

QuantiFast™ Pathogen RT-PCR +IC プロトコールとトラブルシューティング

配列特異的なプローブを用いた高感度な 1 ステップ
リアルタイム RT-PCR によるウイルス RNA および
インターナルコントロールの検出



目次

プロトコール

プロトコール 1 : TaqMan プローブを用いた duplex RT-PCR (Rotor-Gene サイ클ラーおよび ROX Reference Dye が不要なサイ클ラー)	3
プロトコール 2 : TaqMan プローブを用いた duplex RT-PCR (ABI 7500 Cyclor)	7
プロトコール 3 : TaqMan プローブを用いた duplex RT-PCR (ほとんどの Applied Biosystems Cyclor)	11
トラブルシューティング	15

プロトコール 1 : TaqMan® プローブを用いた duplex RT-PCR (Rotor-Gene™サイクラーおよび ROX Reference Dye が不要なサイクラー)

本プロトコールは、QuantiFast Pathogen RT-PCR +IC Kit と TaqMan プローブを Rotor-Gene サイクラーあるいは Agilent® (Stratagene®)、Bio-Rad®/MJ Research、Roche® などの ROX 色素を必要としないサイクラーで使用するために至適化されています。詳細は英語版 Handbook 11 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

- 本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。サイクリングと Internal Control Assay は、60 ~ 150 bp の PCR 産物を増幅する病原体アッセイとの使用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 59 ページの Appendix G をご覧ください。
- 本プロトコールに記載のプライマーおよびプローブ濃度を使用してください。
- Duplex アッセイで病原体と Internal Control のアッセイを同時に行なう前に、singleplex アッセイで病原体に特異的なプライマー／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 17 ページの “Guidelines for effective duplex detection of pathogen and Internal Control” をお読みください。
- ネガティブコントロール (PCR グレードの水) と少なくとも 1 種類のポジティブコントロールを PCR ランごとにセットしてください。
- リアルタイム用サーマルサイクラーのユーザーマニュアルに従って duplex 解析用のセットアップを正しく行なってください (例：同一のウェルあるいはチューブから 2 種類の色素を検出するための設定)。用いるレポーター色素ごと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。チャンネルとキャリブレーションに関する詳細は英語版 Handbook 19 ページの “Selecting dyes and instrument setup” を参照してください。
- HotStarTaq® Plus DNA Polymerase を活性化するため、逆転写反応の後、PCR の最初に 95℃ で 5 分間のインキュベーションを必ず行なってください。
- 正確な定量データを得るためには最適な設定が必須条件の一つです。データ解析には、各ランにおいて、レポーター色素チャンネルごとに解析の設定 (ベースラインと threshold 値など) を再調整する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲット特異的なプライマーとプローブを含んだ 10x プライマー・プローブミックスを病原体アッセイ用に調製すると操作が容易になります（英語版 Handbook 56 ページ、Appendix E）。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 57 ページ、Appendix F をご覧ください。

操作手順

1. **5x QuantiFast Pathogen 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（ウイルス RNA）**、**オプションでスタンダード**、**およびリファレンスを解凍する**。各溶液を混和する。

スタンダードを反応あたり 5 ~ 12.25 μ l の容量で使用できるように、QuantiTect® Nucleic Acid Dilution Buffer を用いて適切な濃度に希釈します。

2. 表 7（5 ページ）に従って反応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。

注：精製および増幅のコントロールのために Internal Control RNA (High conc.) をサンプルライセートあるいは溶解バッファーに添加した場合は、Internal Control RNA を反応ミックスには添加せず代わりに水を添加します。

通常、反応セットアップは室温（15 ~ 25°C）で行ないます。しかし、サンプル、コントロール、Internal Control RNA は氷上あるいは冷却装置で保冷することをお奨めします。

注：RT-PCR に関しては、100x QuantiFast Pathogen 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**。

病原体と Internal Control の duplex アッセイを最適に行なうためには、最終反応容量を 25 μ l にすることを推奨します。ご利用のリアルタイム用サーマルサイクラーが他の反応量を必要とする場合には、その量に応じて反応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。病原体に特異的なプライマー・プローブセットのみを用いた singleplex アッセイの結果と比較することで、Internal Control を用いた duplex 増幅での病原体検出の性能を必ず評価してください。

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 8 (6 ページ) に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミングを行なう。

蛍光取り込みは、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行ないます。

Rotor-Gene Q では、目的の病原体アッセイに対応した蛍光チャンネルにて最適な蛍光感度を定めることを推奨します。Internal Control Assay の gain は +9 を使用します。Rotor-Gene Q での蛍光感度の調節に関しては、英語版 Handbook 48 ページ、Appendix B をお読みください。

