

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

QuantiFast Multiplex RT-PCR Kit — ROX passive
reference dye を含むマスターミックス添付

QuantiFast Multiplex RT-PCR +R Kit — ROX passive
referencex dye は別途包装され、マスターミックスには
ROX 色素を含まない

配列特異的なプローブを用いて高速な1ステップでの
マルチプレックス・リアルタイム定量RT-PCR



目次

プロトコール

マルチプレックス RT-PCR (ほとんどの Applied Biosystems Cyclor) 3

マルチプレックス RT-PCR (Applied Biosystems 7500 および
その他のサイクラー) 7

トラブルシューティング 11

プロトコール：マルチプレックス RT-PCR（ほとんどの Applied Biosystems Cyclers）

本プロトコールは、Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systemを除く Applied Biosystemsのリアルタイム用サーマルサイクラーで、Quantifast Multiplex RT-PCR KitとTaqMan®プローブを用いた実験用に最適化されています。詳細は英語版 Handbook 10ページの“Passive reference dye”および11ページのTable 1をご覧ください。

注：サイクラーの特性のために、4-plex RT-PCRはApplied Biosystems 7500のみで可能です。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールに記載されているサイクリング条件およびプライマー濃度で常に開始してください。
- 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強くお勧めします。
- 英語版 Handbook 15ページ、“Guidelines for effective multiplex assays”をご覧ください。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用サーマル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マルチプレックス・リアルタイム RT-PCR アッセイを用いる場合には、その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る必要はありません。
- 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、すべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとの設定（ベースラインと threshold 値など）を各ランで再調整する必要があります。

実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、各ターゲット毎に特異的なプライマーとプローブの両方を含む 20x プライマー／プローブミックス溶液を調製することを推奨します。マルチプレックス RT-PCR 用に推奨の 20x プライマー／プローブミックスの組成は、TE バッファー中に 8 μM の forward primer、8 μM の reverse primer、4 μM のプローブになります。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 50 ページの Appendix D をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiFast Multiplex RT-PCR Master Mix**、RNAテンプレート、プライマー／プローブ溶液、RNaseフリー水を解凍する。それぞれの溶液を混和して氷上で保冷する。**QuantiFast RT Mix**は使用直前に-20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに-20℃に戻す。
2. 表 15 (5 ページ) に従って反応ミックスを調製する。
注：反応ミックス調製中はサンプルを氷上で保冷します。
注：2x QuantiFast Multiplex RT-PCR Master Mix に添加されている至適化済みの Mg^{2+} 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。
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で保冷します。
4. それぞれの PCR チューブあるいはウェルに RNA テンプレート (≤ 100 ng) を添加する。
注：リアルタイム用サーマルサイクラーをプログラムするまでチューブあるいはプレートを氷上で保冷します。
5. 表 16 (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。
注：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ごとに Detector 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。
6. PCR チューブあるいはプレートをリアルタイム用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。
7. データ解析を行なう。
データ解析を始める前に、解析設定 (ベースラインと threshold 値など) をプローブごとに選択します。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。

表 15. 反応セットアップ

成分	容量	最終濃度
2x QuantiFast Multiplex RT-PCR Master Mix	12.5 μ l	1x
20x プライマー／プローブミックス 1 [†]	1.25 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 [†]	1.25 μ l	0.4 μ M forward primer 2 [†] 0.4 μ M reverse primer 2 [†] 0.2 μ M probe 2 [§]
Triplex／4-plex アッセイ： 20x プライマー／プローブミックス 3 [†]	1.25 μ l	0.4 μ M forward primer 3 [†] 0.4 μ M reverse primer 3 [†] 0.2 μ M probe 3 [§]
4-plex アッセイ： 20x プライマー／プローブミックス 4 [†]	1.25 μ l	0.4 μ M forward primer 4 [†] 0.4 μ M reverse primer 4 [†] 0.2 μ M probe 4 [§]
QuantiFast RT Mix	0.25 μ l	0.25 μ l/反応
RNase フリー水	適量	-
RNA テンプレート (ステップ 4 で添加)	適量	\leq 100 ng/反応
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 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する。Applied Biosystems 7900HT で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10 μ l の反応量を使用する。

[†] マルチプレックス RT-PCR 用に推奨の 20x プライマー／プローブミックスの組成は、TE バッファー中に 8 μ M の forward primer、8 μ M の reverse primer、4 μ M のプローブ。

