

miScript PCR System

プロトコールとトラブルシューティング

miScript II RT Kit

miScript SYBR® Green PCR Kit

miScript Primer Assays

miScript Precursor Assays

miScript PCR Starter Kit

SYBR Green 検出を用いた microRNA の
リアルタイム PCR 解析



目次

プロトコール

リアルタイム定量 PCR のための逆転写反応	3
Mature miRNA あるいは Noncoding RNA を検出するための リアルタイム PCR	7
Precursor miRNA を検出するためのリアルタイム PCR	10
mRNA を検出するためのリアルタイム PCR	13
トラブルシューティング	16

プロトコール：リアルタイム定量 PCR のための逆転写反応

実験を始める前の重要事項

- miScript II RT Kit および miScript PCR Starter Kit には 2 種類の 5 倍濃縮バッファ： **5x miScript HiSpec Buffer** と **5x miScript HiFlex Buffer** が入っています。逆転写反応にはこれらのバッファのどちらか 1 種類のみをご使用ください。4 ページの表 2 を参照にして、PCR アプリケーションに適切なバッファをお選びください。10x miScript Nucleics Mix を、上記 2 種類の 5 倍濃縮バッファのうちどちらか 1 種類と使用します。
- **5x miScript HiSpec Buffer** は、miScript Primer Assays と miScript Universal Primer を用いた mature miRNA 定量を行なうために cDNA を調製する際にご使用ください。5x miScript HiSpec Buffer は、miScript miRNA PCR Arrays を用いた mature miRNA のプロファイリングにも必ずご使用ください（詳細は miScript miRNA PCR Array Handbook を参照）。
- **5x miScript HiFlex Buffer** は、miScript Primer Assays、miScript Precursor Assays および／あるいは QuantiTect® Primer Assays を用いて、同一サンプルから miRNA、precursor miRNA、mRNA あるいはその他の noncoding RNA 定量のために cDNA を調製する際にご使用ください。異なるタイプの RNA の定量は同時でも、または別途でも実施可能です。
- miRNA を含むトータル RNA を逆転写反応のスタートサンプルとして使用します。RNA 精製に関しては英語版 Handbook 16 ページをご覧ください。本プロトコールは、5x miScript HiSpec Buffer 中では 10 pg ~ 2 µg の RNA、5x miScript HiFlex Buffer 中では 10 pg ~ 1 µg の RNA を使用します。RNA 量が多い場合は、反応溶液の量をスケールアップしてください。precursor miRNA の定量には、最大 500 ng の RNA を使用することを推奨します。推奨するテンプレート RNA 量はダウンストリーム PCR アプリケーションにより異なります。4 ページの表 2 をご覧ください。初めて RNA を取り扱う際には Appendix D（英語版 Handbook 45 ページ）をお読みください。
- miRNA 定量の際は、miScript miRNA Mimics をインターナルのポジティブコントロールとして使用できます（英語版 Handbook 43 ページ、Appendix C のプロトコール参照）。
- precursor miRNA あるいは mRNA の検出には、RNA サンプルへのゲノム DNA の混入を回避することが重要です。miRNeasy Mini または miRNeasy 96 Kit を用いた場合は RNase-Free DNase Set (cat. no. 79254) によるカラム上での DNase 分解をオプションで行なうことを推奨します。さらに“No RT”コントロールを必ず実施します。これは、miScript Reverse Transcriptase Mix の添加なしに逆転写操作のみを同様にこなしたサンプルです。
- RNA 分解のリスクを最小限に抑えるために全ての反応溶液は氷上でセットアップします。