表 7. 反応セットアップ

成分	容量 *	最終濃度
5x QuantiFast Pathogen Master Mix	5 µl	1x
100x QuantiFast Pathogen RT Mix	0.25 µl	1x
10x 病原体特異的プライマー・ プローブミックス†	2.5 µl	0.4 µM forward primer 1 ‡ 0.4 µM reverse primer 1 ‡ 0.2 µM probe 1 §
10x Internal Control Assay¶	2.5 µl	1x
10x Internal Control RNA¶	2.5 µl	1x
RNase フリー水	適量	-
テンプレート RNA (ステップ 4 で添加)	適量	適量
トータル反応容量	25 µl*	-

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 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する。

† ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ 10x プライマー・プローブミックスを病原体アッセイ用に調製すると操作が容易になる。英語版 Handbook 56 ページ、Appendix E を参照。

‡ 最終プライマー濃度 0.4 µM は殆どの場合で最適。使用したアッセイデザインと病原体ターゲット配列によっては、0.5 ~ 1.0 µM にプライマー濃度を調節することで結果が改善されることがある。プライマー濃度を調節する前に、使用中のプライマー溶液の濃度を確認する。

§ 0.2 µM の最終プローブ濃度でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブの品質や使用した精製方法によるが、最適濃度は 0.1 ~ 0.4 µM の間である。

¶ 英語版 Handbook 24 ページの “Reconstitution and use of Internal Control Assay and Internal Control RNA” を参照。

注：精製と増幅のコントロールとして、Internal Control RNA をサンプルライセートあるいは溶解バッファーに添加した場合は、反応ミックスには Internal Control RNA を添加せずに RNase フリー水を添加します。

表 8. サイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	20 分	50°C	RNA は cDNA に逆転写される
PCR 初期活性化ステップ	5 分	95°C	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase はこの加熱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°C	
アニーリング/ エクステンション *	30 秒	60°C	アニーリング/エクステンションステップ中の蛍光取り込み
サイクル数	40 ~ 45		サイクル数はテンプレート RNA 量に依存

* Rotor-Gene Q では、Green チャンネルで “gain optimization before first acquisition” を行なって病原体アッセイの蛍光チャンネル感度を調節する。Internal Control Assay の fluorescence gain を最適にするために Yellow チャンネルを +9 にセットする。詳細は英語版 Handbook 48 ページ、Appendix B を参照。

6. リアルタイム用サーマルサイクラーに 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。

7. 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。病原体と IC アッセイで解析設定（すなわちベースラインと threshold 値）をそれぞれ設定します。正確な検出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 : TaqMan プローブを用いた duplex RT-PCR (ABI™ 7500 Cycler)

本プロトコールは、Quantifast Pathogen RT-PCR +IC Kit と TaqMan プローブを Applied Biosystems® 7500 サイ클ーで使用する目的で作成されています。詳細は英語版 Handbook 11 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

- 本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。サイクリングと Internal Control Assay は 60 ~ 150 bp の PCR 産物を増幅する病原体アッセイとの使用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 59 ページの Appendix G をご覧ください。
- 本プロトコールに記載のプライマーおよびプローブ濃度を使用してください。
- Duplex アッセイで病原体と Internal Control のアッセイを同時に行なう前に、singleplex アッセイで病原体に特異的なプライマー／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 17 ページの “Guidelines for effective duplex detection of pathogen and Internal Control” をお読みください。
- ネガティブコントロール (PCR グレードの水) と少なくとも 1 種類のポジティブコントロールを PCR ランごとにセットしてください。
- リアルタイム用サーマルサイ클ーのユーザーマニュアルに従って duplex 解析用のセットアップを正しく行なってください (例; 同一のウェルあるいはチューブから 2 種類の色素を検出するための設定)。用いるレポーター色素ごと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。チャンネルとキャリブレーションに関する詳細は英語版 Handbook 19 ページ “Selecting dyes and instrument setup” を参照してください。
- HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化するため、逆転写反応の後、PCR の最初に 95℃ で 5 分間のインキュベーションを必ず行なってください。
- 正確な定量データを得るためには最適な設定が必須条件の一つです。データ解析には、各ランにおいて、レポーター色素チャンネルごとに解析の設定 (ベースラインと threshold 値など) を再調整する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲット特異的なプライマーとプローブを含んだ 10x プライマー・プローブミックスを病原体アッセイ用に調製すると操作が容易になります（英語版 Handbook 56 ページ、Appendix E）。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 57 ページ、Appendix F をご覧ください。

