

QIAGEN® Multiplex PCR プロトコールとトラブルシューティング

迅速で効率的なマルチプレックスPCR用

目次	ページ
プロトコール	
スタンダードなマルチプレックスPCR	2
マイクロサテライト遺伝子座の増幅用マルチプレックスPCR	5
Q-Solution を用いたマルチプレックスPCR	8
トラブルシューティング	11



プロトコール：スタンダードなマルチプレックスPCR

本プロトコールは、スタンダードのマルチプレックスPCRアプリケーション用に最適化されています。10種類以上の反応を行うマルチプレックスPCRあるいは微量のテンプレートをを用いる高度なアプリケーションに関しては、英語版 Handbook 41 ページ、Appendix Fをご覧ください。

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てください。
- 既に確立されているマルチプレックスPCRシステムを用いる場合には、使用しているアニーリング温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。
- アニーリングは90秒間行ないます。
- プライマー濃度はすべて同じにします (0.2 μM)。
- PCRは最初に95 15分の活性化ステップで HotStarTaq DNA Polymerase を活性化させます (このプロトコールのステップ7を参照)。
- オプション：温度勾配機能を持つサーマルサイクラーを使用する場合には、gradient PCRを行ない最適なアニーリング温度を決定します (英語版 Handbook 35 ページの Appendix C 参照)。

操作手順

1. 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (-20 で保存している場合)、テンプレートDNA、RNaseフリー水、プライマーミックスを融解する。使用直前に溶液を攪拌混和する。

塩濃度が偏らないように、使用前に溶液を完全に混和します。すべてのプライマーが混合したプライマーミックスを調製することにより、実験毎に各プライマーをピペッティングする必要がなく、ピペッティング回数を抑え、実験結果の再現性が増加します (プライマーミックスの調製は英語版 Handbook 9 ページ、Table 2を参照)。

2. 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DNAを除く、マルチプレックスPCRに必要なすべての成分が含まれています。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します。反応容量が50 μl 以下の場合には、QIAGEN Multiplex PCR Master Mix量とプライマーミックスおよびテンプレートのトータル容量の比が1 : 1になるように調製します (表7参照)。

注：2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix中に既に含有されている3 mMの Mg^{2+} 濃度で実験を始めることをお勧めします。

表7. マルチプレックスPCR反応液組成（反応ミックスとテンプレートDNA）

成分	容量 / 反応	最終濃度
反応ミックス		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix*	25 μ l	1x
10x プライマーミックス、 各プライマー； 2 μ M (英語版 Handbook、Table 2 参照)	5 μ l	0.2 μ M [†]
RNase フリー水	適量	-
テンプレートDNA		
テンプレートDNA、ステップ4で添加	適量	≤ 1 μ g DNA/50 μ l
トータル容量	50 μl[†]	

* MgCl₂の最終濃度は3 mM。

[†] 0.2 μ Mのプライマー最終濃度は、ほとんどのプライマー・テンプレートシステムで最適である。しかし、0.1 ~ 0.3 mMのプライマー濃度でも増幅が改善されることがある。

[†] 50 μ l以下の容量では、QIAGEN Multiplex PCR Master Mix量およびプライマーとテンプレートのトータル容量の比が1 : 1になるようにする。

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量をPCRチューブあるいはプレートに分注する。

例えば反応ミックスを数回、上下にピペティングして、静かに混和します。ホットスタートPCRなので、反応のセットアップ中にサンプルを氷上で保存する必要はありません。

4. 反応ミックスを含んだ個々のPCRチューブにテンプレートDNAを50 μ l反応液当たり1 μ g以下になるように添加する。

マルチプレックスRT-PCRでは、テンプレートとして加えるcDNA（RT反応液から）の量が10%を超えないようにします。

5. 加熱の蓋付きサーマルサイクラーを用いる場合には、ミネラルオイルを使用しない。ステップ6に進む。それ以外のサーマルサイクラーでは、約50 μ lのミネラルオイルを上に乗せる。

