RT-PCR 効率の向上
逆転写反応時間の短縮で
迅速な遺伝子検査を実現する

November 2024

Alexander Latta, Ph.D, Roche Diagnostics Corporation

迅速な遺伝子ポイントオブケア(mPOC)検査の開発は容易ではありません。従来のRT-PCRプロトコルは感度と特異性に優れていますが、患者さんの診察での待機時間を最小限に抑えたいというmPOCの要求(15～30分での結果提供)を満たすには、ターンアラウンドタイムが長すぎるという課題があります。RT-PCRによるRNA検出では、逆転写(RT)と増幅の2つのステップを最適化する必要があります。本稿では第一のステップであるRTステップに焦点を当てます。短時間でターゲットRNAを増幅可能なDNAへ確実に変換することは、依然として大きな挑戦です。

従来の方法では、5～15分の逆転写反応時間を要しますが、これは迅速POC検査には長すぎます。5分を大幅に下回る逆転写反応時間でも、検出に十分なcDNAを生成できる逆転写酵素が必要です。

本稿では、Roche CustomBiotechの逆転写酵素を用いることで、短い逆転写反応ステップをどのように実現することができるかを解説します。

短い反応時間でも優れた性能を発揮するカスタムバイオテックの逆転写酵素

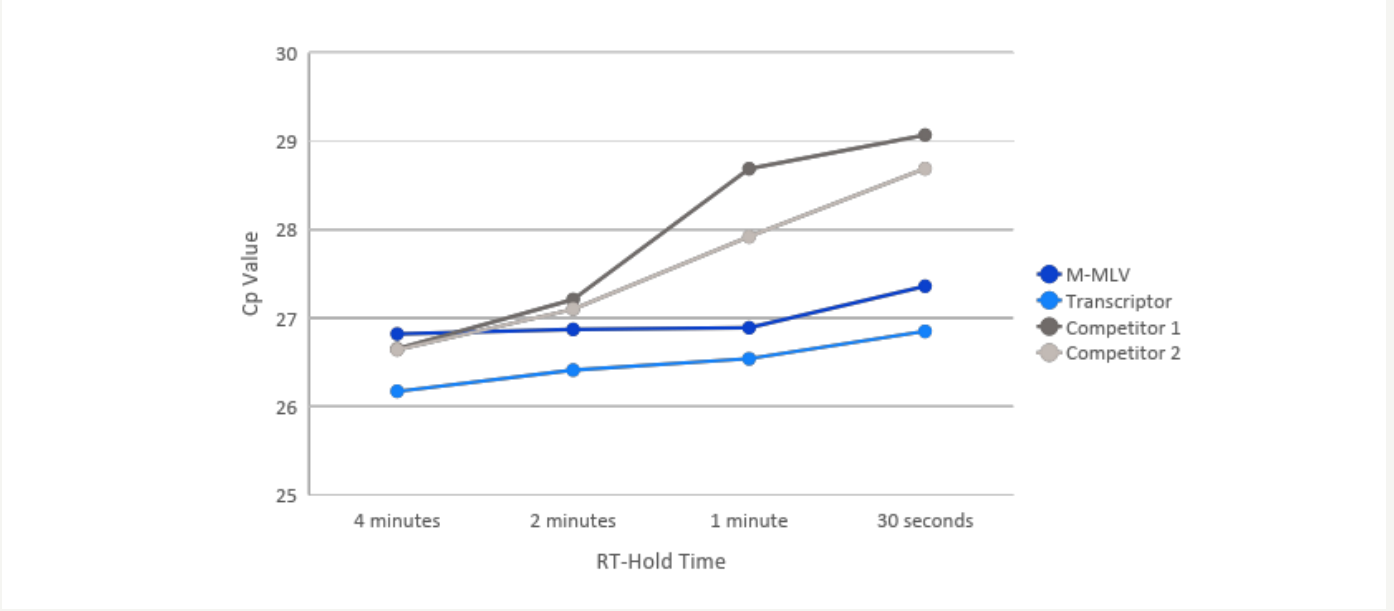
逆転写反応時間が長いことは、1ステッププロトコルを含むRT-PCRを用いた迅速なmPOCアッセイにおける障壁のひとつとなっています。多くのポイントオブケア（POC）アッセイ設計者の主要な目標の1つは、全体のターンアラウンドタイムをできるだけ短くすることであり、1分1秒が重要です。当然のことながら、今までもアッセイの性能を犠牲にすることなく逆転写反応時間を短縮する取り組みが行われてきました。

短い逆転写反応時間の条件下でも機能することが実証されている酵素を使用することは、反応時間を短縮するための方法のひとつです。 ロシュ・カスタムバイオテックは、M-MLVやTranscriptorなどの、野生型酵素や高性能ミュータント酵素を提供しており、これらはすべて反応時間の退縮という要求を満たすことができます。

