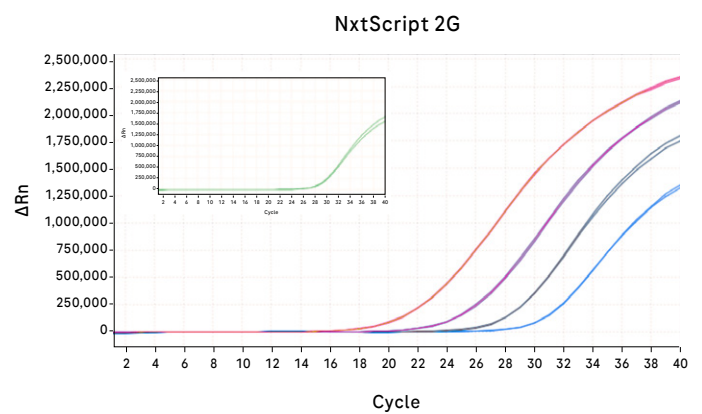
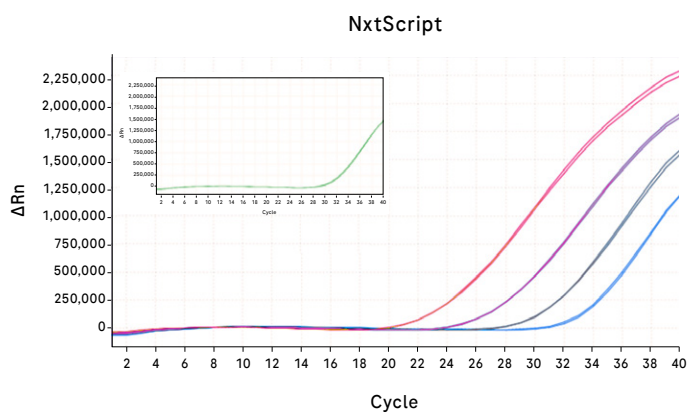
10
NxtScriptおよびNxtScript 2Gの阻害物質耐性レベル

困難な臨床サンプルの取り扱い

臨床検体はその種類により、アッセイ開発に固有の課題をもたらします。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織は、がんの病態を予測するために遺伝子発現レベルを検査するコンパニオン診断において重要な検体です。FFPEには、既知のRT-PCR阻害物質が高濃度で含まれており、また核酸抽出プロセス自体にも阻害物質を混入させる可能性があり、かつ一般的にRNA成分が高度に分解されているため、特に困難なサンプル種でもあります。そのような条件下であっても、NxtScriptおよびNxtScript 2Gは、様々な保管年数のFFPEサンプルから抽出されたRNAからcDNAを生成することができ（Fig11）、前項で定義した阻害物質耐性の当社基準内に十分に収まるCp値と蛍光レベルを示し、軽微な阻害の兆候しか示しませんでした（Fig12）。



HighPure FFPE RNA抽出キット(Roche) を使用して、異なる年に採取されたFFPEサンプルからRNAを抽出し、KAPA3G Hot Start Master MixとNxtScriptまたはNxtScript 2Gを組み合わせてRT-PCR解析を行いました。抽出されたRNA濃度はNanoDrop One分光光度計で測定し、Total RNA濃度は特定の濃度に希釈・揃えられました。RNA品質はAgilent2100 Bioanalyzerで評価し、RNA Integrity Number (RIN) は1から2.5の範囲でした。RNAの品質が低いにもかかわらず増幅性能は一貫していました。



FFPE組織サンプルから HighPure FFPE RNA Isolation kit (Roche) で抽出されたRNAの10倍希釈系列を、NxtScriptおよびNxtScript 2GとKAPA3G Hot Start Master mixを組み合わせたRT-PCRにより分析しました。10倍希釈系列においてもCp値のわずかな近接しか観察されず、これはNxtScriptおよびNxtScript 2G酵素がサンプル中に存在するいかなる阻害物質に対しても極めて耐性があることを示しています。抽出されたRNAの品質が低いにもかかわらず、両方のRTは1000倍に希釈されたサンプルにおいてcDNAを生成することができました。