- テンプレート RNA または miScript II RT Kit の構成成分はいずれもボルテックスしないでください。

表 2. 各種 PCR アプリケーションのための逆転写反応に推奨する RNA 量ならびにバッファー

PCR アプリケーション	Assay	Buffer	RNA 推奨量
mature miRNA 定量のみ	miScript Primer Assays	5x miScript HiSpec Buffer	定量するターゲット miRNA の量や数により異なる；10 ng から最大 2 µg
mature miRNA、precursor miRNA、mRNA、その他 noncoding RNA の同時定量	miScript Primer Assays、miScript Precursor Assays、QuantiTect Primer Assays	5x miScript HiFlex Buffer	定量するターゲットの miRNA の量や数により異なる；最大 1 µg
precursor miRNA 検出	miScript Precursor Assays	5x miScript HiFlex Buffer	定量するターゲットの miRNA の量と数により異なる；最大 0.5 µg

操作手順

1. テンプレート RNA を氷上で解凍する。10x miScript Nucleics Mix、RNase フリー水、また 5x miScript HiSpec Buffer か 5x miScript HiFlex Buffer のいずれかを室温（15 ~ 25℃）で解凍する。

チューブを指で弾いて各溶液を混和します。チューブの壁に残った液体を回収するためにスピンドウンし、氷上で保冷します。

2. 表 3 に従い、逆転写反応マスターミックスを氷上で調製する。

穏やかに混和し、氷上で保冷します。逆転写反応マスターミックスには、一本鎖 cDNA 合成に必要な全ての成分がテンプレート RNA を除いて含まれています。

注：miScript Reverse Transcriptase Mix は、マスターミックスの調製直前にフリーザー（-20℃）から取り出し、穏やかに混和して氷上で保冷します。使用後は即座にフリーザーに戻してください。

注：2 反応液以上をセットアップする場合は、反応のトータル数に必要な量の 10% 増しでマスターミックスを調製します。

表 3. 逆転写反応成分

成分	容量／反応
5x miScript HiSpec Buffer あるいは 5x miScript HiFlex Buffer*	4 µl
10x miScript Nucleics Mix	2 µl
RNase フリー水	適量
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
テンプレート RNA (ステップ 3 で添加)	適量 (表 2 の推奨量を参照) [†]
トータル容量	20 µl

* 適切なバッファーは PCR アプリケーションにより異なる。4 ページの表 2 参照。

[†] "QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit" を用いて調製した血清あるいは血漿サンプル由来の RNA を使用する場合は、スタートサンプル量として 5 µl の RNA 調製液を使用することを推奨。

3. 逆転写反応マスターミックスが入った各チューブにテンプレート RNA を添加する。穏やかに混和後スピンドウンして、氷上で保冷する。
4. 37°C で 60 分間インキュベートする。
5. 95°C で 5 分間インキュベートして miScript Reverse Transcriptase Mix を不活化し、氷上に置く。
6. 直ぐにリアルタイム PCR を実施する場合は、6 ページの表 4 に従って cDNA を RNase フリー水で希釈する。

リアルタイム PCR 実施前に逆転写反応液を保存する場合には、未希釈の cDNA を -20°C のフリーザーに入れるか、希釈した cDNA を扱いやすい量に分注して -20°C のフリーザーで保存してください。

表 4. PCR 実施前に行なう cDNA 希釈

PCR アプリケーション	Assay	反応液の希釈
mature miRNA 定量のみ	miScript Primer Assays	目的の miRNA 量により異なる；PCR あたり 50 pg ～ 3 ng の cDNA になるように少なくとも 200 μ l、あるいは必要に応じてそれ以上の RNase フリー水を 20 μ l の逆転写反応液に添加する
mature miRNA、precursor miRNA、mRNA、その他 noncoding RNA の同時定量	miScript Primer Assays、miScript Precursor Assays、QuantiTect Primer Assays	目的の RNA 量により異なる；mature miRNA と precursor miRNA および／あるいは mRNA の同時定量には PCR あたり 10 ～ 20 ng の cDNA；mature miRNA とその他の noncoding RNA の同時定量には PCR あたり 50 pg ～ 3 ng になるようにする
precursor miRNA 検出	miScript Precursor Assays	目的の precursor miRNA 量により異なる；PCR あたり 10 ～ 20 ng の cDNA になるようにする

