

Type-it Mutation Detect PCR プロトコールとトラブルシューティング

マルチプレックス PCR による至適化不要の変異検出
あるいは SNPs 検出前のマルチプレックス増幅

目次	ページ
準備すべき機器および試薬	2
重要事項	3
プロトコール	
変異の増幅（アガロースゲル、QIAxcel システムあるいは Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて検出する場合）	8
変異の増幅（キャピラリーあるいはゲルを利用したシークエンシング装置を用いて検出する場合）	13
トラブルシューティング	17



準備すべき機器および試薬

試薬類を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。詳細は製品メーカーの対応するMSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

- 反応用チューブ
- ピペットおよびチップ (フィルター付きチップ)
- サーマルサイクラー
- プライマー
- プライマーは、Operon® Biotechnologies (www.operon.com) のような実績のあるオリゴメーカーから入手してください。凍結乾燥したプライマーをTEバッファーに溶解して、100 μ Mのストック溶液を調製します。濃度は分光光度計でチェックしてください。プライマーのストック溶液は分注し、-20℃で保存してください。

重要事項

プライマー

Type-it Mutation Detect PCR Kitは、実績のあるオリゴメーカーから入手した一般的な品質のプライマーと共に使用します。脱塩、逆相法またはHPLCなど適切な精製法により精製したプライマーを購入し、TEバッファー（10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0）に溶解して50あるいは100 μ Mのストック溶液を調製します（4ページの表3参照）。プライマーの品質はマルチプレックスPCRを成功させるための重要なファクターの一つです。不正確なプライマー濃度や低品質なプライマーの使用がマルチプレックスPCRで問題が生じる原因となることが多々あります。

標的とする変異のマルチプレックスPCRは、場合により蛍光標識プライマーを用いて行ない、その後、高解像度のシークエンシング装置（ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer、Applied Biosystems® 3130、3130xl Genetic Analyzer、Applied Biosystems 3730あるいは3730xl DNA Analyzer）上で検出する場合があります。使用する蛍光標識が検出システムに対応しているかを必ず確認してください。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します。十分な量のPCR産物が生成されているにもかかわらず、蛍光色素の種類により、特定の検出機器でシグナル強度が異なることがあります。蛍光標識プライマーは蛍光色素の退色を防ぐため必ず遮光してください。HPLC精製したプライマーを使用することを推奨します。蛍光標識プライマーの取り扱いおよび保存に関する一般的なガイドラインは英語版Handbook 40、45ページのAppendix CおよびAppendix Dを参照してください。

- マルチプレックスPCRによる変異アッセイ用にプライマーを組み合わせる前に、全てのプライマーペアの性能を個別のPCR反応で必ずテストします。
- マルチプレックスPCRで使用する多数のプライマーの取り扱いを簡単にするため、全プライマーを等モル濃度ずつ含むプライマーミックスの調製を推奨します。
- プライマーミックスは表3（4ページ）の記載に従ってTEバッファーで調製し、凍結融解の繰り返しを避けるために少量ずつ分注し、 -20°C で保存してください。プライマーミックスを繰り返し凍結融解するとアッセイの性能が低下することがあります。

表3. 10xプライマーミックスの調製 (2 µMの各プライマーを含む) *

プライマーストック 溶液の濃度 [†]	50 µM (50 pmol/µl)	100 µM (100 pmol/µl)
各プライマーストック	20 µl	10 µl
TE バッファー	変更可	変更可
トータル容量	500 µl	500 µl

* 最高12種類のプライマーペア (50 µMストック溶液) あるいは25種類のプライマーペア (100 µMストック溶液) を含む10xプライマーミックスを調製可能。

[†] 記載の数値は蛍光標識プライマーおよび未標識のプライマーに適用可能。

解析の方法

Type-it Mutation Detect PCRで増幅したターゲットの変異は様々な検出装置で簡単に検出できます。

アガロースゲルによる検出が最も頻繁に使用されています。あるいは、増幅後にターゲットの変異をQIAxcelシステムやAgilent® 2100 Bioanalyzerなどのキャピラリー電気泳動装置を用いて最高3~5 bpの分離能の解析を行ないます。