- Undiluted
- 1:10
- 1:100
- 1:1000
- RNA control

12
FFPE組織抽出RNA（阻害の有無を確認するため希釈）のNxtScriptおよびNxtScript 2Gを使用したRT-PCR分析(社内評価データ)

1ステップおよび2ステップRT-PCRアッセイにおける酵素選択の重要性

1-ステップ vs. 2-ステップ RT-PCR

ターゲットに関係なく、RT-PCRアッセイの開発における最初の決定事項の1つは、1ステップまたは2ステップのプロトコルのどちらを使用するかです。1ステッププロトコルは、一般にエンドユーザーにとってより容易かつ迅速ですが、2ステッププロトコルはRTステップとPCRステップを個別に調整できるため、アッセイの最適化が容易です。Table1では、決定の支援となるよう各アプローチの利点を比較しています。

2-Step RT-PCR

最適な反応条件をサポート

- RTとPCRの各反応を最適な条件下で行えるため、効率的かつ正確な増幅が可能です。

最大限の柔軟性

- プライマーの選択 (ランダムヘキサマー, オリゴ(dT), アンカーオリゴ(dT), 配列特異的プライマー) が可能
 - シングルRTからのcDNAを複数のPCRに使用し、複数の転写産物を分析できます (例, ハウスキーピング遺伝子に対する目的遺伝子の相対的 絶対的定量)
 - より幅広く、RTおよびPCR酵素を選択できます
-