プロトコール: Mature miRNA あるいは Noncoding RNA を検出するためのリアルタイム PCR

miScript HiSpec Buffer (mature miRNA のみを検出) あるいは miScript HiFlex Buffer (mature miRNA と他の noncoding RNA を検出) のどちらかと miScript II RT Kit を用いて調製した cDNA が、このプロトコールの適切なスタートサンプルとなります。本プロトコールは、ターゲット特異的な miScript Primer Assays (forward primer) と、miScript Universal Primer (reverse primer) および QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix の入った miScript SYBR Green PCR Kit を用いて、mature miRNA あるいは noncoding RNA のリアルタイム定量 PCR を実現します。本プロトコールはまた RNU6B (RNU6-2) miScript Primer Assay あるいは human miR-15a miScript Primer Assay を miScript Universal Primer と併用する miScript PCR Starter Kit でもご使用いただけます。さらにこのプロトコールには miScript PCR Controls の使用を推奨します。

実験を始める前の重要事項

- PCR ステップは、**まず 95℃で 15 分のインキュベーションにより HotStarTaq DNA Polymerase (2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 中に含まれる) を活性化します。**
- 20 µl の cDNA 合成反応液を適切に希釈したことを確認してください。6 ページ、表 4 を参照してください。
- mature miRNA と precursor miRNA を同時に定量する場合には、全ての反応において precursor miRNA 検出で推奨されているようにテンプレート cDNA 量を増加することをお奨めします (10 ~ 20 ng)。これにより結果を直接比較できます。
- テンプレート cDNA あるいは miScript SYBR Green PCR Kit の構成成分はいずれもボルテックスしないでください。
- 初めて miScript Primer Assay を使用する場合は、まず英語版 Handbook 6 ページ、“Shipping and Storage” の説明に従って使用前にこれを溶解します (miScript PCR Starter Kit に付属の miScript Primer Assays および miScript Universal Primer は即使用可能な 10x 溶液でお届けしていますので溶解する必要はありません)。
- iCycler iQ®, iQ5 または MyiQ™ を使用する際は、各実験の初めに Well Factor の測定が必要です。システムやピペッティングによるばらつきを補正する際に Well Factor を使用します。詳細は機器に付属のユーザーマニュアル、あるいは www.qiagen.co.jp で “Technical Information : Using QuantiTect SYBR Green Kits on Bio-Rad® cyclers” をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix**、**10x miScript Universal Primer**、**10x miScript Primer Assay**、テンプレート cDNA、RNase フリー水を室温（15 ～ 25℃）で解凍する。各溶液を混和する。
2. ウェルあたりの反応容量が **10 µl**（**384 ウェルプレート**）、**25 µl**（**96 ウェルプレート**）、**20 µl**（**Rotor-Disc™ 100** を使用）になるように、表 5 に従って反応ミックスを調製する。

反応ミックスにはテンプレート cDNA 以外の全成分が含まれています。ホットスタート PCR 法のため、反応のセットアップ中、あるいはリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上で保冷する必要はありません。

表 5. リアルタイム PCR の反応セットアップ

成分	容量／反応 (384 ウェル)	容量／反応 (96 ウェル)	容量／反応 (Rotor-Disc 100) *
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix†	5 µl	12.5 µl	10 µl
10x miScript Universal Primer	1 µl	2.5 µl	2 µl
10x miScript Primer Assay	1 µl	2.5 µl	2 µl
RNase フリー水	適量	適量	適量
テンプレート cDNA (ステップ 3 で添加) ‡	≤1 µl	≤2.5 µl	≤2 µl
トータル容量	10 µl	25 µl	20 µl

* これらの容量は、Rotor-Gene™ Q 72-Well Rotor と共に使用する Strip Tube で行なう反応セットアップにも使用できる。

† Mg²⁺ 濃度の至適化は不要。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix を用いて得られる Mg²⁺ の最終濃度で最高の結果が得られる。

