

QuantiFast Probe PCR

プロトコールとトラブルシューティング

QuantiFast Probe PCR Kit

QuantiFast Probe PCR +ROX Vial Kit

配列特異的なプローブを用いた迅速なリアルタイムPCR
および2ステップRT-PCR用



目次

プロトコール

ダブル標識プローブを用いてほとんどのApplied Biosystems® CycloerでリアルタイムPCR / 2ステップRT-PCR	3
Applied Biosystems 7500およびその他のサイクラーでのダブル標識プローブを用いたリアルタイムPCR / 2ステップRT-PCR	6
FRETプローブを用いたリアルタイムPCR / 2ステップRT-PCR	9
トラブルシューティング	12

プロトコール：ダブル標識プローブを用いてほとんどの Applied Biosystems Cyclar でリアルタイム PCR / 2 ステップ RT-PCR

本プロトコールは、Applied Biosystems 7500を除く Applied Biosystems のほとんどのサイクラーで QuantiFast Probe PCR Kit とダブル標識プローブ（例；TaqMan®）の使用に適しています。詳細は英語版 Handbook 10 ページの “ Passive reference dye ” をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- 既に確立されたプライマー・プローブシステムを用いる場合でも、このプロトコールで決められているサイクリング条件で実験を始めてください。
- 配列特異的なプローブを用いた効率的なリアルタイム PCR には、増幅ターゲットの長さは 70 ~ 200 bp が理想的です（さらに長い増幅産物に関しては、英語版 Handbook 37 ページ、Appendix C を参照）。
- HotStarTaq® Plus DNA Polymerase を活性化するため、PCR で最初に必ず 95 °C で 3 分間のインキュベーションを行なってください。
- 96 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 25 µl にすることを推奨します。384 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 10 µl にすることを強く推奨します。
- 常に 2x QuantiFast Probe PCR Master Mix に添加済みの Mg²⁺ 濃度で実験を始めてください。

操作方法

1. 2x QuantiFast Probe PCR Master Mix、テンプレート DNA あるいは cDNA、プライマー / プローブ溶液、RNase フリー水を解凍する。各溶液をミックスする。
2. 表 3 に従って反応ミックスを調製する。

ホットスタート PCR のため、反応のセットアップ中あるいはリアルタイム・サイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上に保存する必要はありません。

注：2x QuantiFast Probe PCR Master Mix に添加済みの Mg²⁺ 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

表3. 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	384 ウェル ブロック	
2x QuantiFast Probe PCR Master Mix	12.5 µl	5 µl	1x
プライマー A	適量	適量	0.4 µM
プライマー B	適量	適量	0.4 µM
プローブ	適量	適量	0.2 µM
テンプレート DNA または cDNA (ステップ 4 で添加)	適量	適量	≤200 ng / 反応
RNase フリー水	適量	適量	
トータル量	25 µl	10 µl	

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量を PCR 容器あるいはプレートに分注する。
4. DNA あるいは cDNA テンプレート (反応あたり 200 ng 以下) を反応ミックスの入ったそれぞれの PCR 容器あるいはウェルに添加する。
2ステップ RT-PCR には、テンプレートとして加える cDNA (未希釈の RT 反応液から) の量が最終 PCR 容量の 10% を超えないようにします。
5. 表 4 に記載したプログラムのアウトラインに従って、リアルタイムサイクラーのプログラミングを行なう。
データ収集は、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われます。

表4 リアルタイム・サイクラー条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
PCR最初の活性化	3分	95	最高/ 高速モード	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymeraseはこのヒーティングステップで活性化される。
2ステップのサイクリング				
変性：	3秒*	95	最高/ 高速モード	
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	30秒*	60	最高/ 高速モード	蛍光データ回収を行なう。
サイクル数：	35 ~ 40			サイクル数はテンプレートDNA量に依存。

* お客様のサイクラーでこの時間を設定できない場合には、できるだけ短い時間を選んでください（例；ABI PRISM 7700では変性5秒、ABI PRISM 7000またはApplied Biosystems 7300ではアニーリング/エクステンションは31秒）。

- PCR容器あるいはプレート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。

プロトコール： Applied Biosystems 7500 およびその他のサイクラーでのダブル標識プローブを用いたリアルタイムPCR / 2ステップRT-PCR