6. メーカーの仕様書に従ってサイクリングプログラムをセットする。

オプション：温度勾配機能を持つサーマルサイクラーを使用する場合には、gradient PCRを行ない最適なアニリング温度を決定します。

7. PCRチューブをサーマルサイクラーに入れて、表8に記載したプログラムをスタートする。

各PCRプログラムはまずHotStarTaq DNA Polymeraseを95 15分間の初期活性化ステップで活性化します。

増幅後、サンプルは2 ~ 8 で一晩、あるいは-20°Cで長期保存が可能です。

表 8. 一般的なマルチプレックスPCRサイクリング条件

			コメント
初期活性化ステップ：	15分	95	HotStarTaq DNA Polymeraseはこのヒーティングステップにより活性化。
3ステップのサイクリング：			
変性	30秒	94	
アニーリング	90秒	57 ~ 63	gradient PCRを行なえない場合には、アニーリングを60 で始める。一番低いプライマーの T_m^* が60 以下の場合には、アニーリングを57 で始める。
エクステンション	90秒	72	約1.5 kbまでのターゲットに最適 [†]
サイクル数	30 ~ 45		サイクル数はテンプレートDNA量と、検出に必要な感度に依存する（英語版 Handbook 35ページのAppendix C参照）。
最終エクステンション：	10分	72	

* T_m の求め方： $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{number of [A+T]}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{number of [G+C]})$

† ターゲットが1.5 kb以上の場合には、2分間のエクステンションで結果が改善されることがある。

8. 適切な検出システムを用いてサンプル解析を行なう。例えば、アガロースゲル電気泳動（最適なアガロース濃度の選択には英語版 Handbook 10ページ、Table 3を参照）、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動などを用いる。

検出の際十分なシグナルを得るための最適なPCR産物のロード量は、個々に決めてください。

プロトコール：マルチプレックスPCRを用いたマイクロサテライト遺伝子座の増幅

本プロトコールは、スタンダードのマルチプレックスPCRを用いたマイクロサテライト遺伝子座の増幅用に最適化されています。10種類以上の反応を行うマルチプレックスPCRあるいは微量のテンプレートを用いる高度なアプリケーションに関しては、英語版 Handbook 41 ページ、Appendix F をご覧下さい。

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。
- 既に確立されているマルチプレックスPCRシステムを用いる場合には、使用しているアニーリング温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。
- アニーリングは90秒間行ないます。
- プライマー濃度はすべて同じにします(0.2 μM)。
- PCRは最初に95 15分の活性化ステップで HotStarTaq DNA Polymerase を活性化します(このプロトコールのステップ7を参照)。
- オプション：温度勾配機能を持つサーマルサイクラーを使用する場合には、gradient PCRを行ない最適なアニーリング温度を決定します(英語版 Handbook 35 ページの Appendix C 参照)。

操作手順

1. 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix(-20 で保存している場合)、テンプレートDNA、RNase フリー水、プライマーミックスを融解する。使用直前に溶液を攪拌混和する。

塩濃度が偏らないように、使用前に溶液を完全に混和します。すべてのプライマーが混合したプライマーミックスを調製することにより、実験毎に各プライマーをピペティングする必要がなく、ピペティング回数を抑え、実験結果の再現性が増加します(プライマーミックスの調製は英語版 Handbook 9 ページ、Table 2 を参照)。

2. 表9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DNAを除く、マルチプレックスPCRに必要なすべての成分が含まれています。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します。反応容量が50 μl以下の場合には、QIAGEN Multiplex PCR Master Mix量とプライマーミックスおよびテンプレートのトータル容量の比が1:1になるように調製します(表9参照)。

注：2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix中に既に含有されている3 mMのMg²⁺濃度で実験を始めることをお勧めします。

表9.マルチプレックスPCR反応液組成（反応ミックスとテンプレートDNA）

成分	容量 / 反応	最終濃度
反応ミックス		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix*	25 µl	1x
10x プライマーミックス、各プライマー; 2 µM (英語版 Handbook、Table 2 参照)	5 µl	0.2 µM†
RNase フリー水	適量	-
テンプレートDNA		
テンプレートDNA(ステップ4で添加)	適量	≤1 µg DNA/50 µl
トータル容量	50 µl‡	