‡ 希釈した cDNA 量は最終反応容量の 10%を超えないようにする。miScript II RT Kit と miScript HiSpec Buffer（mature miRNA 検出のみ）あるいは miScript HiFlex Buffer（mature miRNA および他の noncoding RNA の検出）を用いて調製し、表 4 に従って希釈した cDNA について、この容量が当てはまる。cDNA の最終濃度は反応あたり 50 pg ～ 3 ng にする。

3. 個々のプレート／Rotor-Disc のウェルにテンプレート cDNA を分注する。
4. 反応ミックスを完全かつ慎重に、テンプレート cDNA の入ったチューブあるいはプレート／Rotor-Disc のウェルに適切な量を分注する。

5. キャップ、フィルム、Rotor-Disc Heat-Sealing Film でプレートあるいはディスクを慎重に、しっかりとシールする。
6. 室温（15 ～ 25℃）で 1,000 g、1 分間遠心操作して、気泡を除去する。
注：本ステップは Rotor-Disc での反応セットアップには不要です。
7. 表 6 に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーをプログラムする。

表 6. リアルタイム PCR のサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
PCR 初期の活性化 ステップ	15 分	95℃	HotStarTaq DNA Polymerase は この加熱ステップにより活性化
3 ステップ サイクリング：*†‡			
変性	15 秒	94℃	
アニーリング	30 秒	55℃	
エクステンション§	30 秒	70℃	蛍光データの収集を行なう
サイクル数	40 cycles [¶]		

* Bio-Rad models CFX96™および CFX384™に関しては ramp rate を 1℃ /s にする。

† Eppendorf® Mastercycler® ep realplex models 2、2S、4、4S の Silver Thermoblock は ramp rate を 26 %、Aluminum Thermoblock は ramp rate を 35%にする。

‡ Roche® LightCycler® 480 を使用する場合は、ramp rate を 1℃ /s にする。

§ 各サイクラーの特性に応じて、蛍光検出ステップは ABI PRISM® 7000 では最低 30 秒間、Applied Biosystems® 7300 および 7500 では 34 秒間で行なう。

¶ Roche LightCycler 480 を用いる場合は、45 サイクルを使用する。

8. プレート／Rotor-Disc をサーマルサイクラーにセットし、サイクリングプログラムをスタートする。

注：PCR 産物の特異性と同一性を確認するために、解離曲線解析を行ないます。解離曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーが提供するインストラクションに従ってください。

プロトコール：Precursor miRNA を検出するためのリアルタイム PCR

miScript II RT Kit と miScript HiFlex Buffer で調製した cDNA は本プロトコールの最適なスタートサンプルです。本プロトコールでは、ターゲット特異的 miScript Precursor Assays および miScript SYBR Green PCR Kit に付属の QuantiTect SYBR Green Master Mix を用いて、precursor miRNA のリアルタイム定量 PCR を実現します。miScript Precursor Assay は precursor-miRNA-specific forward および reverse primer のプライマーセットです。miScript Universal Primer は使用しません。