本プロトコールは、Applied Biosystems 7500 および Bio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Corbett Research、Eppendorf®、Roche®、Stratagene® のサイクラーで Quantifast Probe PCR +ROX Vial Kit とダブル標識プローブ（例；TaqMan）の使用に適しています。詳細は英語版 Handbook 10 ページの “Passive reference dye” をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- 既に確立されたプライマー・プローブシステムを用いる場合でも、このプロトコールで決められているサイクリング条件で実験を始めてください。
- 配列特異的なプローブを用いた効率的なリアルタイムPCRには、増幅ターゲットの長さは 70 ~ 200 bp が理想的です（さらに長い増幅産物に関しては、英語版 Handbook 37 ページ、Appendix C を参照）。
- HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化するため、PCR で最初に必ず 95 ° で 3 分間のインキュベーションを行なってください。
- 96 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 25 µl にすることを推奨します。Applied Biosystems 7500 Fast System および キャピラリーサイクラーに関しては、最終容量を 20 µl にすることを推奨します。384 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 10 µl にすることを強く推奨します。
- 常に 2x Quantifast Probe PCR Master Mix (w/o ROX) に添加済みの Mg²⁺ 濃度で実験を始めてください。
- 添付の ROX 色素溶液は Applied Biosystems 7500 に必須で、オプションとして Mx3000P、Mx3005P、Mx4000 に使用できます。ROX 色素液はその他のサイクラーでは不要です。

操作方法

1. 2x Quantifast Probe PCR Master Mix (w/o ROX)、テンプレートDNAあるいはcDNA、プライマー/プローブ溶液、ROX色素溶液、RNaseフリー水を解凍する。各溶液をミックスする。

オプション：ROX色素を用いた反応を常に行なう場合には、2x Quantifast Probe PCR Master Mix (w/o ROX) にROX色素液を添加し長期間使用できます。詳細は英語版 Handbook 11 ページの “Adding ROX dye to the master mix” をご覧ください。

2. 表5に従って反応ミックスを調製する。

ホットスタートPCRのため反応のセットアップ中あるいはリアルタイム・サイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上に保存する必要はありません。

注：2x QuantiFast Probe PCR Master Mix (w/o ROX) に添加済みのMg²⁺濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

表5. 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* ブロック	384ウェル ブロック	
2x QuantiFast Probe PCR Master Mix (w/o ROX)	12.5 µl	10 µl	5 µl	1x
プライマーA	適量	適量	適量	0.4 µM
プライマーB	適量	適量	適量	0.4 µM
プローブ	適量	適量	適量	0.2 µM
50x ROX Dye Solution [†]	0.5 µl	0.4 µl	- [‡]	1x
テンプレートDNAまたは cDNA(ステップ4で添加)	適量	適量	適量	≤200 ng / 反応
RNase フリー水	適量	適量	適量	
トータル量	25 µl	20 µl	10 µl	

* Applied Biosystems 7500 Fast System あるいはキャピラリーサイクラー。

[†] Applied Biosystems 7500 で必要、Mx3000P、Mx3005P、Mx4000 ではオプション。2x QuantiFast Probe PCR Master Mix (w/o ROX) をあらかじめ50x ROX Dye Solution と混和すると便利です (英語版 Handbook 11 ページ参照)。

[‡] 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。

[§] ROX 色素が不要な LightCycler[®] 480 では、最終容量を 10 µl にす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、適切な量をPCR容器あるいはプレートに分注する。

4. DNAあるいはcDNAテンプレート (反応あたり 200 ng 以下) を反応ミックスの入ったそれぞれのPCR容器あるいはウェルに添加する。

2ステップRT-PCRには、テンプレートとして加えるcDNA (未希釈のRT反応液から)の量が最終PCR容量の10%を超えないようにします。

5. 表6に記載したプログラムのアウトラインに従って、リアルタイムサイクラーのプログラミングを行なう。

データ収集は、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われます。

表6 リアルタイム・サイクラー条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
PCR最初の活性化	3分	95	最高/ 高速モード	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ステップのサイクリング				
変性：	3秒*	95	最高/ 高速モード	
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	30秒*	60	最高/ 高速モード	蛍光データ回収を行なう。
サイクル数：	35 ~ 40			サイクル数はテンプレートDNA量に依存。

* お客様のサイクラーでこの時間を設定できない場合には、できるだけ短い時間を選んでください。

6. PCR容器あるいはプレート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。

プロトコール： FRET プローブを用いたリアルタイム PCR / 2ステップ RT-PCR

本プロトコールは、LightCycler 1.x、LightCycler 2.0、Rotor-Gene™ 3000 での Quantifast Probe PCR +ROX Vial Kit と FRET プローブの使用に適しています。詳細は英語版 Handbook 10 ページの “ Passive reference dye ” をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- 既に確立されたプライマー・プローブシステムを用いる場合でも、このプロトコールで決められているサイクリング条件で実験を始めてください。
- 配列特異的なプローブを用いた効率的なリアルタイム PCR には、増幅ターゲットの長さは 70 ~ 200 bp が理想的です。
- HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化するため、PCR で最初に必ず 95 °C で 3 分間のインキュベーションを行なってください。
- LightCycler に関しては、最終容量を 20 µl にすることを推奨します。Rotor-Gene 3000 に関しては、最終容量を 25 µl にすることを推奨します。
- 常に 2x Quantifast Probe PCR Master Mix (w/o ROX) に添加済みの Mg²⁺ 濃度で実験を始めてください。

