

QuantiTect[®] Virus

プロトコールとトラブルシューティング

QuantiTect Virus Kit

QuantiTect Virus +ROX Vial Kit

ウイルスDNA/RNAおよびインターナルコントロール
検出用

配列特異的なプローブを用いた高感度な
リアルタイムシングル/マルチプレックスPCRおよび
1ステップRT-PCR



目次

QuantiTect Virus Kit プロトコール

1 : ABI 7000、7300、7700、7900HT System 上での Single および Duplex 解析 3

2 : ABI 7000、7300、7700、7900HT System 上での Triplex 解析 7

QuantiTect Virus +ROX Vial Kit プロトコール

3 : Applied Biosystems 7500 やその他のサイクラー上での Single および Duplex 解析 (ROX 付きあるいは ROX 無し) 11

4 : Applied Biosystems 7500 やその他のサイクラー上での Triplex あるいは 4plex 解析 (ROX 付きあるいは ROX 無し) 15

トラブルシューティング 19

プロトコール 1 : ABI 7000、7300、7700、7900HT System 上での Single および Duplex 解析

本プロトコールは、Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System を除く Applied Biosystems のサイクラーで TaqMan® プローブと共に QuantiTect® Virus Kit を使用するよう至適化されています。詳細は英語版 Handbook 12 ページ、“ROX passive reference dye” を参照ください。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールに記載のサイクリング条件で常に実験を始めます。サイクリングは 60 ~ 150 bp の PCR 産物に至適化されています。150 bp より大きい PCR 産物に関しては、異なるサイクリング条件で結果が改善することがあります。詳細は英語版 Handbook 53 ページ、Appendix A を参照してください。
- このプロトコールに記載されているプライマー濃度をご利用ください。
- マルチプレックス・アッセイで同時に複数の反応を行なう前に、個々の反応でプライマー/プローブ・セットのパフォーマンスをテストすることをお勧めします。
- 英語版 Handbook 16 ~ 19 ページ、“Guidelines for effective multiplex assays” をお読みください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム・サイクラーと適合していることをチェックしてください。
- リアルタイム・サイクラーのユーザーマニュアルをチェックしてマルチプレックス解析用のセットアップを正しく行なってください（例；同じウェルから複数の色素を検出するための設定）。用いるレポーター色素毎に検出プログラムを設定してください。機器によっては初めて使用する前にレポーター色素ごとにキャリブレーション操作が必要になることがあります。
- 既に確立されている duplex リアルタイム・アッセイを用いる場合には、確立したプライマーおよびプローブ濃度と、このプロトコールに記載されているサイクリング条件を組み合わせてください。プライマー濃度を決め直す必要はありません。
- 逆転写反応後、HotStarTaq® Plus DNA Polymerase を活性化させるために、95 5 分の最初のインキュベーションステップから PCR を始めます。
- 正確な定量データのためには最適解析設定が必須条件の一つです。データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、設定値（ベースラインと threshold 値など）を常に再設定する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲットごとに、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20xプライマー/プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版 Handbook 60ページ、Appendix Dをご覧ください。あるいは、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。この方法で反応セットアップを行なう場合には、英語版 Handbook 62ページ Appendix Eをご覧ください。

操作手順

1. **QuantiTect Virus Master Mix**、プライマーおよびプローブ溶液、**RNase** フリー水、テンプレート核酸（精製したウイルス核酸）、オプションのスタンダード、およびリファレンスを解凍する。各溶液を混和する。

反応あたり 5 ~ 10 μ l で使用できるよう、スタンダードを QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer を用いて適切な濃度に希釈します。

2. 表 11（5ページ）に従って反応の数に必要な容量の反応ミックスを調製する。反応ミックスの容量は実験に必要なトータル容量の 10% 増しになるように調製する。

通常、反応セットアップは室温（15 ~ 25 $^{\circ}$ C）で行なえます。しかし、試薬、サンプル、コントロールを氷上あるいは冷却装置に置くことをお奨めします。

注：RT-PCR に関しては、QuantiTect Virus RT Mix は使用直前に -15 ~ -30 $^{\circ}$ C から取り出して常に氷上に置き、使用後は迅速に -15 ~ -30 $^{\circ}$ C に戻してください。