* MgCl₂の最終濃度は3 mM。

† 最終プライマー濃度は、ほとんどのプライマー・テンプレートシステムでは0.2 µMが最適である。しかし、0.1 ~ 0.3 mMのプライマー濃度でも増幅が改善されることがある。

‡ 50 µl以下の容量では、QIAGEN Multiplex PCR Master Mix量とプライマーおよびテンプレートのトータル容量の比が1 : 1になるようにする。

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量をPCRチューブあるいはプレートに分注する。

例えば反応ミックスを数回、上下にピペティングして、静かに混和します。ホットスタートPCRなので、反応のセットアップ中にサンプルを氷上で保存する必要はありません。

4. 反応ミックスを含んだ個々のPCRチューブにテンプレートDNAを50 µl反応液当たり1 µg以下になるように添加する。

マルチプレックスRT-PCRでは、テンプレートとして加えるcDNA（RT反応液から）の量が10%を超えないようにします。

5. 加熱の蓋付きサーマルサイクラーを用いる場合には、ミネラルオイルを使用しない。ステップ6に進む。それ以外のサーマルサイクラーでは、約50 µlのミネラルオイルを上に乗せる。

6. メーカーの仕様書に従ってサイクリングプログラムをセットする。

オプション：温度勾配機能を持つサーマルサイクラーを使用する場合には、gradient PCRを行ない最適なアニーリング温度を決定します。

7. PCRチューブをサーマルサイクラーに入れ、表10に従ってプログラムをスタートする。

各PCRプログラムはまずHotStarTaq DNA Polymeraseを95 °C 15分間の初期活性化ステップで活性化します。

増幅後、サンプルは2 ~ 8 °Cで一晩、あるいは-20°Cで長期保存が可能です。

表 10. マイクロサテライト PCR サイクリング条件

			コメント
初期活性化ステップ：	15分	95	HotStarTaq DNA Polymerase はこのステップにより活性化。
3ステップのサイクリング：			
変性	30秒	94	
アニーリング	90秒	57 ~ 63	gradient PCR を行なわない場合には、アニーリングを 60 で始める。一番低いプライマーの T_m^* が 60 以下の場合には、アニーリングを 57 で始める。
エクステンション	60秒	72	約 1.5 kb までのターゲットに最適 [†]
サイクル数	25 ~ 40		サイクル数はテンプレート DNA 量と、検出で必要な感度に依存する（英語版 Handbook 35 ページの Appendix C 参照）。
最終エクステンション：	30分	60	

* T_m の求め方： $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{number of [A+T]}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{number of [G+C]})$

[†] ターゲットが 0.5 kb 以上の場合には、90 秒間のエクステンションで結果が改善されることがある。

8. 適切な検出システムを用いてサンプル解析を行なう。例えば、ゲルベースの DNA 自動シーケンサー、あるいはキャピラリー電気泳動をベースにしたものを用いる。
- 検出の際十分なシグナルを得るための最適な PCR 産物のロード量は、個々に決めてください。

プロトコール：Q-Solutionを用いたマルチプレックスPCR

本プロトコールは、通常のコンディションでうまく増幅されないタ - ゲットシークエンスの増大とスタンダードのマルチプレックスPCRアプリケーション用に最適化されています。10種類以上の反応を行うマルチプレックスPCRあるいは微量のテンプレートを用いる高度なアプリケーションに関しては、英語版 Handbook 41 ページ、Appendix F をご覧下さい。Q-Solution に関する詳細は英語版 Handbook 14 ページをご覧ください。

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。
- マルチプレックスPCR アッセイに始めて Q-Solution を使用する場合には、増幅反応は Q-Solution 使用 / 未使用で並行して行ないます。Q-Solution の最終濃度は 0.5x にします。
- 既に確立されているマルチプレックスPCR システムを用いる場合には、使用しているアニーリング温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
- アニーリングは 90 秒間行ないます。
- プライマー濃度はすべて同じにします (0.2 μM)
- PCR は最初に 95 15 分の活性化ステップで HotStarTaq DNA Polymerase を活性化します (このプロトコールのステップ 7 を参照)
- オプション：温度勾配機能を持つサーマルサイクラーを使用する場合には、gradient PCR を行ない最適なアニーリング温度を決定します (英語版 Handbook 35 ページの Appendix C 参照)