操作手順

1. 2x Quantifast Probe PCR Master Mix (w/o ROX)、テンプレート DNA あるいは cDNA、プライマー / プローブ溶液、RNase フリー水を解凍する。各溶液をミックスする。
2. 表 7 に従って反応ミックスを調製する。

ホットスタート PCR のため、反応のセットアップ中あるいはリアルタイム・サイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上に保存する必要はありません。

注： 2x Quantifast Probe PCR Master Mix (w/o ROX) に添加済みの Mg²⁺ 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

表7. 反応セットアップ

成分	容量 / 反応		最終濃度
	Rotor-Gene	LightCycler	
2x QuantiFast Probe PCR Master Mix (w/o ROX)	12.5 µl	10 µl	1x
プライマー A	適量	適量	0.6 µM*
プライマー B	適量	適量	0.6 µM*
プローブ A (donor)	適量	適量	0.2 µM
プローブ B (acceptor)	適量	適量	0.2 µM [†]
テンプレート DNA または cDNA (ステップ 4 で添加)	適量	適量	≤200 ng / 反応
RNase フリー水	適量	適量	
トータル量	25 µl	20 µl	

* 0.6 µM はほとんどのアプリケーションで最適なプライマー最終濃度です。最適な濃度を決定する必要がある場合には、0.6 µM ~ 1 µM のプライマー濃度で決定する。

[†] 最終濃度が 0.4 µM のプローブ B を用いて好結果が得られることがある。

3. 反応ミックスを完全に混合し、適切な量を PCR 容器に分注する。
4. DNA あるいは cDNA テンプレート (反応あたり 200 ng 以下) を反応ミックスの入ったそれぞれの PCR 容器に添加する。
2 ステップ RT-PCR には、テンプレートとして加える cDNA (未希釈の RT 反応液から) の量が最終 PCR 容量の 10 % を超えないようにします。
5. 表 8 に記載したプログラムのアウトラインに従って、リアルタイムサイクラーのプログラミングを行なう。
データ収集はアニーリング・ステップで行ないます。

表 8. リアルタイム・サイクラー条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
PCR最初の活性化	3分	95	最高 / 高速モード	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymeraseはこのヒーティングステップで活性化される。
3ステップのサイクリング				
変性：	10秒	95	最高 / 高速モード	
アニーリング：	15秒	50 ~ 60	最高 / 高速モード	プライマーの T_m より約5 ~ 8 低い温度。蛍光データ回収を行なう。
エクステンション：	15秒	72	最高 / 高速モード	
サイクル数：	35 ~ 40			サイクル数はテンプレートDNA量に依存。

6. PCR容器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。

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、3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 °C、3分) が含まれていることを確認する。
- c) ピペティング・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 30、34 ページ、Appendix B を参照する。PCR をもう一度行なう。
- d) 検出ステップが間違っている、あるいはない。
TaqMan プローブを用いた際にはアニーリング/エクステンションを組み合わせたステップ中に、FRET プローブを用いた際はアニーリング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。TaqMan プローブは各プライマーの濃度を 0.4 μM にする。FRET プローブでは 0.6 μM を使用 (最適な濃度を決定する必要がある場合には、0.6 μM ~ 1 μM のプライマー濃度で決定する)。
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。FRET プローブに関しては、acceptor probe の最終濃度が 0.4 μM を用いて好結果が得られることがある。
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 30、34 ページの Appendix B を参照)。

コメント

-
- | | |
|---------------------------|---|
| f) スタートテンプレートに問題 | 濃度、保存条件、スタート・テンプレートの品質をチェックする(英語版 Handbook 27 ページ、Appendix A 参照)。
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。これを用いて PCR を再度行なう。 |
| 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) サイクル数が少ない | サイクル数を増やす。 |
| i) 反応量が多すぎた | 96 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 25 μ l にすることを推奨する。Applied Biosystems 7500 Fast System およびキャピラリーサイクラーに関しては、最終容量を 20 μ l にすることを推奨する。384 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 10 μ l にすることを強く推奨する。 |
| j) PCR 産物が長すぎる | 最適な結果には、PCR 産物は 100 ~ 150 bp の長さにする。PCR 産物の長さが 70 ~ 200 bp を外れないようにする。増幅産物が 200 ~ 500 bp の場合は、英語版 Handbook 37 ページ、Appendix C 参照。 |
| k) プライマー・デザインが適切でない | PCR 産物をゲル電気泳動によりチェックする。特異的 PCR 産物が検出されない場合は、primer design guideline を再考する(英語版 Handbook 30 ページ、Appendix B 参照)。 |
| l) プローブデザインが最適でない | 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・デザインを再考する(英語版 Handbook 30 ページ、Appendix B 参照)。 |
| m) 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。 |
| n) PCR アニーリング温度が高すぎる | アニーリング温度を 2 ずつ下げる。 |
| o) PCR アニーリング温度が低すぎる | アニーリング温度を 2 ずつ上げる。 |