3. 反応ミックスを完全に混和し、**PCR** チューブあるいは **PCR** プレートのウェルに適切な量を分注する。
4. テンプレート核酸を各 **PCR** チューブあるいはウェルに添加し、完全に混和する。
注：反応ミックスおよびテンプレートは完全に混和してください。
5. 表 12（6ページ）に従ってリアルタイムサイクラーのプログラミングを行なう。

表 11. singleあるいはduplex解析用反応ミックス

成分	容量 / 50 µl 反応 *	最終濃度
反応ミックス		
QuantiTect Virus Master Mix, 5x	10 µl	1x
20x プライマー / プローブ・ ミックス 1 [†]	2.5 µl	0.4 µM forward primer 1 [†] 0.4 µM reverse primer 1 [†] 0.2 µM probe 1 [‡]
20x プライマー / プローブ・ ミックス 2 [†]	2.5 µl	0.4 µM forward primer 2 [†] 0.4 µM reverse primer 2 [†] 0.2 µM probe 2 [‡]
RT-PCRのみ: QuantiTect Virus RT Mix, 100x	0.5 µl	1x
RNase フリー水	適量	-
DNA/RNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	最終反応容量の最高50%まで
トータル容量 / 反応	50 µl*	-

* 使用するリアルタイムサイクラーが50 µl以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節してください。

[†] ターゲット毎に、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20x プライマー / プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版 Handbook 60 ページ、Appendix D をご覧ください。

[‡] 最終プライマー濃度は0.4 µMが最適です。プライマー濃度を調節する前に、プライマー溶液の濃度を確認してください。

[§] 最終プローブ濃度は0.2 µMでほとんどの場合満足できる結果が得られます。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によりますが、最適濃度は0.1 µM ~ 0.4 µMの間です。

表 12. single あるいは duplex 解析用サイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
RT-PCRのみ： 逆転写反応	20分	50	RNAはcDNAに逆転写される。DNAターゲットを解析する際はこのステップを省略する。
PCR初期活性化 ステップ	5分	95	HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこのヒーティングステップで活性化される。
2ステップサイクリング：			重要：以下のサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる。
変性	15秒	95	
アニ - リング / エクステンション	45秒	60	150 bpまでのPCR産物に至適化されたアニ - リング / エクステンション・ステップと蛍光データ収集の組み合わせ。150 bpより大きいPCR産物に関しては、異なるサイクリング条件で結果が改善される場合もある。詳細は英語版 Handbook 53 ページ、Appendix A を参照。
サイクル数：	40 ~ 50		サイクル数はテンプレートDNA/RNA量に依存。

- リアルタイム・サイクラーにPCRチューブあるいはプレートを設定し、PCRサイクリング・プログラムをスタートする。
- データ解析を行なう。

データ解析を実施する前に、解析の設定を行ないます。解析設定（ベースラインとthreshold値など）は各プローブごとに行ないます。正確な定量データを得るためには、最適な解析設定が必須条件の一つです。

プロトコール 2 : ABI 7000、7300、7700、7900HT System 上での Triplex 解析

本プロトコールは、**Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**を除く Applied Biosystems のサイクラーと TaqMan プローブと共に QuantiTect Virus Kit を使用するために至適化されています。詳細は英語版 Handbook 12 ページ、“ROX passive reference dye”を参照ください。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールに記載のサイクリング条件で常に実験を始めます。このサイクリング条件は duplex アッセイ・プロトコール (3 ページ) で記載されているサイクリング条件とは異なります。サイクリングは 60 ~ 150 bp の PCR 産物に至適化されています。150 bp より大きい PCR 産物に関しては、異なるサイクリング条件で結果が改善することがあります。詳細は英語版 Handbook 53 ページ、Appendix A を参照してください。
- このプロトコールに記載されているプライマー濃度を使用してください。このプライマー濃度は duplex アッセイ・プロトコール (3 ページ) で記載されているプライマー濃度とは異なります。
- マルチプレックス・アッセイで同時に複数の反応を行なう前に、個々の反応でプライマー/プローブ・セットのパフォーマンスをテストすることをお勧めします。
- 英語版 Handbook 16 ~ 19 ページ、“Guidelines for effective multiplex assays”をお読みください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム・サイクラーと適合していることをチェックしてください。
- 既に確立されている multiplex リアルタイム・アッセイを用いる場合には、確立したプライマーおよびプローブ濃度と、このプロトコールに記載されているサイクリング条件を組み合わせてください。プライマー濃度を決め直す必要はありません。
- 逆転写反応後、**HotStarTaq Plus DNA Polymerase**を活性化させるために、**95 5分**の最初のインキュベーションステップから PCR を始めます。
- 正確な定量データのためには最適な解析設定が必須条件の一つです。データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、設定値 (ベースラインと threshold 値など) を常に再設定する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲットごとに、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ 20x プライマー/プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版 Handbook 60 ページ、Appendix D をご覧ください。あるいは、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。この方法で反応セットアップを行なう場合には、英語版 Handbook 62 ページ Appendix E をご覧ください。