操作手順

1. 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (-20 で保存している場合)、テンプレート DNA、5 x Q-Solution、RNase フリー水、プライマーミックスを融解する。使用直前に溶液を攪拌混和する。

塩濃度が偏らないように、使用前に溶液を完全に混和します。すべてのプライマーが混合したプライマーミックスを調製することにより、実験毎に各プライマーをピペッティングする必要がなく、ピペッティング回数を抑え、実験結果の再現性が増加します (プライマーミックスの調製は英語版 Handbook 9 ページ、Table 2 を参照)

表 11. マルチプレックスPCR反応液組成（反応ミックスとテンプレートDNA）

成分	容量 / 反応	最終濃度
反応ミックス		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix*	25 μ l	1x
10x プライマーミックス 各プライマー； 2 μ M (英語版 Handbook、Table 2 参照)	5 μ l	0.2 μ M [†]
Q-Solution, 5x	5 μ l	0.5x
RNase フリー水	適量	-
テンプレートDNA		
テンプレートDNA(ステップ4で添加)	適量	≤ 1 μ g DNA/50 μ l
トータル容量	50 μl[‡]	

* MgCl₂ の最終濃度は 3 mM。

[†] 0.2 μ M のプライマー最終濃度は、プライマー・テンプレートシステムで最適。しかし 0.1 ~ 0.3 mM 濃度のプライマー濃度でも増幅が改善されることがある。

[‡] 50 μ l 以下の容量では、QIAGEN Multiplex PCR Master Mix 量とプライマーおよびテンプレートのトータル量の比が 1 : 1 になるようにする。

2. 表 11 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DNAを除く、マルチプレックスPCRに必要なすべての成分が含まれています。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します。反応容量が 50 μ l 以下の場合には、QIAGEN Multiplex PCR Master Mix 量とプライマーミックスおよびテンプレートのトータル容量の比が 1 : 1 になるように調製します（表 11 参照）。

注：2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix 中に既に含有されている 3 mM の Mg²⁺ 濃度で実験を始めることをお勧めします。

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量を PCR チューブあるいはプレートに分注する。

例えば反応ミックスを数回、上下にピペティングして、静かに混和します。ホットスタートPCRなので、サンプルを反応のセットアップ中に氷上で保存する必要はありません。

4. 反応ミックスを含んだ個々のPCRチューブにテンプレートDNAを 50 μ l 反応液当たり 1 μ g 以下添加する。

マルチプレックスRT-PCRでは、テンプレートとして加えるcDNA（RT反応液から）の量が10%を超えないようにします。

表 12. 一般的なマルチプレックスPCRサイクリング条件

			コメント
初期活性化ステップ：	15分	95	HotStarTaq DNA Polymeraseはこのステップにより活性化。
3ステップのサイクリング：			
変性	30秒	94	
アニーリング	90秒	57 ~ 63	gradient PCRを行なわない場合には、アニーリングを60 で始める。一番低いプライマーの T_m^* が60 以下の場合には、アニーリングを57 で始める。
エクステンション	60秒	72	約 1.5 kbまでのターゲットに最適 [†]
サイクル数	30 ~ 45		サイクル数はテンプレートDNA量と、検出で必要な感度に依存する（英語版 Handbook 35ページのAppendix C参照）。
最終エクステンション：	10分	72	

* T_m の求め方： $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{number of [A+T]}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{number of [G+C]})$