[‡] 最終プライマー濃度は 0.4 μ M が最適。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する。

[§] 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る。プローブ合成の際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 μ M の間である。

表 16. 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℃	RNAはcDNAに逆転写される
PCR初期活性化	5分	95℃	HotStarTaq® Plus DNA Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
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℃	
アニーリング/ エクステンション	30秒	60℃	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RNAテンプレートおよびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

プロトコール：マルチプレックス RT-PCR (Applied Biosystems 7500 およびその他のサイクラー)

本プロトコールは、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System および Bio-Rad®/MJ eSearch、Cepheid®、Eppendorf®、Roche®、Stratagene® のリアルタイム用サーマルサイクラー上で TaqMan プローブと **Quantifast Multiplex RT-PCR +R Kit** を用いた実験用に最適化されています。詳細は英語版 Handbook 10 ページの “Passive reference dye” および 11 ページの Table 1 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されているサイクリング条件およびプライマー濃度で常に開始してください。
- 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強くお勧めします。
- 英語版 Handbook 15 ページ、 “Guidelines for effective multiplex assays” をご覧ください。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用サーマル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マルチプレックス・リアルタイム RT-PCR アッセイを用いる場合には、その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。
- **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、すべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとの設定（ベースラインと threshold 値など）を各ランで再調整する必要があります。
- **LightCycler® 2.0** または **LightCycler 480** を使用する際は、color compensation ファイルを作成します。実験に関する詳細は www.qiagen.com/literature で QIAGEN Supplementary Protocol PCR81 (LightCycler 2.0) あるいは PCR82 (LightCycler 480) をダウンロードしてご覧ください。

実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、各ターゲット毎に特異的なプライマーとプローブの両方を含む 20x プライマー/プローブミックス溶液を調製することを推奨します。マルチプレックス RT-PCR 用に推奨の 20x プライマー/プローブミックスの組成は、TE バッファー中に 8 μ M の forward primer、8 μ M の reverse primer、4 μ M のプローブになります。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 50 ページ、Appendix D をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiFast Multiplex RT-PCR Master Mix (w/o ROX)、50x ROX Dye Solution、RNA テンプレート、プライマー／プローブ溶液、RNase フリー水を解凍する。**それぞれの溶液を混和して氷上で保冷する。**QuantiFast RT Mix**は使用直前に-20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに-20℃に戻す。
2. 表 17 (9 ページ) に従って反応ミックスを調製する。
注：反応ミックス調製中はサンプルを氷上で保冷します。
注：2x QuantiFast Multiplex RT-PCR Master Mix (w/o ROX) に添加されている至適化済みのMg²⁺濃度で実験を始めることを強くお勧めします。
3. 反応ミックスを完全に混和し、**PCR チューブ、PCR キャピラリー、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、キャピラリー、あるいはプレートを氷上で保冷します。
4. それぞれの**PCR チューブ、キャピラリーあるいはウェルに RNA テンプレート (≤100 ng)** を添加する。
注：リアルタイム用サーマルサイクラーをプログラムするまでチューブ、キャピラリーあるいはプレートを氷上で保冷します。
5. 表 18 (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。
注：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。
6. **PCR チューブ、キャピラリーあるいはプレートをリアルタイム用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。**
7. **データ解析を行なう。**
データ解析を始める前に、解析設定 (ベースラインと threshold 値など) は各プローブごとに選択します。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。

表 17. 反応セットアップ

成分	容量/反応		最終濃度
	96ウェル ブロック	高速/ キャピラリー [†]	
2x QuantiFast Multiplex RT-PCR Master Mix (w/o ROX)	12.5 µl	10 µl	1x
50x ROX Dye Solution [‡]	0.5 µl	0.4 µl	1x
20x プライマー/ プローブミックス 1 [§]	1.25 µl	1 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 [§]	1.25 µl	1 µl	0.4 µM forward primer 2 [¶] 0.4 µM reverse primer 2 [¶] 0.2 µM probe 2 ^{**}
Triplex/4-plex アッセイ :			
20x プライマー/ プローブミックス 3 [§]	1.25 µl	1 µl	0.4 µM forward primer 3 [¶] 0.4 µM reverse primer 3 [¶] 0.2 µM probe 3 ^{**}
4-plex アッセイ :			
20x プライマー/ プローブミックス 4 [§]	1.25 µl	1 µl	0.4 µM forward primer 4 [¶] 0.4 µM reverse primer 4 [¶] 0.2 µM probe 4 ^{**}
QuantiFast RT Mix	0.25 µl	0.2 µl	-
RNase フリー水	適量	適量	-
RNA テンプレート (ステップ 4 で添加)	適量	適量	≤100 ng/反応
トータル反応容量	25 µl*	20 µl*	-