操作手順

1. **5x QuantiFast Pathogen 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（ウイルス RNA）**、**50x ROX Dye Solution**、オプションでスタンダード、およびリファレンスを解凍する。各溶液を混和する。

スタンダードを反応あたり 5 ~ 12.25 μ l の容量で使用できるように、QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer を用いて適切な濃度に希釈します。

2. 表 9（9 ページ）に従って反応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。

注：精製および増幅のコントロールのために Internal Control RNA (High conc.) をサンプルライゼートあるいは溶解バッファーに添加した場合は、Internal Control RNA を反応ミックスには添加せず代わりに水を添加します。

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、サンプル、コントロール、Internal Control RNA は氷上あるいは冷却装置で保冷することをお奨めします。

注：RT-PCR に関しては、100x QuantiFast Pathogen 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。

病原体と Internal Control の duplex アッセイを最適に行なうためには、最終反応容量を 25 μ l にすることを推奨します。ご利用のリアルタイム用サーマルサイクラーが他の反応量を必要とする場合には、その量に応じて反応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。病原体に特異的なプライマー・プローブセットのみを用いた singleplex アッセイの結果と比較することで、Internal Control を用いた duplex 増幅での病原体検出の性能を必ず評価してください。

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 10（10 ページ）に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミングを行なう。

表 9. 反応セットアップ

成分	容量 *	最終濃度
5x QuantiFast Pathogen Master Mix	5 µl	1x
100x QuantiFast Pathogen RT Mix	0.25 µl	1x
50x ROX Dye Solution	0.5 µl	1x
10x 病原体特異的プライマー・ プローブミックス [†]	2.5 µl	0.4 µM forward primer 1 [†] 0.4 µM reverse primer 1 [†] 0.2 µM probe 1 [§]
10x Internal Control Assay [†]	2.5 µl	1x
10x Internal Control RNA [†]	2.5 µl	1x
RNase フリー水	適量	-
テンプレート RNA (ステップ 4 で添加)	適量	適量
トータル反応容量	25 µl*	-

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 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する。

[†] ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ 10x プライマー/プローブ・ミックスを病原体アッセイ用に調製すると操作が容易になる。英語版 Handbook 56 ページ、Appendix E を参照。

[‡] 最終プライマー濃度 0.4 µM は殆どのアプリケーションに最適である。使用したアッセイデザインと病原体ターゲット配列によっては、0.5 ~ 1.0 µM にプライマー濃度を調節することで結果が改善されることがある。プライマー濃度を調節する前に、使用中のプライマー溶液の濃度を確認する。

[§] 0.2 µM の最終プローブ濃度でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブの品質や使用した精製方法によるが、最適濃度は 0.1 ~ 0.4 µM の間である。

[†] 英語版 Handbook 24 ページの “Reconstitution and use of Internal Control Assay and Internal Control RNA” を参照。

注：精製と増幅のコントロールとして、Internal Control RNA をサンプルライゼートあるいは溶解バッファーに添加した場合は、反応ミックスには Internal Control RNA を添加せずに RNase フリー水を添加します。

表 10. サイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	20 分	50°C	RNA は cDNA に逆転写される
PCR 初期活性化ステップ	5 分	95°C	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase はこの加熱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°C	
アニーリング/ エクステンション	30 秒 *	60°C	アニーリング/エクステンションステップ中の蛍光取り込み
サイクル数	40 ~ 45		サイクル数はテンプレート RNA 量に依存

* この時間で設定できない場合には、設定可能な最短の時間で行なってください。

6. リアルタイム用サーマルサイクラーに 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。

7. 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。病原体と IC アッセイで解析設定（すなわちベースラインと threshold 値）をそれぞれ設定します。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 : TaqMan プローブを用いた duplex RT-PCR (ほとんどの Applied Biosystems Cyclers)