[†] ターゲットが0.5 kb以上の場合には、90秒間のエクステンションで結果が改善されることがある。

- 加熱の蓋付きサーマルサイクラーを用いる場合には、ミネラルオイルを使用しない。ステップ6に進む。それ以外のサーマルサイクラーでは、約50 μl のミネラルオイルを重層する。
- メーカーの指示に従って、サイクリングプログラムをセットする。
オプション：温度勾配機能を持つサーマルサイクラーを使用する場合には、gradient PCRを行ない最適なアニーリング温度を決定します。
- PCRチューブをサーマルサイクラーに入れ、表12に従ってプログラムをスタートする。
各PCRプログラムは、まず95 15分間の初期活性化ステップを行なうことによりHotStarTaq DNA Polymeraseを活性化します。
増幅後、サンプルは2 ~ 8 で一晩、あるいは -20°C で長期保存が可能です。
- 適切な検出システムを用いてサンプル解析を行なう。例えば、アガロースゲル電気泳動（最適なアガロース濃度の選択には英語版 Handbook 10ページ、Table 3を参照）、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動などを用いる。
検出の際十分なシグナルを得るための最適なPCR産物のロード量は、個々に決めてください。

トラブルシューティングガイド

コメント

産物がないあるいは少ない

- a) HotStarTaq DNA Polymeraseが活性化されていない
プロトコールのステップ7 (3、6、10ページ) に記述されているように、サイクリングプログラムに95 15分の HotStarTaq DNA Polymerase活性化ステップが含まれていることを確認する。
- b) ピペット操作ミスあるいは試薬の入れ忘れ
PCRを繰り返す。プライマー、テンプレートDNAを含む試薬の濃度と保存条件をチェックする。使用前にすべての溶液をよく混和する。
- c) プライマー濃度が適切でない
0.2 μMのプライマー濃度を用いる。長いターゲット (1.5 kb以上) の増幅反応では、0.1 μMのプライマー濃度と2分間のエクステンション時間により結果が改善されることがある。マルチプレックスPCRの精度に影響するので、プライマーの濃度は0.3 ~ 0.4 μM以上を使用することは薦めない。プライマーストック溶液の濃度をチェックする。プライマー濃度の計算は英語版 Handbook 33ページのAppendix Bを参照。
- d) サイクル数が十分でない
PCRサイクル数を増やす。英語版 Handbook 35ページのAppendix Cをガイドラインとして参照。
- e) PCRサイクリング条件が最適でない
正しいサイクリング条件を用いたことを確認する (4、7、10ページのそれぞれ表8、10、12)。90秒のアニーリング時間を用いたことを確認。可能なら、最適なアニーリング温度を決めるためにgradient PCRを行なう (英語版 Handbook 35ページのAppendix C参照)。
- f) プライマーが分解あるいは品質が低い
シングルPCR反応でプライマー・ペアの機能と特異性をチェックする。品質の高いプライマーを使用すること。変性ポリアクリルアミドゲルでプライマーの分解の可能性をチェックする。必要な場合、プライマーストック溶液から新しいプライマー・ミックスを調製し、少量に分注して-20 で保存する。凍結 / 融解を繰り返さない。

コメント

- g) アニール温度が高い
英語版 Handbook 32 ページ、Appendix A に従って、プライマーの適切なアニール温度を決める。アニール温度を 3 °C ずつ下げる。アニール時間は 90 秒を使用する。可能なら、gradient PCR を用いて、最適なアニール温度を決める（英語版 Handbook 35 ページの Appendix C 参照）。
- h) GC リッチなテンプレートあるいは高度な二次構造を持つテンプレートが存在
0.5 x Q-Solution を用いて、同じサイクリング条件でマルチプレックス PCR をやり直す。8 ページのプロトコールに進む。これらの条件では増幅不可能な非常に高い GC 濃度を持つテンプレートの場合には、1x Q-Solution を用いてマルチプレックス PCR を別に行なう。
- i) プライマーのデザインが最適でない
プライマーをデザインしなおす。マルチプレックス PCR プライマーのデザインに関する一般的なガイドラインは英語版 Handbook 32 ページの Appendix A を参照する。
- j) スタートのテンプレート量が十分でない
テンプレートのスタート量を 50 µl 反応液あたり 1 µg まで増やす。
- k) スタートのテンプレートの品質が低い
DNeasy キットなどを用いて精製した高品質 DNA のみを使用する（英語版 Handbook 10 ページ参照）。
- l) スタートのテンプレートに問題
スタートのテンプレートの濃度、保存条件、品質についてチェックする（英語版 Handbook 33 ページの Appendix B を参照）。必要な場合、ストック溶液からテンプレート核酸を新たに連続希釈する。新しく希釈したテンプレートで、マルチプレックス PCR をやり直す。
- m) PCR 産物が長すぎる。
至適化されたプロトコールでは最高 1.5 kb までのターゲットの増幅が可能。1.5 ~ 2.0 kb の長さのターゲットではエクステンション時間を 2 分にする。0.5 kb 長くなるごとにエクステンション時間を 30 秒間ずつ増加する。
- n) 加熱の蓋つきサーマルサイクラーでミネラルオイルを用いて PCR を行なった
加熱の蓋つきサーマルサイクラーで PCR を行なう場合には、加熱の蓋のスイッチがオンになった状態でミネラルオイルを PCR サンプルに重層しない。PCR 産物の収量が低下することがある。
- o) サーマルサイクラーに問題
サーマルサイクラーの電源をチェックして正しくプログラムされていることを確認する。