操作手順

- 1. QuantiTect Virus Master Mix、プライマーおよびプローブ溶液、RNase フリー水、**
テンプレート核酸（精製したウイルス核酸）、オプションのスタンダード、お
よびリファレンスを解凍する。各溶液を混和する。
反応あたり 5 ~ 10 µl で使用できるよう、スタンダードを QuantiTect Nucleic
Acid Dilution Buffer を用いて適切な濃度に希釈します。
- 2. 表 13（9 ページ）に従って反応の数に必要な容量の反応ミックスを調製する。**
反応ミックスの容量は実験に必要なトータル容量の 10 % 増しになるように調
製する。
通常、反応セットアップは室温（15 ~ 25 °C）で行いません。しかし、試薬、
サンプル、コントロールを氷上あるいは冷却装置に置いておくことをお奨めし
ます。
注：RT-PCR に関しては、QuantiTect Virus RT Mix は使用直前に -15 ~ -30 °C
から取り出して常に氷上に置き、使用後は迅速に -15 ~ -30 °C に戻してくだ
さい。
- 3. 反応ミックスを完全に混和し、PCR チューブあるいは PCR プレートのウェルに**
適切な量を分注する。
注：チューブあるいはプレートを氷上に置きます。
- 4. テンプレート核酸を各 PCR チューブあるいはウェルに添加し、完全に混和する。**
注：反応ミックスおよびテンプレートは完全に混和してください。
- 5. 表 14（10 ページ）に従ってリアルタイムサイクラーのプログラミングを行**
なう。

表 13. triplex 解析用の反応ミックス

成分	容量 / 50 µl 反応 *	最終濃度
反応ミックス		
QuantiTect Virus Master Mix, 5x	10 µl	1x
20x プライマー / プローブ・ ミックス 1 [†]	2.5 µl	0.2 µM forward primer 1 [†] 0.2 µM reverse primer 1 [†] 0.2 µM probe 1 [‡]
20x プライマー / プローブ・ ミックス 2 [†]	2.5 µl	0.2 µM forward primer 2 [†] 0.2 µM reverse primer 2 [†] 0.2 µM probe 2 [‡]
20x プライマー / プローブ・ ミックス 3 [†]	2.5 µl	0.2 µM forward primer 3 [†] 0.2 µM reverse primer 3 [†] 0.2 µM probe 3 [‡]
RT-PCRのみ : QuantiTect Virus RT Mix, 100x	0.5 µl	1x
RNase フリー水	適量	-
DNA/RNA テンプレート (ステップ 4 で添加)	適量	最終反応容量の最高 50% まで
トータル容量 / 反応	50 µl*	-

* 使用するリアルタイムサイクラーが 50 µl 以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節してください。

[†] ターゲット毎に、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ 20x プライマー / プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版 Handbook 60 ページ、Appendix D をご覧ください。

[‡] 最終プライマー濃度は 0.2 µM が最適です。プライマー濃度を調節する前に、プライマー溶液の濃度を確認してください。0.1 µM ~ 0.3 µM のプライマー濃度で結果が改善されることがあります。

[§] 最終プローブ濃度は 0.2 µM でほとんどの場合満足できる結果が得られます。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によりますが、最適濃度は 0.1 µM ~ 0.4 µM の間です。