1-Step RT-PCR

所要時間を最小限に抑える

- ピペッティングを減らし操作を効率化
 - トータルアッセイ時間を大幅に短縮
-

T01

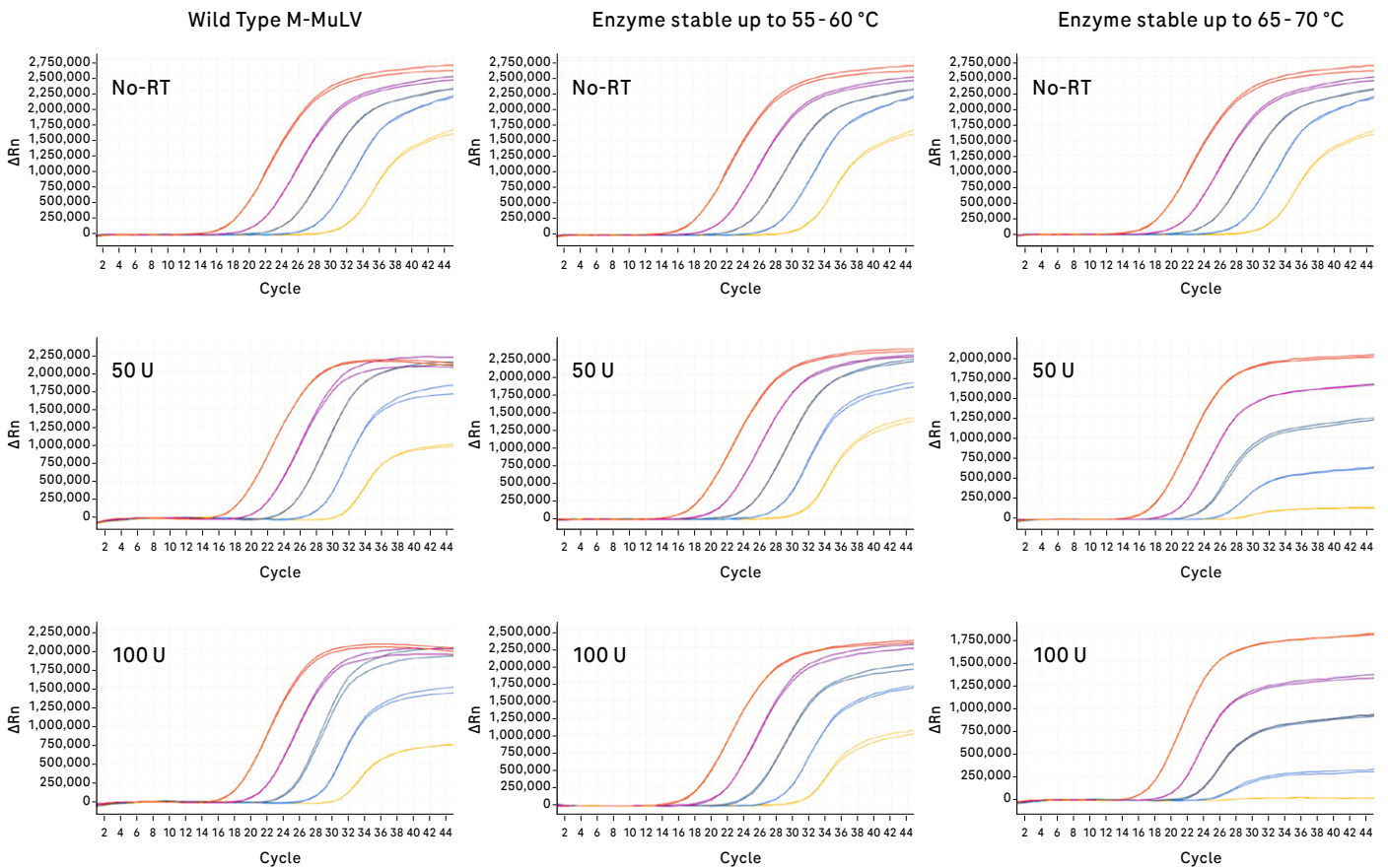
1ステップおよび2ステップRT-PCRプロトコルの利点比較

1ステップおよび2ステップRT-PCRアッセイにおけるプラットフォームの選択と酵素の熱安定性の影響

T熱安定性の変異型逆転写酵素は、高い特異性と、顕著な二次構造を持つRNA配列でも効率的に転写する性能を提供します。しかし、これらの利点には代償も伴います。サンプル中や精製方法に存在する他の化合物と同様、RT酵素はPCRに対して極めて阻害的になる可能性があります。⁸⁻¹⁰ この事実は、1ステップRT-PCRアッセイの設計を複雑にする可能性があります。熱安定性が向上すると、逆転写酵素はPCRの最初の熱変性ステップに耐え、失活しない可能性が高くなります。これは、抗体型HotStart酵素KAPA3Gやアプタマー型HotStart酵素AptaTaqのように、HotStart DNAポリメラーゼが短い活性化保持時間でも活性化される場合に特に当てはまります。

最初の熱変性/酵素活性化ステップの後に残存する逆転写酵素活性は、PCR混合液中に存在するプライマー、プローブ、テンプレート、cDNA、プライマー-テンプレート複合体、またはDNAポリメラーゼと自由に相互作用します。これらの相互作用は、極めて重要な最初の数反応サイクルにおいてPCRプロセスを阻害する可能性があります。その原因は逆転写酵素がプライマー・テンプレート複合体に結合し、DNAポリメラーゼがコピーDNA鎖を生成するのをブロックするためと推測されます。⁹⁻¹²

これらの潜在的な阻害効果をテストするために、野生型M-MuLVおよび市販の熱安定性逆転写酵素を高い濃度でqPCRアッセイに添加する実験を実施しました (Fig13)



野生型M-MuLVおよび熱安定性の異なる2種類の逆転写酵素を、濃度を上げて20 μLのqPCRアッセイに添加し、酵素によるPCRの阻害を調べました。各RTによって生成される異なるcDNA量の変化による影響を排除するために、cDNAをテンプレートとして使用しました。M-MuLVまたは55-60°Cまで安定な酵素からは軽微な阻害が観察された一方、65-70°Cまで安定な酵素を含む反応ではPCRが著しく阻害されました。