コメント

産物が全く検出されない、あるいはわずかに検出されるのみ

- a) プライマーが分解あるいは品質が低い シングルPCR反応でプライマー・ペアの機能と特異性をチェックする。品質の高いプライマーを使用すること。変性ポリアクリルアミドゲルでプライマーの分解の可能性をチェックする。必要なら、プライマーストック溶液から新しいプライマー・ミックスを調製し、少量に分注して-20 で保存する。凍結/融解を繰り返さない。
- b) プライマー濃度が適切でない 0.2 μMのプライマー濃度を用いる。長いターゲット(1.5 kb以上)の増幅反応では0.1 μMのプライマー濃度で結果が改善されることがある。マルチプレックスPCRの精度に影響するので、プライマー濃度は0.3 ~ 0.4 μM以上を使用することは薦めない。プライマーストック溶液の濃度をチェック。プライマー濃度の計算は英語版 Handbook 33ページのAppendix Bを参照。
- c) PCRサイクリング条件が最適でない 正しいサイクリング条件を用いたことを確認する(4、7、10ページのそれぞれ表8、10、12)。90秒のアニーリング時間を用いたことを確認。可能なら、最適なアニーリング温度を決めるためにgradient PCRを行なう(英語版 Handbook 35ページのAppendix C参照)。
- d) 最終エクステンションステップがないあるいはこのステップが最適でない 4、7、10ページの表8、10、12に従って、最終エクステンションステップを行なう。未変性条件下でマルチプレックスPCR産物の検出をする際には、10種類以上のPCR産物あるいは1.5 kb以上のPCR産物には68 ~ 15分間の最終エクステンションステップを実行すると、結果が改善されることがある。マイクロサテライト解析には、最終エクステンション・ステップは60 ~ 30分間行なう。
- e) アニーリング温度が高い 正しいサイクリング条件を用いたことを確認する(4、7、10ページのそれぞれ表8、10、12)。アニーリング時間は90秒を使用する。可能な場合、gradient PCRを用いて最適なアニーリング温度を決める(英語版 Handbook 35ページのAppendix C参照)。

コメント

- f) GCリッチなテンプレートあるいは高度な二次構造を持つテンプレートが存在
Q-Solutionを用いて、同じサイクリング条件でマルチプレックスPCRを繰り返す。8ページのプロトコールに進む。これらの条件では増幅不可能な非常に高いGC濃度を持つテンプレートの場合には、1x Q-Solutionを用いてマルチプレックスPCRを別に行なう。
- g) 感度が不十分
非常に高い感度を必要とする場合には、アニーリング時間を3分間に延長すると、マルチプレックスPCRの感度はさらに増加する。