表 14. triplex 解析用の反応ミックス

ステップ	時間	温度	コメント
RT-PCRのみ： 逆転写反応	20分	50	RNAはcDNAに逆転写される。DNAターゲットを解析する際はこのステップを省略する。
PCR初期活性化 ステップ	5分	95	HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこのヒーティングステップで活性化される。
2ステップサイクリング：			重要：以下のサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる。
変性	15秒	95	
アニ - リング/ エクステンション	75秒	60	150 bpまでのPCR産物に至適化されたアニ - リング/エクステンション・ステップと蛍光データ収集の組み合わせ。150 bpより大きいPCR産物に関しては、異なるサイクリング条件で結果が改善される場合もある。詳細は英語版 Handbook 53 ページ、Appendix A を参照。
サイクル数：	40 ~ 50		サイクル数はテンプレートDNA/RNA量に依存。

- リアルタイム・サイクラーにPCRチューブあるいはプレートを設定し、PCRサイクリング・プログラムをスタートする。
- データ解析を行なう。

データ解析を実施する前に、解析の設定を行ないます。解析設定（ベースラインとthreshold値など）は各プローブごとに行ないます。正確な定量データを得るためには、最適な解析設定が必須条件の一つです。

プロトコール3：Applied Biosystems 7500やその他のサイクラー上でのSingleおよびDuplex解析（ROX付きあるいはROX無し）

本プロトコールは、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR SystemでTaqManプローブとQuantiTect Virus +ROX Vial Kitの組み合わせ、およびBio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Corbett Research、Roche®、Stratagene®のサイクラー上でROX色素を使用しない解析用に至適化されています。詳細は英語版Handbook 12ページ、“ROX passive reference dye”を参照ください。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールに記載のサイクリング条件で常に実験を始めます。サイクリングは60～150 bpのPCR産物に至適化されています。150 bpより大きいPCR産物に関しては、異なるサイクリング条件で結果が改善することがあります。詳細は英語版Handbook 53ページ、Appendix Aを参照してください。
- このプロトコールに記載されているプライマー濃度を使用してください。
- マルチプレックス・アッセイで同時に複数の反応を行なう前に、個々の反応でプライマー/プローブ・セットのパフォーマンスをテストすることをお勧めします。
- 英語版Handbook 16～19ページ、“Guidelines for effective multiplex assays”をお読みください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム・サイクラーと適合していることをチェックしてください。
- 既に確立されているduplexリアルタイム・アッセイを用いる場合には、確立したプライマーおよびプローブ濃度と、このプロトコールに記載されているサイクリング条件を組み合わせてください。プライマー濃度を決め直す必要はありません。
- 逆転写反応後、**HotStarTaq Plus DNA Polymerase**を活性化させるために、**95** 5分の最初のインキュベーションステップから**PCR**を始めます。
- 正確な定量データのためには最適な解析設定が必須条件の一つです。データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、設定値（ベースラインとthreshold値など）を常に再設定する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲットごとに、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20xプライマー/プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版Handbook 60ページ、Appendix Dをご覧ください。あるいは、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。この方法で反応セットアップを行なう場合には、英語版Handbook 62ページAppendix Eをご覧ください。

操作手順

1. **QuantiTect Virus NR Master Mix**、**50x ROX Dye Solution**、プライマーおよびプローブ溶液、**RNase** フリー水、テンプレート核酸（精製したウイルス核酸）、オプションのスタンダード、およびリファレンスを解凍する。各溶液を混和する。反応あたり 5 ~ 10 μ l で使用できるように、スタンダードを QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer を用いて適切な濃度に希釈します。
2. 表 15（13 ページ）に従って反応の数に必要な容量の反応ミックスを調製する。反応ミックスの容量は実験に必要なトータル容量の 10 % 増しになるように調製する。

通常、反応セットアップは室温（15 ~ 25 $^{\circ}$ C）で行ないます。しかし、試薬、サンプル、コントロールを氷上あるいは冷却装置に置いておくことをお奨めします。

注：RT-PCR に関しては、QuantiTect Virus RT Mix は使用直前に -15 ~ -30 $^{\circ}$ C から取り出して常に氷上に置き、使用後は迅速に -15 ~ -30 $^{\circ}$ C に戻してください。
3. 反応ミックスを完全に混和し、PCR チューブあるいは PCR プレートのウェルに適切な量を分注する。
4. テンプレート核酸を各 PCR チューブあるいはウェルに添加し、完全に混和する。