本プロトコールは、Quantifast Pathogen RT-PCR +IC Kit と TaqMan プローブを **Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System** を除くほとんどの Applied Biosystems のリアルタイム用サーマルサイクラーで使用するために至適化されています。詳細は英語版 Handbook 11 ページの “ROX passive reference dye” および 16 ページの “Selecting Kits and Protocols” をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- 本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。サイクリングと Internal Control Assay は 60 ~ 150 bp の PCR 産物を増幅する病原体アッセイとの使用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 59 ページの Appendix G をご覧ください。
- 本プロトコールに記載のプライマーおよびプローブ濃度を使用してください。
- Duplex アッセイで病原体と Internal Control のアッセイを同時に行なう前に、singleplex アッセイで病原体に特異的なプライマー／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 17 ページの “Guidelines for effective duplex detection of pathogen and Internal Control” をお読みください。
- ネガティブコントロール (PCR グレードの水) と少なくとも 1 種類のポジティブコントロールを PCR ランごとにセットしてください。
- リアルタイム用サーマルサイクラーのユーザーマニュアルに従って duplex 解析用のセットアップを正しく行なってください (例; 同一のウェルあるいはチューブから 2 種類の色素を検出するための設定)。用いるレポーター色素ごと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。チャンネルとキャリブレーションに関する詳細は英語版 Handbook 19 ページ “Selecting dyes and instrument setup” を参照してください。
- HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化するため、逆転写反応の後、PCR の最初に 95℃ で 5 分間のインキュベーションを**必ず**行なってください。
- 正確な定量データを得るためには最適な設定が必須条件の一つです。データ解析には、各ランにおいて、レポーター色素チャンネルごとに解析の設定 (ベースラインと threshold 値など) を再調整する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲット特異的なプライマーとプローブを含んだ 10x プライマー・プローブミックスを病原体アッセイ用に調製すると操作が容易になります（英語版 Handbook 56 ページ、Appendix E）。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 57 ページ、Appendix F をご覧ください。

操作手順

1. **5x QuantiFast Pathogen 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（ウイルス RNA）、**50x High-ROX Dye Solution**、オプションでスタンダード、およびリファレンスを解凍する。各溶液を混和する。スタンダードを反応あたり 5 ~ 12.25 μ l の容量で使用できるように、QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer を用いて適切な濃度に希釈します。

2. 表 11（13 ページ）に従って反応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。

注：精製および増幅のコントロールのために Internal Control RNA (High conc.) をサンプルライセートあるいは溶解バッファーに添加した場合は、Internal Control RNA を反応ミックスには添加せず代わりに水を添加します。

通常、反応セットアップは室温（15 ~ 25°C）で行ないます。ただし、サンプル、コントロール、Internal Control RNA は氷上で保冷することをお奨めします。

注：RT-PCR に関しては、100x QuantiFast Pathogen 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。

病原体と Internal Control の duplex アッセイを最適に行なうためには、最終反応容量を 25 μ l にすることを推奨します。ご利用のリアルタイム用サーマルサイクラーが他の反応量を必要とする場合には、その量に応じて反応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。病原体に特異的なプライマー・プローブセットのみを用いた singleplex アッセイの結果と比較することで、Internal Control を用いた duplex 増幅での病原体検出の性能を必ず評価してください。

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（14 ページ）に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミングを行なう。

表 11. 反応セットアップ

成分	容量 *	最終濃度
5x QuantiFast Pathogen Master Mix	5 µl	1x
100x QuantiFast Pathogen RT Mix	0.25 µl	1x
50x High-ROX Dye Solution	0.5 µl	1x
10x 病原体特異的プライマー・ プローブミックス [†]	2.5 µl	0.4 µM forward primer 1 [†] 0.4 µM reverse primer 1 [†] 0.2 µM probe 1 [§]
10x Internal Control Assay [†]	2.5 µl	1x
10x Internal Control RNA [†]	2.5 µl	1x
RNase フリー水	適量	-
テンプレート RNA (ステップ 4 で添加)	適量	適量
トータル反応容量	25 µl*	-

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 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する。

[†] ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ 10x プライマー・プローブミックスを病原体アッセイ用に調製すると操作が容易になる。英語版 Handbook 56 ページ、Appendix E を参照する。

[‡] 最終プライマー濃度 0.4 µM は殆どの場合で最適である。使用したアッセイデザインと病原体ターゲット配列によっては、0.5 ~ 1.0 µM にプライマー濃度を調節することで結果が改善されることがある。プライマー濃度を調節する前に、使用中のプライマー溶液の濃度を確認する。

[§] 0.2 µM の最終プローブ濃度でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブの品質や使用した精製方法によるが、最適濃度は 0.1 ~ 0.4 µM の間である。

[†] 英語版 Handbook 24 ページの “Reconstitution and use of Internal Control Assay and Internal Control RNA” を参照。

注：精製と増幅のコントロールとして、Internal Control RNA をサンプルライゼートあるいは溶解バッファーに添加した場合は、反応ミックスには Internal Control RNA を添加せずに RNase フリー水を添加します。

表 12. サイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	20 分	50°C	RNA は cDNA に逆転写される
PCR 初期活性化ステップ	5 分	95°C	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase はこの加熱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°C	
アニーリング/ エクステンション	30 秒	60°C	アニーリング/エクステンションステップ中の蛍光取り込み
サイクル数	40 ~ 45		サイクル数はテンプレート RNA 量に依存