特異的PCR産物以外の増幅産物を検出

- a) PCRサイクリング条件が最適でない
正しいサイクリング条件を用いたことを確認する(4、7、10ページのそれぞれ表8、10、12)。90秒のアニーリング時間を用いたことを確認。可能なら、最適なアニーリング温度を決めるためにgradient PCRを行なう(英語版 Handbook 35ページのAppendix C参照)。
- b) PCRサイクル数が多すぎる
サイクル数が多すぎると、非特異的バックグラウンドが増加することがある。PCRのサイクル数を3つずつ減らして最適なサイクル数を決定する。
- c) アニーリング温度が低い
英語版 Handbook 32ページ、Appendix Aに従って、プライマーの適切なアニーリング温度を決める。アニーリング温度を2 ずつ増やす。アニーリング時間は90秒を使用する。可能な場合、gradient PCRを用いて最適なアニーリング温度を決める(英語版 Handbook 35ページのAppendix C参照)。
- d) Mg^{2+} 濃度が最適でない
QIAGEN Multiplex PCR Master Mixに既に添付されている3 mMの Mg^{2+} 濃度を用いる。稀に、 Mg^{2+} 濃度を増加すると産物収量が増加することがある。 Mg^{2+} 濃度を0.5 mMずつ増やし、様々な最終濃度の Mg^{2+} でマルチプレックスPCRを行なう。
- e) プライマー濃度が適切でない
0.2 μ Mのプライマー濃度を用いる。長いターゲット(1.5 kb以上)の増幅反応では0.1 μ Mのプライマー濃度で結果が改善されることがある。マルチプレックスPCRの精度に影響するので、プライマー濃度は0.3 ~ 0.4 μ M以上を使用することは薦めない。プライマーストック溶液の濃度をチェックする。プライマー濃度の計算は英語版 Handbook 33ページのAppendix Bを参照。

コメント

- f) プライマーのデザインが最適でない
プライマーをデザインしなおす。マルチプレックスPCRプライマーのデザインに関する一般的なガイドラインは英語版 Handbook 32 ページの Appendix A を参照する。
- g) いくつかのプライマーが一種類の産物だけでなく他のPCR産物を生成する
例えば、一つの遺伝子座の数カ所を増幅する場合、マルチプレックスプライマー・ペアは近距離でテンプレートに結合しているが、外側に結合しているプライマーとペアになり、より大きな産物を付加的に増幅することがある（英語版 Handbook 36 ページの Appendix E 参照）。
- h) プライマーが分解あるいは品質が低い
シングルPCR反応でプライマー・ペアの機能と特異性をチェックする。十分品質の高いプライマーを使用すること。変性ポリアクリルアミドゲルでプライマーの分解の可能性をチェックする。必要な場合、プライマーストック溶液から新しいプライマー・ミックスを調製し、少量に分注して-20 で保存する。凍結/融解を繰り返さない。
- i) 偽遺伝子の増幅
プライマーが偽遺伝子シークエンスにアニーリングし、不必要なPCR産物が増幅した。偽遺伝子の検出を避けるために、プライマーデザインを再考する。マルチプレックスPCRプライマーのデザインに関する一般的なガイドラインは英語版 Handbook 32 ページの Appendix A を参照する。
- j) 最終エクステンションステップがない、あるいはこのステップが最適でない
4、7、10 ページの表 8、10、12 に従って、最終エクステンションステップを行なう。未変性条件下でマルチプレックスPCR産物の検出をする際には、10 種類以上のPCR産物あるいは1.5 kb以上のPCR産物には68 15分間の最終エクステンションステップを実行すると、結果が改善されることがある。マイクロサテライト解析には、最終エクステンション・ステップは60 で30分間行なう。
- k) GCリッチなテンプレートあるいは高度な二次構造を持つテンプレートが存在
Q-Solutionを用いて、同じサイクリング条件でマルチプレックスPCRをやり直す。8 ページのプロトコールに進む。これらの条件では増幅不可能な非常に高いGC濃度を持つテンプレートの場合には、1x Q-Solutionを用いてマルチプレックスPCRを別に行なう。