注：反応ミックスおよびテンプレートは完全に混和してください。
5. 表 16（14 ページ）に従ってリアルタイムサイクラーのプログラミングを行なう。

表 15. singleあるいはduplex解析用反応ミックス

成分	容量 / 反応		最終濃度
	50 μ l*	20 μ l*†	
反応ミックス			
QuantiTect Virus NR Master Mix、 5x	10 μ l	4 μ l	1x
50x ROX Dye Solution†	1.0 μ l	0.4 μ l	1x
20x プライマー / プローブ・ ミックス 1§	2.5 μ l	1.0 μ l	0.4 μ M forward primer 1¶ 0.4 μ M reverse primer 1¶ 0.2 μ M probe 1**
20x プライマー / プローブ・ ミックス 2§	2.5 μ l	1.0 μ l	0.4 μ M forward primer 2¶ 0.4 μ M reverse primer 2¶ 0.2 μ M probe 2**
RT-PCRのみ： QuantiTect Virus RT Mix、 100x	0.5 μ l	0.2 μ l	1x
RNase フリー水	適量	適量	–
DNA/RNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	適量	最終反応容量の 最高50%まで
トータル容量 / 反応	50 μ l*	20 μ l*†	–

* 使用するリアルタイムサイクラーが50 μ lあるいは20 μ l以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節してください。

† Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systemの場合。

‡ ROX色素が不要なサイクラーでは、代わりにRNaseフリー水を添加します。

§ ターゲット毎に、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20xプライマー / プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版 Handbook 60ページ、Appendix Dをご覧ください。

¶ 最終プライマー濃度は0.4 μ Mが最適です。プライマー濃度を調節する前に、プライマー溶液の濃度を確認してください。

** 最終プローブ濃度は0.2 μ Mでほとんどの場合満足できる結果が得られます。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によりますが、最適濃度は0.1 μ M ~ 0.4 μ Mの間です。

表 16. singleあるいはduplex解析用サイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
RT-PCRのみ： 逆転写反応	20分	50	RNAはcDNAに逆転写される。DNAターゲットを解析する際はこのステップを省略する。
PCR初期活性化 ステップ	5分	95	HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこのヒーティングステップで活性化される。
2ステップサイクリング：			重要：以下のサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる。
変性	15秒	95	
アニ - リング/ エクステンション	45秒	60	150 bpまでのPCR産物に至適化されたアニ - リング/エクステンション・ステップと蛍光データ収集の組み合わせ。150 bpより大きいPCR産物に関しては、異なるサイクリング条件で結果が改善される場合もある。詳細は英語版 Handbook 53 ページ、Appendix A を参照。
サイクル数：	40 ~ 50		サイクル数はテンプレートDNA/RNA量に依存。

- リアルタイム・サイクラーにPCRチューブあるいはプレートを設定し、PCRサイクリング・プログラムをスタートする。
- データ解析を行なう。

データ解析を実施する前に、解析の設定を行ないます。解析設定（ベースラインとthreshold値など）は各プローブごとに行ないます。正確な定量データを得るためには、最適な解析設定が必須条件の一つです。