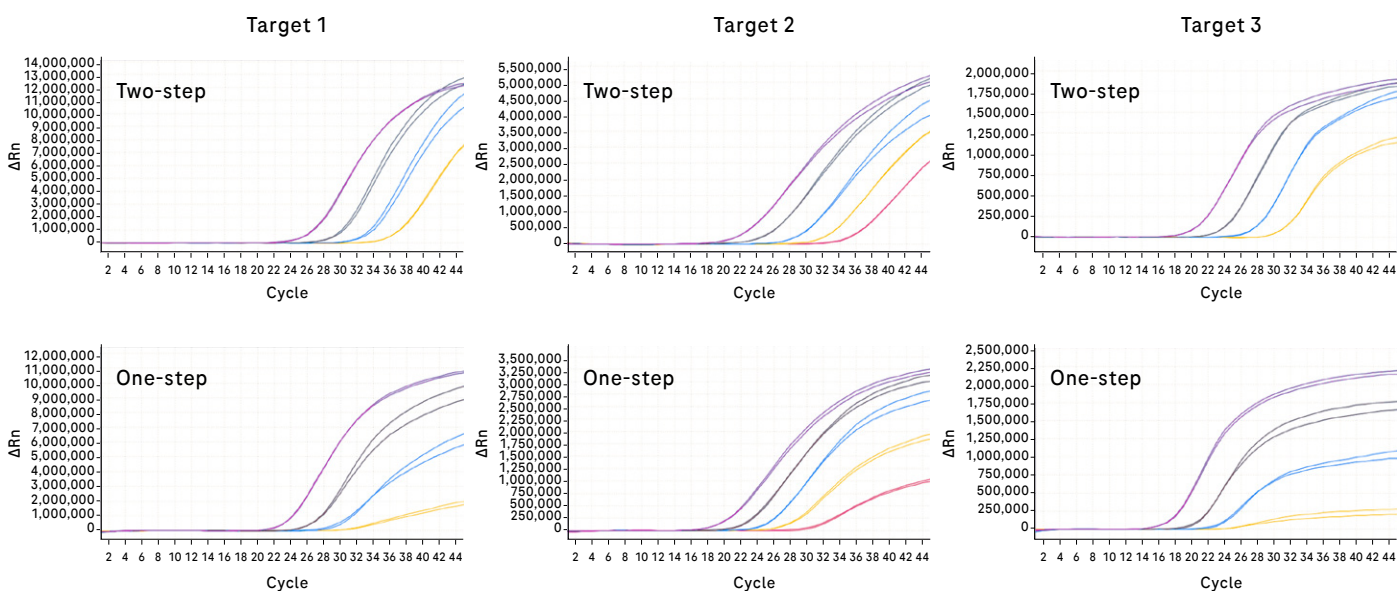
cDNA ng/reaction
■ 100 ng
■ 10 ng
■ 1 ng
■ 0.1 ng
■ 0.01 ng

高温逆転写を活用して阻害効果を克服しようとする場合、2ステップRT-PCRは1ステップと比較して優れていることが証明される可能性があります。いくつかの研究において、2ステップRT-PCRでは、RT産物をバッファー等で希釈してから使用した場合であっても、より多くのcDNAコピーの検出とより堅牢なPCRをもたらしています。実際にこの希釈ステップは、逆転写酵素を阻害性がより低くなる濃度まで減少させるため、検出能の向上に寄与したとされています。¹¹

さらに、ロボットや高度なマイクロ流体リキッドハンドリング技術、反応カートリッジ設計やリキッドハンドリングの自動化法の開発により、アッセイプロセスを効率化する唯一の方法としての1ステップRT-PCRという説得力は低くなってきています。これら議論を踏まえ、1ステップ vs 2ステップRT-PCRのプロトコルにおいて、様々なテンプレート濃度で異なるRNAターゲットの検出を比較しました。

ここでは、1ステップRT-PCRプロトコルで使用された遺伝子特異的プライマー結合は、2ステッププロトコルで使用されたランダムプライマー戦略よりも大幅に高収量のcDNAを生成しました。その結果、3つのターゲットにわたる平均Cpは、1ステッププロトコルの方が5.4低くなりました。しかし、Fig14に見られるように、2ステッププロトコルでは3つすべてのターゲットで確実な検出を示した一方、1ステップ反応では大幅なCpの優位性があったにもかかわらず、より低いテンプレート濃度において曲線の形状の著しい変化と全体的な蛍光の減少を示しました。

1ステッププロトコルの低いテンプレート濃度において確実な検出を示したのは1つのターゲットのみであり、2ステップRT-PCRプロトコルの最適化における利点と、アッセイ開発中に発生する可能性のあるターゲット特異的な問題が示されています。