- リアルタイム用サーマルサイクラーに 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。病原体と IC アッセイで解析設定（すなわちベースラインと threshold 値）をそれぞれ設定します。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

コメント

ポジティブコントロールを含めターゲットシグナルが検出されない（または検出が遅い）、あるいは、NTCを含め Internal Control のシグナルが検出されない（または検出が遅い）*。

- | | |
|--|--|
| a) サイクリング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、核酸テンプレートなどの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 43 ページ、Appendix A を参照する。反応をやり直す。 |
| d) 蛍光取り込みの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取り込み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サイクラー上で病原体ターゲットアッセイでは各プライマー濃度は 0.4 μM で使用する。

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は分光光度計でチェックする（英語版 Handbook 43 ページ、Appendix A を参照）。

Internal Control Assay を正確に取り扱い保管したことを確認する（英語版 Handbook 4 ページ “Shipping and Storage” および同じく 24 ページの “Reconstitution and use of Internal Control Assay and Internal Control RNA” を参照）。 |

* 精製プロセスで Internal Control RNA を添加した場合は NTC にて Internal Control のシグナルは検出されないので注意が必要。病原体ターゲットおよび Internal Control のシグナル解析に関する詳細は英語版 Handbook 22 ページの “Controls”、同じく 50 ページの Appendix C、 “Data Analysis” を参照する。

コメント

- f) コントロールテンプレートに問題
- 病原体ポジティブ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、コントロール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。十分なコピー数のターゲット核酸がポジティブコントロールサンプル中に存在していることを確認する。
- Internal Control RNA を正確に取り扱い保管したことを確認する（英語版 Handbook 4 ページ “Shipping and Storage” および同じく 24 ページの “Reconstitution and use of Internal Control Assay and Internal Control RNA” を参照）。
- g) サイクル数が不十分
- サイクル数を増やす。
- h) 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場合は、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 43 ページ、Appendix A 参照）。
- i) 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設定されているかどうか、あるいはレポーター色素ごと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。

コメント

ポジティブコントロール中でターゲットシグナルは検出され、また NTC で Internal Control シグナルは検出されているが、サンプル中のターゲットシグナルと IC シグナルが検出されない（あるいは検出が遅い）*。

サンプル中に阻害物質
あるいはヌクレアーゼ
が存在する

スタートの病原体テンプレート核酸の濃度、保存条件、品質をチェックする。

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（英語版 Handbook 61 ページ、Ordering Information を参照）。

少量の阻害物質が存在する場合、使用するサンプル量を減らす（その結果阻害物質の量も減る）ことで RT-PCR が成功することがある。反応液に添加するサンプル量を減らすあるいは RT-PCR に使用する前にサンプルを希釈する（5 ~ 10 倍）。

核酸テンプレート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（RNase/DNase）フリーでなければならない。

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

a) サイクリング条件が
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。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サイクリング条件に組み込まれ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

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。レポーター色素ごとに最適な設定を用いて再度解析する。

* 精製プロセスで Internal Control RNA を添加した場合は NTC にて Internal Control のシグナルは検出されないので注意が必要。病原体ターゲットおよび Internal Control のシグナル解析に関する詳細は英語版 Handbook 22 ページの “Controls”、同じく 50 ページの Appendix C の “Data Analysis” を参照する。

コメント

- c) レポーター色素のスペクトル分離が不明確
- マルチプレックス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、リアルタイム用サーマル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 singleplex 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、適宜解析設定を調節する。
- b) テンプレート量が少なすぎる
- 可能ならテンプレート量を増やす。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” コントロールで病原体ターゲットの C_T 値が検出される、あるいは病原体ターゲットの蛍光強度が高い

- a) 試薬のコンタミ
- 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マルチプレックスアッセイを繰り返す。
- 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。

蛍光強度がばらつく

- a) リアルタイム用サーマルサイクラーのコンタミ メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのコンタミを除去する。
- b) リアルタイム用サーマルサイクラーの較正がずれている メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーの再キャリブレーションを行なう。
- 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（変更可能なリアルタイム用サーマルサイクラーの場合）か、テンプレート量を減らす。
- d) ABI PRISM 7000 のみ：曲線が滑らかでない、あるいは標準偏差値が高い 反応液量を 25 μ l 以上にする。必ず optical adhesive cover でプレートをしールする。反応液量を 50 μ l に増加すると、結果が改善されることがある。

Trademarks: QIAGEN®, QuantiFast™, HotStarTaq®, QuantiTect® (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ABI™, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Stratagene® (Stratagene); Rotor-Gene™ (Corbett Research Pty Ltd); TaqMan®, Roche® (Roche Group).

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。

© 2010 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