コメント

未変性条件下でマルチプレックスPCR産物の検出が行なわれている場合（例；アガロースゲル、あるいは未変性ポリアクリルアミドゲル）：

ある産物にスミア、あるいは産物が一種類だけでなく他のPCR産物が観察される。

- a) PCRサイクル数が多すぎる サイクル数が多すぎると、非特異的バックグラウンドが増加することがある。PCRのサイクル数を3回ずつ減らして最適なサイクル数を決定する。
- b) スタートテンプレート量が多い スタートテンプレートDNAの濃度をチェックする（英語版 Handbook 12ページ、表5参照）。少ないDNA量（例；50 µl反応液当たり1 µg）でマルチプレックスPCRを繰り返す。
- c) 最終エクステンションステップがない
あるいはこのステップが最適でない 4、7、10ページの表8、10、12に従って、最終エクステンションステップを行なう。未変性条件下でマルチプレックスPCR産物の検出をする際には、10種類以上のPCR産物あるいは1.5 kb以上のPCR産物には68 15分間の最終エクステンションステップを実行すると、結果が改善されることがある。マイクロサテライト解析には、最終エクステンション・ステップは60 で30分間行なう。
- d) GC含量が低い、あるいはPCR産物が長いために再生が不完全 10種類以上のPCR産物あるいは1.5 kb以上のPCR産物には68 15分間の最終エクステンションステップを用いることを推奨する。
- e) 二本鎖産物が電気泳動の際に解離する GC含量の低いPCR産物では高圧の電気泳動の際に解離することがある。泳動バッファを熱しすぎないために、電圧を下げる。
- f) 銀染色の際のバックグラウンド PCR産物をゲルに載せる前に精製する（QIAquick® Gel Extraction KitあるいはMinElute™ Gel Extraction Kitを使用）。

コメント

変性条件下でマルチプレックスPCR産物の検出が行なわれている場合（例；自動シーケンサー、キャピラリー電気泳動）：

産物が一種類だけでなく他のPCR産物が観察される。

- a) ロードしたサンプル量が多い
多量のサンプルをロードすると付加的なピークが生じることがある。バックグラウンドが減少し十分な高さのピークが得られるまで、ロードするサンプル量を減らす（ABI PRISM® 310あるいは377 Genetic Analyzerで測定した場合、典型的なピーク高さはrelative fluorescent unitが2000以下）。
- b) メインピークの前に弱いピーク（“stutter peak”）がある
マイクロサテライトDNAの増幅の際、メインピークより通常1リピート・ユニット短い“stutter peak”のようなアーティファクトが観察されることがある。上述したようにロード量を減少することを推奨する。弱いピークの長さが1塩基分短い場合には“n-1産物が観察される”を参照。
- c) サンプルが完全に変性されていない
サンプルをロードする前に95℃で3分間加熱して変性する。
- d) n-1産物が観察される
4、7、10ページの表8、10、12に従って、最終エクステンションステップを行なったことを確認する。最終エクステンションステップが正確に行なわれている場合には、サイクル数および/あるいはテンプレート量を減らす。
- e) 蛍光色素からのシグナル強度が異なる
相当する量のPCR産物が生成されているにもかかわらず、ある種の蛍光色素ではある特定の検出機器で異なるシグナル強度を与えることがある。検出機器メーカーの推奨する方法に従って、マルチプレックスPCR用の蛍光色素を組み合わせることを推奨する。

コメント

弱いピークあるいはアレイピークがない

- a) キャピラリー電気泳動 注入に問題がある
(分子量マーカーも影響をうける)
- b) ホルムアミドの品質が低い
- サンプルをもう一度注入してみる。注入器のO-ringをチェックしてサンプルが漏れていないことを確認。蛍光検出機器が正しく機能していることを確認。
- ABI PRISM 310 Genetic Analyzer 上でのサンプル解析には高品質のホルムアミドを使用すること。ホルムアミドの導電率は100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下にする。

RT-PCRを行なった場合：

産物がないかほとんどない

RT反応エラー

RT反応ではスタートRNAのわずか10～30%がcDNAに転写される。テンプレートとして添加するRT反応液の量は最終PCR量の10%を超えないようにする。

大きなサイズの非特異的増幅産物がある

ゲノムDNAのコンタミ

大きなサイズの非特異的増幅産物はコンタミしたゲノムDNAの増幅の結果起きることがある。この場合はRNAをDNase I (例； QIAGEN RNase-Free DNase Set, cat no.79254を使用)で前処理する。または、ターゲット mRNA の splice junction に位置するようなプライマーを使用し、ゲノムDNAの増幅を避ける。

— Memo —

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



W W W . Q I A G E N . C O . J P

2300909 08/2005