2ステップおよび1ステップRT-PCRプロトコルをtriplex (3重) アッセイで比較しました。2ステッププロトコルでは、RTステップのプライミングにランダムヘキサマーを、1ステッププロトコルでは遺伝子特異的プライマーを使用しました。より多くのターゲットcDNAを生成するという点においては遺伝子特異的プライマーの方が優れた性能を示し、それがより低いCp値(非掲載、平均Cpシフト~5.4)によって証明されましたが、2ステッププロトコルでは3つすべてのターゲットでRTステップに続き低いインプットRNA濃度からの増幅が達成されました。1ステッププロトコルでは対照的に、低インプットRNA濃度において確実な増幅を示したのは1つのターゲットのみでした。

RNA ng/reaction

- 100 ng/rxn
- 10 ng/rxn
- 1 ng/rxn
- 0.1 ng/rxn
- 0.01 ng/rxn

1ステップ vs 2ステップRT-PCRプロトコルの選択に影響するその他の要因

RTに使用するプライマー戦略は、RT-PCRにおいて極めて重要な役割を果たします。RT反応をプライミングするために、主に3種のプライマー（遺伝子特異的、oligo-dT、ランダム）が使用され、場合によっては単一の反応で複数の戦略も使用されます。1ステップまたは2ステップのRT-PCRプロトコルのどちらを使用すべきかという疑問は依然として議論されており、これまでのところどちらのアプローチも他方より優れているとは結論づけられていません。議論の多くは、各手法に適用できるプライマーおよび最適化のスキームを中心に展開されています。13-17 前述のように、シンプルで効率的な1ステップRT-PCRアプローチには、2つの根本的な落とし穴があります。第1に同一の反応チューブ内では、RTステップとPCRステップを独立して最適化することができず、多くの場合、一方のステップの最適化が他方のステップの最適化を妨げます。第2に、同一チューブ内のRT-PCRでは遺伝子特異的プライマーに限定されますが、これは有用である一方で、RTステップ中にプライマーダイマーの早期形成を引き起こす可能性があり、これが1ステップと2ステップの両方のRT-PCRアッセイにおいてその後のPCRステップを複雑にする可能性があります。

しかし、これが常に当てはまるわけではなく、慎重なプライマー設計と分析によって問題が解決できる場合もあります。

2ステップRT-PCRアプローチは、より優れた最適化、より多くのプライマー選択戦略、RT産物を複数のqPCRアッセイで利用することを可能にします。しかし、それは同時により多くの時間を要し、より多くのハンドリング工程を伴います。これは、ポイント・オブ・ケア（POC）やドライアッセイの設計を複雑にします。POC環境における2ステッププロトコルは、通常、エンドユーザーによるサンプルのハンドリングを増やすか、リキッドハンドリング工程を自動化するための高価な機器を必要とします。ドライアッセイにおいて2ステッププロトコルを使用するには、少なくとも2つの別々のミックス（RTミックスとPCRミックス）の乾燥とその後の再溶解が必要となります。対照的に、ドライフォーマットにおける1ステッププロトコルは、単一のRT-PCRミックスを乾燥および再溶解することへ製造プロセスとエンドユーザー体験をシンプル化できます。

総合すると、1ステップまたは2ステップのRT-PCRアッセイを開発するには多数の要因を考慮する必要があり、適切な選択が常に明確であるとは限らないということです。

結論

M-MuLVベースの逆転写酵素であるNxtScriptファミリーは、現代の遺伝子診断アッセイでの使用に非常に適しています。酵素の選択は、1ステップまたは2ステッププロトコルの選択、ターゲットの複雑さ、サンプル精製、さらにはサンプルタイプ自体を含む多くの要因に依存します。また、酵素の熱安定性とアッセイターゲット特異的な制約との間のトレードオフも考慮しなければなりません。

ターゲットが顕著な二次構造を持つ極めて複雑なRNA配列を持つ場合、熱安定性の高い酵素はターゲットの直鎖化を向上させます。他方、あまり複雑ではないターゲットを可能な限り迅速に検出しなければならないといった場合、熱安定性は低いものの阻害性のより低い逆転写酵素の使用がより良い選択となる可能性もあります。アッセイの状況に関係なく、ロシュ・カスタムバイオテックのNxtScript製品は、迅速かつ堅牢で、凍結乾燥可能なRT-PCRアッセイのための特徴を備えています。