Figure 1 は、異なる逆転写反応時間で得られたCp値の差を示しています。4分の時点では、Cp値がほぼ一致していることからわかるように、4種類の酵素すべてがほぼ同量のcDNAを生成しました。逆転写反応時間を短縮すると、ロシュのM-MLVとTranscriptor RTは高いレベルのcDNA合成量を維持しましたが、競合酵素はCp値低下からわかるように、cDNA合成の大幅な減少を示しました。

逆転写反応時間を4分から30秒に短縮した場合、ロシュの酵素はいずれもCp値が1.1～1.2変化し、cDNA生成量が約2～2.5倍減少しました。一方、競合酵素は、同じ2つのポイントでCp値が2.5～3と大きく変化し、cDNA生成量が5.5～8倍減少しました。

Figure 1:



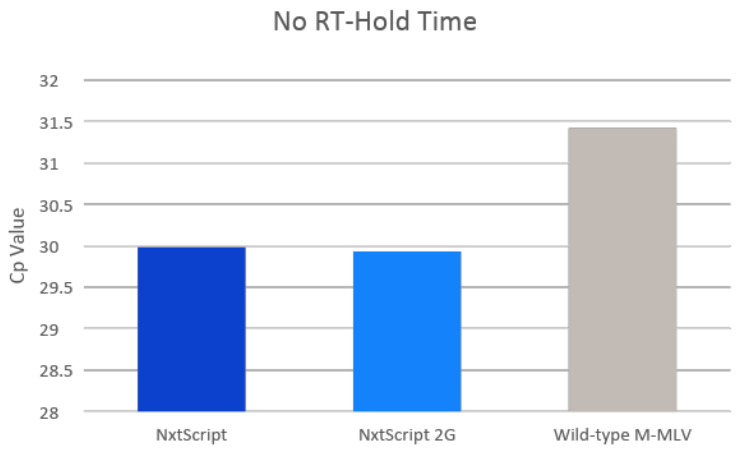
ロシュのM-MLVおよびTranscriptor RT、2つの競合逆転写酵素における様々な逆転写反応時間を用いたCp値の比較

RT反応ステップなしでも機能するカスタムバイオテックのNxtScript 逆転写酵素

逆転写反応時間を30秒まで短縮することは、mPOCのターンアラウンドタイムを短縮する上で大きな前進です。とはいえ、現場では1秒たりとも無駄にできません。そこで、ロシュの酵素が従来の逆転写反応ステップなしでもターゲットRNAを増幅可能なDNAに変換できるかをテストしました。興味深いことに、NxtScript RT、NxtScript 2G RT、および比較製品である野生型M-MLVはすべて、保持時間ゼロという厳しい条件下でも検出可能な量のcDNAを生成することができました。

しかしながら、Figure 2 に示すように、M-MLVベースの次世代型ミュータント酵素であるNxtScriptおよびNxtScript 2Gは、野生型M-MLVと比較して優れた性能を示しました。これらの逆転写酵素は、野生型酵素に比べて1～1.5 Cpの明確な優位性を示し、少なくとも2倍の量のcDNA生成が可能であることが示されました。

Figure 2:



NxtScript、NxtScript 2G、および野生型M-MLVについて、逆転写ステップを省略した場合に得られたCp値

結論

遺伝子POCアッセイの所要時間を短縮することは容易ではありません。PCRのみのアッセイと比較して、RT-PCRアッセイでは逆転写 (RT) ステップが加わるため、この課題はさらに難しいものとなります。こうした課題を克服するために、ロシュ・カスタムバイオテックは、M-MLV RT、Transcriptor RT、NxtScript RT、NxtScript 2G RTなど、高速反応が可能でターンアラウンドタイムを短縮する可能性をもつ幅広い逆転写酵素を提供しています。

オーダーインフォメーション

製品	包装	製品番号
M-MLV RT GMP Grade	200 kU	04707486103
Transcriptor Reverse Transcriptase	Custom Fill	03531252103
NxtScript Reverse Transcriptase	Custom Fill	07051166103
NxtScript 2G Reverse Transcriptase	Custom Fill	09085220103
関連製品		
KAPA3G HotStart Master Mix	Custom Fill	09084711103
AptaTaq Genotyping Master	Custom Fill	05890152103

SCAN ME

Interested in learning about other ways our reverse transcriptases or other CustomBiotech enzymes can reduce turnaround time or simplify your assay design process?

Follow the QR code below to find more information on our website.

Regulatory Disclaimer
For further processing only.

AptaTaq Genotyping Master:
For further processing into IVD products and medical devices only.

Transcriptor Reverse Transcriptase:
For customers in the European Economic Area:
Contains SVHC: octyl/nonylphenol ethoxylates.
For further processing on its own or in a mixture as part of an IVD method and under controlled conditions only acc. to Art. 56 (3) and 3 no. 23 REACH Regulation.

Trademarks
APTATAQ, KAPA and NXTSCRIPT are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

© 2026

Published by
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒 108-0075
東京都港区港南1-2-70

JP: custombiotech-roche.jp
Global: custombiotech.roche.com

お近くのカスタムバイオテック担当者へ
お問い合わせください

Japan
japan.custombiotech@roche.com