実験を始める前の重要事項

- PCR ステップは、まず **95℃で 15 分のインキュベーション**により HotStarTaq® DNA Polymerase (2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 中に含まれる) を活性化します。
- precursor miRNA 検出では、必要に応じて cDNA を RNase フリー水で希釈可能です (6 ページ、表 4)。
- mature miRNA と precursor miRNA を同時に定量する場合には、全ての反応において precursor miRNA 検出で推奨されているようにテンプレート cDNA 量を増加することをお奨めします (10 ~ 20 ng)。これにより結果を直接比較できます。
- **miScript Universal Primer を使用しないでください。**
- テンプレート cDNA あるいは miScript SYBR Green PCR Kit の構成成分はいずれもボルテックスしないでください。
- ゲノム DNA (1 ng / 反応) をポジティブコントロールとして使用できます。ゲノム DNA と研究対象の precursor miRNA を同時に増幅することにより、両方のサンプルからの解離曲線を比較し、解離曲線のオーバーラップを検証できます。
- 初めて miScript Primer Assay を使用する場合は、まず英語版 Handbook 6 ページ、“Shipping and Storage” の説明に従って使用前にこれを溶解します。
- iCycler iQ、iQ5 または MyiQ を使用する際は、各実験の初めに Well Factor の測定が必要です。システムやピペッティングによるばらつきを補正する際に Well Factor を使用します。詳細は機器に付属のユーザーマニュアル、あるいは www.qiagen.co.jp で “Technical Information : Using QuantiTect SYBR Green Kits on Bio-Rad cyclers” をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix**、**10x miScript Precursor Assay**、**テンプレート cDNA**、**RNase フリー水**を室温（15 ~ 25℃）で解凍する。各溶液を混和する。
2. ウェルあたりの反応容量が **10 µl**（**384 ウェルプレート**）、**25 µl**（**96 ウェルプレート**）、**20 µl**（**Rotor-Disc 100** を使用）になるように、表 7 に従って反応ミックスを調製する。

反応ミックスにはテンプレート cDNA 以外の全成分が含まれています。ホットスタート PCR 法のため、反応のセットアップ中、あるいはリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上で保冷する必要はありません。

表 7. リアルタイム PCR の反応セットアップ

成分	容量／反応 (384 ウェル)	容量／反応 (96 ウェル)	容量／反応 (Rotor-Disc 100) *
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [†]	5 µl	12.5 µl	10 µl
10x miScript Precursor Assay [‡]	1 µl	2.5 µl	2 µl
RNase フリー水	適量	適量	適量
テンプレート cDNA (ステップ 3 で添加) [§]	≤1 µl	≤2.5 µl	≤2 µl
トータル容量	10 µl	25 µl	20 µl

* これらの容量は Rotor-Gene Q 72-Well Rotor と共に使用する Strip Tube で行なう反応セットアップにも使用できる。

[†] Mg²⁺ 濃度の至適化は不要。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix を用いて得られる Mg²⁺ の最終濃度で最高の結果が得られる。

[‡] miScript Precursor Assay には forward および reverse primer が入っている。miScript Universal Primer を添加しない。

[§] 希釈した cDNA 量は最終反応容量の 10% を超えないようにする。miScript II RT Kit と miScript HiFlex Buffer を用いて調製した cDNA について、この容量が当てはまる。cDNA の最終濃度は反応あたり 10 ~ 20 ng にする。

3. 個々のプレート／Rotor-Disc のウェルにテンプレート cDNA を分注する。
4. 反応ミックスを完全かつ慎重に、テンプレート cDNA の入ったプレート／Rotor-Disc のウェルに適切な量を分注する。

5. キャップ、フィルム、Rotor-Disc Heat-Sealing Film でプレートあるいは Rotor-Disc を慎重に、しっかりとシールする。
6. 室温（15 ～ 25℃）で 1,000 g、1 分間遠心操作して、気泡を除去する。
注：本ステップは Rotor-Disc での反応セットアップには不要です。
7. 表 8 に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーをプログラムする。

表 8. リアルタイム PCR のサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
PCR 初期の活性化 ステップ	15 分	95℃	HotStarTaq DNA Polymerase は この加熱ステップにより活性化
3 ステップ サイクリング：*†‡			
変性	15 秒	94℃	
アニーリング	30 秒	55℃	
エクステンション§	30 秒	70℃	蛍光データの収集を行なう
サイクル数	40 cycles¶		

* Bio-Rad models CFX96 および CFX384 に関しては ramp rate を 1℃ /s にする。

† Eppendorf Mastercycler ep realplex models 2、2S、4、4S の Silver Thermoblock は ramp rate を 26 %、Aluminum Thermoblock は ramp rate を 35%にする。