プロトコール4：Applied Biosystems 7500やその他のサイクラー上でのTriplexあるいは4plex解析（ROX付きあるいはROX無し）

本プロトコールは、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR SystemでTaqManプローブとQuantiTect Virus +ROX Vial Kitの組み合わせ、およびBio-Rad/MJ Research、Cepheid、Corbett Research、Roche、Stratageneのサイクラー上でROX色素を使用しない解析用に至適化されています。詳細は英語版 Handbook 12ページ、“ROX passive reference dye”を参照ください。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールに記載のサイクリング条件で常に実験を始めます。このサイクリング条件はduplexアッセイ・プロトコール（11ページ）に記載されているサイクリング条件とは異なります。サイクリングは60～150 bpのPCR産物に至適化されています。150 bpより大きいPCR産物に関しては、異なるサイクリング条件で結果が改善することがあります。詳細は英語版 Handbook 53ページ、Appendix Aを参照してください。
- このプロトコールに記載されているプライマー濃度を使用してください。このプライマー濃度はduplexアッセイ・プロトコール（11ページ）に記載されているプライマー濃度とは異なります。
- マルチプレックス・アッセイで同時に複数の反応を行なう前に、個々の反応でプライマー/プローブ・セットのパフォーマンスをテストすることをお勧めします。
- 英語版 Handbook 16～19ページ、“Guidelines for effective multiplex assays”をお読みください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム・サイクラーと適合していることをチェックしてください。
- 既に確立されているmultiplexリアルタイム・アッセイを用いる場合には、確立したプライマーおよびプローブ濃度と、このプロトコールに記載されているサイクリング条件を組み合わせてください。プライマー濃度を決め直す必要はありません。
- 逆転写反応後、**HotStarTaq Plus DNA Polymerase**を活性化させるために、**95** 5分の最初のインキュベーションステップから**PCR**を始めます。
- 正確な定量データのためには最適な解析設定が必須条件の一つです。データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、設定値（ベースラインとthreshold値など）を常に再設定する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲットごとに、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20xプライマー/プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版 Handbook 60ページ、Appendix Dをご覧ください。あるいは、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。この方法で反応セットアップを行なう場合には、英語版 Handbook 62ページ Appendix Eをご覧ください。

操作手順

1. **QuantiTect Virus NR Master Mix**、プライマーおよびプローブ溶液、**RNase**フリー水、テンプレート核酸（精製したウイルス核酸） オプションのスタンダード、およびリファレンスを解凍する。各溶液を混和する。

反応あたり5～10 µlで使用できるよう、スタンダードを QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer を用いて適切な濃度に希釈します。

2. 表 17（17ページ）に従って反応の数に必要な容量の反応ミックスを調製する。反応ミックスの容量は実験に必要なトータル容量の10%増しになるように調製する。

通常、反応セットアップは室温（15～25℃）で行ないます。しかし、試薬、サンプル、コントロールを氷上あるいは冷却装置に置いておくことをお奨めします。

注：RT-PCRに関しては、QuantiTect Virus RT Mixは使用直前に-15～-30℃から取り出して常に氷上に置き、使用後は迅速に-15～-30℃に戻してください。

3. 反応ミックスを完全に混和し、**PCR**チューブあるいは**PCR**プレートのウェルに適切な量を分注する。
4. テンプレート核酸を各**PCR**チューブあるいはウェルに添加し、完全に混和する。
注：反応ミックスおよびテンプレートは完全に混和してください。
5. 表 18（18ページ）に従ってリアルタイムサイクラーのプログラミングを行なう。

表 17. triplexあるいは4plex解析用の反応ミックス

成分	容量 / 反応		最終濃度
	50 μ l*	20 μ l*†	
反応ミックス			
QuantiTect Virus NR Master Mix、5x	10 μ l	4 μ l	1x
50x ROX Dye Solution†	1.0 μ l	0.4 μ l	1x
20x プライマー / プローブ・ ミックス1§	2.5 μ l	1.0 μ l	0.2 μ M forward primer 1 [¶] 0.2 μ M reverse primer 1 [¶] 0.2 μ M probe 1**
20x プライマー / プローブ・ ミックス2§	2.5 μ l	1.0 μ l	0.2 μ M forward primer 2 [¶] 0.2 μ M reverse primer 2 [¶] 0.2 μ M probe 2**
20x プライマー / プローブ・ ミックス3§	2.5 μ l	1.0 μ l	0.2 μ M forward primer 3 [¶] 0.2 μ M reverse primer 3 [¶] 0.2 μ M probe 3**
4plex アッセイのみ： 20x プライマー / プローブ・ ミックス4§	2.5 μ l	1.0 μ l	0.2 μ M forward primer 4 [¶] 0.2 μ M reverse primer 4 [¶] 0.2 μ M probe 4**
RT-PCR のみ： QuantiTect Virus RT Mix、100x	0.5 μ l	0.2 μ l	1x
RNase フリー水	適量	適量	–
DNA/RNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	適量	最終反応容量の 最高50%まで
トータル容量 / 反応	50 μl*	20 μl*†	–

* 使用するリアルタイムサイクラーが50 μ lあるいは20 μ l以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節してください。

† Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systemの場合。

‡ ROX色素が不要なサイクラーでは、代わりにRNaseフリー水を添加します。

§ ターゲット毎に、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20xプライマー / プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版 Handbook 60ページ、Appendix Dをご覧ください。

¶ 最終プライマー濃度は0.2 μ Mが最適です。プライマー濃度を調節する前に、プライマー溶液の濃度を確認してください。0.1 μ M ~ 0.3 μ Mのプライマー濃度で結果が改善されることがあります。

** 最終プローブ濃度は0.2 μ Mでほとんどの場合満足できる結果が得られます。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法により異なりますが、最適濃度は0.1 μ M ~ 0.4 μ Mの間です。

表 18. triplexあるいは4plex解析用のサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
RT-PCRのみ： 逆転写反応	20分	50	RNAはcDNAに逆転写される。DNAターゲットを解析する際はこのステップを省略する。
PCR初期活性化 ステップ	5分	95	HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこのヒーティングステップで活性化される。
2ステップサイクリング：			重要：以下のサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる。
変性	15秒	95	
アニ - リング/ エクステンション	75秒	60	150 bpまでのPCR産物に至適化されたアニ - リング/エクステンション・ステップと蛍光データ収集の組み合わせ。150 bpより大きいPCR産物に関しては、異なるサイクリング条件で結果が改善される場合もある。詳細は英語版 Handbook 53 ページ、Appendix A を参照。
サイクル数：	40 ~ 50		サイクル数はテンプレートDNA/RNA量に依存。

- リアルタイム・サイクラーにPCRチューブあるいはプレートを設定し、PCRサイクリング・プログラムをスタートする。
- データ解析を行なう。

データ解析を実施する前に、解析の設定を行ないます。解析設定（ベースラインとthreshold値など）は各プローブごとに行ないます。正確な定量データを得るためには、最適な解析設定が必須条件の一つです。

トラブルシューティングガイド

コメント

PCRでシグナルがない、あるいはひとつ以上のサンプルのシグナルが遅れて検出される

- a) サイクル条件が間違っている
常にプロトコールに記載されている至適化済みのサイクリング条件で始める。
- b) HotStarTaq *Plus* DNA Polymeraseが活性化されていない
プロトコールに記載されているようにサイクリングプログラムにHotStarTaq *Plus* DNA Polymerase活性化ステップ（95℃、5分）が含まれていることを確認する。
- c) ピペッティング・エラー、あるいは試薬の入れ忘れ
プライマー、プローブ、テンプレート核酸を含んだ試薬の濃度と保存条件をチェックする。プライマーおよびプローブ濃度を評価する際の詳細は英語版 Handbook 53 ページ、Appendix Aを参照する。再度アッセイを行なう。
- d) 検出ステップが間違っている、あるいはない
TaqMan プローブを用いた時、アニーリング/エクステンションを組み合わせたステップ中に蛍光検出が行なわれていることを確認する。
- e) プライマーあるいはプローブ濃度が適切でない
適切なプライマー濃度を用いる。全てのリアルタイムブロックサイクラー上でのduplexアッセイでは各プライマー濃度は0.4 μM で使用する。全てのリアルタイムブロックサイクラー上でのtriplexあるいは4plexアッセイでは各プライマー濃度は0.2 μM を使用する。

ほとんどの場合、プローブ濃度は0.2 μM で満足できる結果が得られる。使用したプローブの品質によっては、0.1 ~ 0.4 μM にプローブ濃度を調節することで結果が改善されることがある。プライマーおよびプローブ濃度を分光光度計でチェックする（英語版 Handbook 53 ページ、Appendix Aを参照）。