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 µl あるいは 20 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。LightCycler 480 で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10 µl の反応量を使用する。

[†] Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System および LightCycler 2.0 のようなキャピラリー・サイクラー。

[‡] ROX 色素が不要なサイクラーでは、代わりに RNase フリー水を添加する。

[§] マルチプレックス RT-PCR 用の 20x プライマー/プローブミックスの組成は、TE バッファー中に 8 µM の forward primer、8 µM の reverse primer、4 µM のプローブ。

[¶] 最終プライマー濃度は 0.4 µM が最適。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する。

** 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る。プローブ合成の際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。

表 18. 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℃	RNAはcDNAに逆転写される
PCR初期活性化	5分	95℃	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
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℃	
アニーリング/ エクステンション	30秒	60℃	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RNAテンプレートおよびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

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、あるいは一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。サイクリング条件に HotStarTaq Plus DNA Polymerase 活性化ステップ (95℃、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) 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 44 ページ、Appendix A を参照する。RT-PCR 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
ほとんどの場合、ほぼ全てのリアルタイム用サーマルサイクラーでプライマー濃度は 0.4 μM を使用する。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、プローブ濃度を 0.1~0.4 μM に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 44 ページ、Appendix A を参照)。
市販のプローブを利用したアッセイを使用する場合は (例; TaqMan Gene Expression Assays)、メーカーが推奨するように反応液中の最終濃度を 1x にする。

コメント

- f) Mg^{2+} 濃度が最適でない 2x QuantiFast Multiplex RT-PCR Master Mixes 中の Mg^{2+} 濃度は既に最適化されている。 Mg^{2+} 濃度を 0.5 ~ 1.0 mM 増やすと結果が改善されることがある。
- g) スタートテンプレートに問題 スタート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。
必要な場合には、核酸テンプレートのストック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 RT-PCR を繰り返す。
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・フリーであることを確認する。
- h) 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。
- i) サイクル数が少ない サイクル数を増やす。
- j) プローブデザインが適正でない 増幅反応しているのなら、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 44 ページ、Appendix A 参照）。
- k) 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。
- l) 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マルチプレックス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検証するために適切なコントロールを用いてテストする。

Multiplex RT-PCR アッセイと相当する singleplex RT-PCR 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。各レポーター色素ごとに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
マルチプレックス RT-PCR 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 : Spectral compensation を用いた解析と用いない解析の両方を行なう。

LightCycler 2.0 : Color compensation アルゴリズムのために、singleplex とマルチプレックス反応の増幅プロットの形が異なることがある。

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。

コメント

“No Template” コントロール (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繰り返す。
- b) わずかなプローブ分解 増幅プロットをチェックし、threshold 値を調節する。
により蛍光強度が増加

“No Reverse Transcription” コントロールで蛍光強度が高い

- ゲノム DNA が RNA cDNA ターゲットのみを増幅・検出するために、エキソン/エキソン境界にかかるプライマーおよび/あるいはプローブをデザインする。
サンプルにコンタミ コンタミしているゲノム DNA を分解するために RNA サンプルを DNase 処理する。

蛍光強度がばらつく

- a) リアルタイム用 メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマル
サーマルサイクラーが サイクラーのコンタミを除去する。
コンタミ
- b) リアルタイム用 メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマル
サーマルサイクラーの サイクラーの較正をもう一度行なう。
補正がずれている
- c) ターゲットの発現が 解析設定でバックグラウンドを計算するために使用
高く多量のテンプレ したサイクル数を (ご使用のリアルタイム用サーマ
ートで曲線が波状になる ルサイクラーが変更可能な場合) 減らすか、テンプレ
ート量を減らす。
- d) **ABI PRISM 7000 :** 反応液量は 25 μ l 以上にする。プレートの蓋に optical
曲線が滑らかでない、 adhesive cover を必ず使用する。反応液量を 50 μ l に
あるいは実験結果の 増加すると、結果が改良されることがある。
ばらつきが大きい

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, Quantifast™ (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Roche®, LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); Eppendorf® (Eppendorf AG); Cepheid® (Cepheid); 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。

© 2009 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