‡ Roche LightCycler 480 を使用する場合は、ramp rate を 1℃ /s にする。

§ 各サイクラーの特性に応じて、蛍光検出ステップは ABI PRISM 7000 では最低 30 秒間、Applied Biosystems 7300 および 7500 では 34 秒間で行なう。

¶ Roche LightCycler 480 を用いる場合は、45 サイクルを使用する。

8. プレート／Rotor-Disc をサーマルサイクラーにセットし、サイクリングプログラムをスタートする。

注：PCR 産物の特異性と同一性を確認するために、解離曲線解析を行ないます。解離曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーが提供するインストラクションに従ってください。

プロトコール：mRNAを検出するためのリアルタイムPCR

miScript II RT Kit と miScript HiFlex Buffer を用いて調製した cDNA が、このプロトコールの適切なスタートサンプルとなります。本プロトコールは、ターゲット特異的な QuantiTect Primer Assays と、miScript SYBR Green PCR Kit に付属の QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix を用いて、mRNA のリアルタイム定量 PCR を実施します。QuantiTect Primer Assays は mRNA に特異的な forward および reverse primers のプライマーセットで、miScript Universal Primer は使用しません。リアルタイム PCR による mRNA 検出の詳細に関しては QuantiTect Primer Assay Handbook (www.qiagen.com/KB/PrimerAssay) をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- PCR ステップは、まず **95℃で 15 分のインキュベーション**により HotStarTaq DNA Polymerase (2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 中に含まれる) を活性化します。
- mRNA の検出では、必要に応じて cDNA を RNase フリー水で適切な量に希釈可能です (6 ページ、表 4)。
- **miScript Universal Primer を使用しないでください。**
- テンプレート cDNA あるいは miScript SYBR Green PCR Kit の構成成分はいずれもボルテックスしないでください。
- 初めて QuantiTect Primer Assay を使用する場合は、まず QuantiTect Primer Assay の Handbook に従って使用前にこれを溶解します。
- iCycler iQ、iQ5 または MyiQ を使用する際は、各実験の初めに Well Factor の測定が必要です。システムやピペッティングによるばらつきを補正する際に Well Factor を使用します。詳細は機器に付属のユーザーマニュアル、あるいは www.qiagen.co.jp で “Technical Information : Using QuantiTect SYBR Green Kits on Bio-Rad cyclers” をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix、10x QuantiTect Primer Assay、テンプレート cDNA、RNase フリー水**を室温 (15 ~ 25℃) で解凍する。各溶液を混和する。
2. ウェルあたりの反応容量が **10 µl (384 ウェルプレート)、25 µl (96 ウェルプレート)、20 µl (100 ウェルの Rotor-Disc を使用)** になるように、表 9 に従って反応ミックスを調製する。

ホットスタート PCR 法のため、反応のセットアップ中、あるいはリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上で保冷する必要はありません。

表 9. リアルタイム PCR の反応セットアップ

成分	容量／反応 (384 ウェル)	容量／反応 (96 ウェル)	容量／反応 (Rotor-Disc 100) *
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [†]	5 µl	12.5 µl	10 µl
10x QuantiTect Primer Assay [‡]	1 µl	2.5 µl	2 µl
RNase フリー水	適量	適量	適量
テンプレート cDNA (ステップ 3 で添加) [§]	≤1 µl	≤2.5 µl	≤2 µl
トータル容量	10 µl	25 µl	20 µl

* これらの容量は Rotor-Gene Q 72-Well Rotor と共に使用する Strip Tube で行なう反応セットアップにも使用できる。

[†] Mg²⁺ 濃度の至適化は不要。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix を用いて得られる Mg²⁺ の最終濃度で最高の結果が得られる。

[‡] QuantiTect Primer Assay は forward および reverse primer を含む。miScript Universal Primer を添加しない。

[§] 希釈した cDNA 量は最終反応容量の 10%を超えないようにする。miScript II RT Kit と miScript HiFlex Buffer を用いて調製した cDNA について、この容量が当てはまる。cDNA の最終濃度は反応あたり 10 ~ 20 ng にする。