方法

特記なき限り、RT-PCR実験は、逆転写酵素をKAPA3G Hot Start Master mixと組み合わせた1ステップRT-PCRプロトコル、20 µLの反応ボリュームで実施されました。標準的なRTステップは、55°C、15分で構成されました。RTに続くPCRサイクリング条件をTable2にまとめます。

Standard RT-PCR protocol

Step	Temperature (°C)	Time
RT hold	55	15 minutes
Initial denaturation	95 or 98	3 minutes

Standard RT-PCR protocol

Denaturation	95	5 seconds
Extension	60	5 or 10 seconds

T02
検討に使用した基本のPCRプロトコル

オーダーインフォメーション

製品	包装	製品番号
NxtScript 2G Reverse Transcriptase, conc.	Custom fill	09 085 220 103
関連製品	包装	製品番号
Thermostable reverse transcriptases in high concentration		
NxtScript Reverse Transcriptase, conc.	custom fill	07 051 166 103
NxtScript Reverse Transcriptase, high conc.	1 MU	09 917 225 001
Lyo-ready HotStart DNA Polymerases & Masters		
KAPA3G HotStart DNA Polymerase, Glycerol-free, 30 U/μL	custom fill	08 918 651 103
KAPA3G HotStart Master	custom fill	09 084 711 103
AptaTaq DNA Polymerase, 50 U/μl	custom fill	05 187 605 103
AptaTaq Genotyping Master	custom fill	05 890 152 103

References

- Baranauskas, A. et al. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Engineering, Design and Selection* 25, 657–668 (2012).
- Arezi, B. & Hogrefe, H. Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer. *Nucleic Acids Res* 37, 473–481 (2009).
- Arezi, B., McCarthy, M. & Hogrefe, H. Mutant of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase exhibits higher resistance to common RT-qPCR inhibitors. *Anal Biochem* 400, 301–303 (2010).
- Yasukawa, K., Mizuno, M., Konishi, A. & Inouye, K. Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis. *J Biotechnol* 150, 299–306 (2010).
- Vagenende, V., Yap, M. G. S. & Trout, B. L. Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. *Biochemistry* 48, 11084–11096 (2009).
- Panina, Y., Germond, A., Masui, S. & Watanabe, T. M. Validation of Common Housekeeping Genes as Reference for qPCR Gene Expression Analysis During iPSC Reprogramming Process. *Scientific Reports* 8, 8716 (2018).
- Paik, S. et al. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 351, 2817–2826 (2004).
- Sellner, L. N., Coelen, R. J. & Mackenzie, J. S. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res* 20, 1487–1490 (1992).
- Suslov, O. & Steindler, D. A. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Res* 33, e181 (2005).
- Chandler, D. P., Wagnon, C. A. & Bolton, H. Reverse Transcriptase (RT) Inhibition of PCR at Low Concentrations of Template and Its Implications for Quantitative RT-PCR. *Appl Environ Microbiol* 64, 669–677 (1998).
- Levesque-Sergerie, J.-P., Duquette, M., Thibault, C., Delbecchi, L. & Bissonnette, N. Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* 8, 93 (2007).
- Miranda, J. A. & Steward, G. F. Variables influencing the efficiency and interpretation of reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR): An empirical study using Bacteriophage MS2. *J Virol Methods* 241, 1–10 (2017).
- Bustin, S. A. & Nolan, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 15, 155–166 (2004).
- Ståhlberg, A., Håkansson, J., Xian, X., Semb, H. & Kubista, M. Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clinical Chemistry* 50, 509–515 (2004).
- Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1, 1559–1582 (2006).
- Ståhlberg, A., Kubista, M. & Pfaffl, M. Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clin Chem* 50, 1678–1680 (2004).
- Wacker, M. J. & Godard, M. P. Analysis of One-Step and Two-Step Real-Time RT-PCR Using SuperScript III. *J Biomol Tech* 16, 266–271 (2005).

Regulatory disclaimer

For further processing only.

Trademark

NXTSCRIPT is a trademark of Roche.

© 2023

All rights reserved.

Published by

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany

custombiotech.roche.com

[お近くのカスタムバイオテック担当者へ
ご連絡ください](#)

Japan

japan.custombiotech@roche.com
<https://custombiotech-roche.jp>