コメント

- f) スタートテンプレートに問題
- サンプルの核酸あるいはスタンダードコントロールのテンプレート核酸の濃度、保存条件、品質をチェックする。
- 必要な場合には、テンプレート核酸のストック溶液の連続希釈系列を新しく調製する。新しい希釈液を用いてアッセイを再度行なう。
- 最適な結果を得るにはPCR阻害物質の効果的な除去が必須である。適切な精製法を用いてサンプルから核酸を精製する（英語Handbook 67ページOrdering Informationを参照）。
- テンプレート核酸の分離および希釈に使用した試薬、バッファー、溶液のすべてがヌクレアーゼ（RNases/DNases）フリーでなければならない。
- g) スタートテンプレート量が不十分
- 可能ならテンプレート量を増やす。十分なコピー数のターゲット核酸がサンプル中に存在していることを確認する。
- h) サイクル数が十分でない
- サイクル数を増やす。
- i) プローブデザインが適正でない
- 増幅反応が成功しているのなら、プローブに問題のある可能性がある。プローブ・デザインのガイドラインを参照する（英語版Handbook 53ページ、Appendix A参照）。
- j) 間違った検出チャンネル/フィルターを選択した
- 正しい検出チャンネルが有効かどうか、あるいはレポーター色素に正しいフィルターを選択しているかを確認する。選択したレポーター色素の組み合わせが検出チャンネルあるいはフィルターセットに適合しているかチェックする。
- k) 蛍光のクロストーク
- アッセイに使用したレポーター色素がサイクラー上のMultiplex解析に適切であることをチェックする。クロストーク効果の可能性を評価するために適切なコントロールを用いてテストする。

Multiplex アッセイと相当する **single** アッセイとで C_T 値あるいは PCR 効率の違いがある

- a) サイクル条件が間違っている
常にプロトコールに記載されている至適化済みのサイクリング条件で始める。サイクリング条件に HotStarTaq Plus DNA Polymerase 活性化ステップ (95 °C、5分) と、変性およびアニーリング/エクステンションの時間設定がプロトコール通りになっていることを確認する。
- b) 解析の設定値 (ベースラインと threshold 値など) が最適でない
各レポーター色素ごとに解析設定値 (ベースラインと threshold 値など) をチェックする。各レポーター色素で最適な設定を用いて再度解析する。
- c) レポーター色素のスペクトル分離が不正確
Multiplex アッセイは蛍光標識した複数のプローブを使用しているために、バックグラウンドが増加し、リアルタイム・サイクラーによっては得られる増幅プロットの形に影響することがある。これにより、multiplex アッセイと相当するシングル反応アッセイで C_T 値が最高 5% 異なることがある; この違いは最適な threshold 値を設定することにより通常回避できる。
ABI PRISM® 7700 を使用している場合には、spectral compensation を用いた解析と用いない解析の両方を行なう。

テンプレート量の対数値と C_T 値/crossing point 間の相関関係に直線性がない

- a) テンプレートの量が多すぎる
シグナルの増幅が非常に早く C_T 値が小さい場合は、適宜 analysis setting を調節する。
- b) テンプレートの量が少なすぎる
可能ならテンプレート量の量を増やす。非常にコピー数の少ないサンプルの検出は標準曲線の直線性のある範囲に入らないことがある。

No Template Control (NTC) ; テンプレート無添加のコントロール) で蛍光強度あるいは C_T 値が高い

- a) 試薬がコンタミ
アッセイに使用した試薬 (例; マスターミックス、プライマー、プローブ) をすべて廃棄する。新しい試薬でもう一度繰り返す。
- b) わずかなプローブ分解により蛍光強度が増加
増幅プロットをチェックし、threshold 値を調節する。

蛍光強度が変わる

- a) リアルタイムサイクラーがコンタミ メーカーの説明書に従ってリアルタイム・サイクラーのコンタミを除去する。
- b) リアルタイムサイクラーの較正ができていない メーカーの説明書に従ってリアルタイム・サイクラーの較正をもう一度行なう。
- c) ターゲットの発現が高く多量のテンプレートで曲線が波状になる 解析設定でバックグラウンドを計算するために使用したサイクル数を減らす(ご使用のリアルタイム・サイクラーが可能な場合)か、テンプレート量を減らす。
- d) **ABI PRISM 7000 SDS** : 曲線が乱れる、あるいは実験結果のバラつきが大きい 25 μ l以下の反応液量を用いない。プレートの蓋に optical adhesive cover を必ず使用する。反応液量を 50 μ l に増加すると、結果が改良されることがある。

Trademarks: QIAGEN[®], HotStarTaq[®], QuantiTect[®] (QIAGEN Group); ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®] (Applied Biosystems Corporation); Bio-Rad[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Cepheid[®] (Cepheid); TaqMan[®], Roche[®] (Roche Group); Stratagene[®] (Stratagene).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載のQIAGEN製品は全て研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2007 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice-jp@qiagen.com