3. 個々のプレート／Rotor-Disc のウェルにテンプレート cDNA を分注する。
4. 反応ミックスを完全かつ慎重に、テンプレート cDNA の入ったプレート／Rotor-Disc のウェルに適切な量を分注する。
5. キャップ、フィルム、Rotor-Disc Heat-Sealing Film でプレートあるいは Rotor-Disc を慎重に、しっかりとシールする。
6. 室温 (15 ~ 25℃) で 1,000 g、1 分間遠心操作して、気泡を除去する。
注：本ステップは Rotor-Disc での反応セットアップには不要です。
7. 表 10 に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーをプログラムする。
蛍光取り込みはエクステンションステップで行なわれます。

表 10. リアルタイム PCR のためのサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
PCR 初期の活性化 ステップ	15 分	95℃	HotStarTaq DNA Polymerase は この加熱ステップにより活性化
3 ステップ サイクリング：*†‡			
変性	15 秒	94℃	
アニーリング	30 秒	55℃	
エクステンション §	30 秒	70℃	蛍光データの収集を行なう
サイクル数	40 cycles†		

* Bio-Rad models CFX96 および CFX384 に関しては ramp rate を 1℃ /s にする。

† Eppendorf Mastercycler ep realplex models 2、2S、4、4S の Silver Thermoblock は ramp rate を 26 %、Aluminum Thermoblock は ramp rate を 35%にする。

‡ Roche LightCycler 480 を使用する場合は、ramp rate を 1℃ /s にする。

§ 各サイクラーの特性に応じて、蛍光検出ステップは ABI PRISM 7000 では最低 30 秒間、Applied Biosystems 7300 および 7500 では 34 秒間で行なう。

† Roche LightCycler 480 を用いる場合は、45 サイクルを使用する。

8. プレート／Rotor-Disc をサーマルサイクラーにセットし、サイクリングプログラムをスタートする。

注:PCR 産物の特異性と同一性を確認するために、解離曲線解析を行ないます。解離曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーが提供するインストラクションに従ってください。

トラブルシューティング

コメント

リアルタイム PCR で産物が無い、あるいは遅れて検出される（逆転写反応中に問題が生じていることを示唆）

- | | | |
|----|---|---|
| a) | 逆転写反応のセットアップの際に、ピペッティングエラーまたは試薬の入れ忘れ | 実験のセットアップに用いたピペットをチェックする。解凍後、全ての試薬をよく混和し、逆転写反応をもう一度行なう。 |
| b) | 逆転写反応のセットアップが不適切 | 反応液を氷上でセットアップしたことを確認する。 |
| c) | 逆転写反応に用いたテンプレート RNA の品質が悪い、あるいは量が間違っている | プロトコールを開始する前にテンプレート RNA の濃度、分解度、純度をチェックする。テンプレート RNA を解凍後、よく混和する。特に少量の RNA を用いた際に、微量の RNase でも cDNA 合成や RT-PCR の感度に影響することがある。 |
| d) | RNA 濃度が高すぎる、あるいは低すぎる | miScript Reverse Transcriptase Mix と miScript HiSpec Buffer を併用する場合の RNA は 10 pg ~ 2 µg、miScript Reverse Transcriptase Mix と miScript HiFlex Buffer を併用する場合の RNA は 10 pg ~ 1 µg 使用する。1 µg より多い RNA を使用する場合には、反応液量を比例計算でスケールアップする。10 pg 以下の RNA 量を使わない。4 ページ、表 2 参照。 |
| e) | RNA が変性されている | テンプレート RNA の変性は不要。RNA の変性を行なった場合には、RNA が分解することがある。 |
| f) | インキュベーション温度が高すぎる | 逆転写反応は必ず 37℃ で行なう。これより高い温度では cDNA 産物の長さが短くなったり、miScript Reverse Transcriptase Mix の活性が低下する。ヒートブロックまたは水浴の温度をチェックする。 |