コメント

-
- p) 検出の設定が有効でない
サイクリングプログラムで蛍光検出が有効かをチェックする。
- q) プローブ合成が最適でない
DNase Iとのインキュベーションにより、ダブル標識プローブの品質をチェックする。蛍光色素およびクエンチャーを含んだプローブが正しく合成されていると、DNase Iインキュベーション後に顕著な蛍光強度の増加が見られる。
- r) 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。
- s) RT-PCRのみ：
添加したRT反応液量が多すぎる
PCRに添加したRT反応液の量が多すぎると、増幅効率と反応の直線性は低下する。通常添加するRT反応液量（未希釈）は、最終PCR量の10%を超えてはならない。

テンプレート量の対数値と C_t value/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
テンプレートの量が推奨された最大値を超えないようにする。
- b) テンプレートの量が低すぎる
テンプレートの量を増やす。
- c) RT-PCRのみ：
添加したRT反応液量が多すぎる
PCRに加えるRT溶液の量が多いと、増幅効率が低下する。一般に、逆転写反応液量（未希釈）はPCR最終反応量の10%を超えないようにする。テンプレートとして大量の逆転写反応液を使用する場合は、使用するアッセイで最高容量を決定する。

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。新しい試薬でアッセイをもう一度繰り返す。
- b) 反応セットアップ中にコンタミ
フィルター付チップを使用するなど、反応セットアップ中に適切な安全対策を講じる。
- c) 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。

逆転写反応液無添加のコントロールで強い蛍光強度

ゲノムDNAが
RNAサンプルに混入

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。

ゲノムDNAの除去とcDNA合成を一緒に行なえるQuantiTect® Reverse Transcription Kitを用いて逆転写反応を行なう。あるいは混入しているゲノムDNAを分解するためにRNAサンプルをDNase処理する。

蛍光強度が変動する

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・
サイクラーが較正され
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。

すべてのサイクラーシステム：

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（使用しているリアルタイム・サイクラーが可能な場合）か、テンプレートを減らす。

d) ΔRn 値が高すぎるか
あるいは低すぎる

間違った QuantiFast Probe PCR Kit をご使用のリアルタイムサイクラーに使用。サイクラーに適切なキットを選ぶ際は、英語版 Handbook 11 ページの表 1 を参照する。

Applied Biosystems 7000のみ：

e) 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。

LightCycler システムのみ：

f) PCR ミックスが
キャピラリーチップに
入っていない

キャピラリーチップに PCR ミックスを入れるために、キャピラリーを遠心する。

g) キャピラリーが完全に
押し込まれていない

キャピラリーが完全に LightCycler カロセルに押し込まれていることを確認する。

h) 検出チャンネルを
間違えている

正しいチャンネルを選択したことを確認する。

Applied Biosystems 7500のみ：

- i) “ Auto Ct ”、“ Analysis Settings ”、あるいは threshold の初期設定値 0.2 を用いて増幅シグナルがない
- QuantiFast Probe PCR +ROX Vial Kit の代わりに QuantiFast Probe PCR Kit を使用したために ROX シグナルが非常に高い。シグナルを解析するために、初期設定値の threshold 値を低く調節する。スタートポイントとして 0.01 を使用する。詳細は英語版 Handbook 44 ページの Appendix F を参照。

Mastercycler ep *realplex*のみ：

- j) シグナル検出が遅い、最終の蛍光強度が分散し高い。あるいはバラつきが大きい
- ROX passive reference dye を用いて反応を行なってしまった。ep *realplex* のソフトはオプションで ROX 色素を使用できるが、QIAGEN はこれを推奨しない。このオプションを外すか、あるいは、ROX 色素を添加せずに QuantiFast Probe PCR +ROX Vial Kit のマスターミックスを使用することを推奨する。

— Memo —

Trademarks: QIAGEN[®], QuantiTect[®], FastLane[™], HotStarTaq[®] (QIAGEN Group);
Applied Biosystems[®] (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Bio-Rad[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Cepheid[®] (Cepheid);
Eppendorf[®] (Eppendorf AG); LightCycler[®], Roche[®] TaqMan[®], (Roche Group); Rotor-Gene[™] (Corbett Research);
Stratagene[®] (Stratagene).
© 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