リアルタイム PCR で産物がない、あるいは遅れて検出される、またはプライマーダイマーのみを検出 (リアルタイム PCR 中に問題が生じていることを示唆)

- | | | |
|----|--|--|
| a) | QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix の保存が不適切 | QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix は、受け取った後直ちに恒温冷凍庫に入れ -20℃ で保存する。 |
| b) | リアルタイム PCR に添加した逆転写反応液量が多すぎる | PCR ミックスに添加する逆転写反応液量が多すぎると、増幅効率と反応の直線性が低下することがある。一般に、逆転写反応液量は PCR 最終反応量の 10% を超えないようにする。 |
| c) | PCR アニーリング時間が短すぎる | プロトコールに特化したアニーリング時間を使用する。 |
| d) | PCR エクステンション時間が短すぎる | プロトコールに特化したエクステンション時間を使用する。 |
| e) | PCR のセットアップの際にピペッティングエラーあるいは試薬の入れ忘れ | 実験のセットアップに用いたピペットをチェックする。解凍後、全ての試薬をよく混和し、逆転写反応をもう一度行なう。 |
| f) | HotStarTaq DNA Polymerase がホットスタートで活性化されていない | HotStarTaq DNA Polymerase のホットスタート活性化ステップを含むサイクリングプログラムであることを確認；詳細はプロトコールを参照。 |
| g) | リアルタイム PCR 用のプライマー濃度が最適でない | リアルタイム PCR キット用のプロトコールで推奨されているプライマー濃度を使用する。 |
| h) | PCR アニーリング温度が高すぎる | 3℃ ずつアニーリング温度を下げる。 |
| i) | PCR アニーリング温度が低すぎる | 2℃ ずつアニーリング温度を上げる。 |

コメント

- | | | |
|----|-------------------------|---|
| j) | 検出の設定がされていない | サイクリングプログラムで蛍光検出が設定されていることをチェックする。 |
| k) | 間違った検出ステップ | 蛍光検出がPCR サイクリングプログラムのエクステンションステップで行なわれたか確認する。 |
| l) | リアルタイム PCR プライマーが分解 | 変性ポリアクリルアミドゲルでプライマー分解の可能性をチェックする。 |
| m) | 間違った色素 layer/filter を設定 | 適切な layer/filter を設定したことを確認する。 |
| n) | スタートテンプレート量が不十分 | テンプレート cDNA 量を増やす。 |

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) | テンプレート量が多すぎる | 推奨された cDNA テンプレート量の最大量を超えないようにする。詳細はプロトコルを参照。 |
| b) | テンプレート量が少なすぎる | テンプレート cDNA 量を増やす。 |

“No Template” コントロールで強い蛍光強度

- | | | |
|----|----------------|----------------------------|
| a) | 試薬のコンタミ | 反応液を捨てて、新しい試薬で実験を繰り返す。 |
| b) | 反応セットアップ中にコンタミ | 適切な対応策を講じる（例；フィルターチップの使用）。 |

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が汚染されている | 使用説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーの汚染を除去する。 |
| 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 | 使用説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのキャリブレーションを再度行なう。 |

“No RT” コントロールでシグナルがある

- | | |
|--------------------|--|
| RNA サンプル中に DNA が存在 | RNA サンプル中にゲノム DNA の混入がないことを確認する（例えば、miRNeasy Kit を使用する場合はカラム上での DNase 分解を行なう）。 |
|--------------------|--|

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, QuantiTect®, RNeasy®, Rotor-Gene™, Rotor-Disc™ (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); SYBR® (Life Technologies Corporation); Bio-Rad®, CFX96™, CFX384™, iCycler®, iQ®, MyiQ™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Roche®, LightCycler® (Roche Group); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG).

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。

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.co.jp の “Trademarks and Disclaimers” をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.co.jp から入手可能です。

© 2011 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