高解像度シーケンシング装置上で変異を解析するには蛍光標識プライマーが必要で、1塩基の分離が可能です。

マルチプレックスPCR解析用のプライマーペアは注意してデザインしなければなりません。プライマーの塩基配列だけではなく、PCR産物の長さも考慮しなければなりません。検出システムの解像度に応じて、それぞれの増幅産物を明確に区別できるように各増幅産物の長さを設定します。

複数の蛍光色素を使用する場合には、PCR産物は別々の色素により識別できるので、同一反応で増幅産物の長さが同じでも解析ができます。

様々な検出システムを用いてType-it Mutation Detect PCR Kitを使用する場合の推奨条件が表4、5、6 (5、6ページ) に掲載されています。

表4. マルチプレックスPCR産物をアガロースゲル解析する際のガイドライン

PCR産物間のサイズ差	最長フラグメントサイズ	アガロース濃度
>200 bp	2,000 bp [†]	1.3%
>100～200 bp	1,000 bp [†]	1.4～1.6%
>50～100 bp	750 bp [†]	1.7～2.0%
20～50 bp	500 bp	2.5～3.0%
<20 bp*	250 bp	3.0～4.0%

* 約20 bpのサイズ差のPCR産物は標準的な分子生物学実験用アガロースを用いて通常効果的に分離可能。20 bp以下のサイズ差のフラグメントの分離には、例えばMetaPhor agarose (FMC Bioproducts) のような高解像度用アガロースの使用を推奨する。詳細情報はwww.cambrex.comを参照。

[†] サイクリングプロトコールは最高500 bpまでの増幅産物用にデザインされている。より長い増幅産物に関してはプロトコールに記載されている適切な推奨事項を参照。

表5. QIAxcelシステムを用いたマルチプレックスPCR産物の解析

QIAxcelカートリッジ	アプリケーション	フラグメントのサイズ	カートリッジの分離能
QX DNA High Resolution Cartridge [†]	高分離能 ジェノタイピング	15 bp～5 kb [§]	100～500 bpのフラグメントでは3～5 bp 500 bp～1 kbのフラグメントでは50 bp 1～5 kbのフラグメントでは200～500 bp
QX DNA Screening Cartridge	高速PCR スクリーニング	15 bp～5 kb [§]	100～500 bpのフラグメントでは20～50 bp 500 bp～1 kbのフラグメントでは50～100 bp 1～5 kbのフラグメントでは500 bp

[†] Type-it Mutation Detect PCR Kitを用いて増幅したマルチプレックスPCR産物の解析には、QX DNA High Resolution Cartridgeを推奨。

[§] サイクリングプロトコールは最高500 bpまでの増幅産物用にデザインされている。最高1.5 kbまでの長い増幅産物に関してはプロトコールに記載されている適切な推奨事項を参照。

表6. マルチプレックスPCR産物をAgilent 2100 Bioanalyzerで解析する際のガイドライン

DNA LabChip® Kit	サイジングの範囲	サイジングの解像度	サイジングの正確度
1000	25 ~ 1,000 bp	100 ~ 500 bpで5% 500 ~ 1,000 bpで10%	10%
7500	100 ~ 7,500 bp	100 ~ 1,500 bpで10%	10%

* このプロトコールは主に最長500 bpまでの増幅産物用にデザインされている。より長い増幅産物に関してはプロトコールに記載されている適切な推奨事項を参照。

キャピラリーシークエンサーによるマルチプレックスPCR産物解析のためのガイドライン

Type-it Mutation Detect PCR Kitを用いたマルチプレックスPCR産物をキャピラリーあるいはゲルによるシークエンシング装置により効果的に解析するには、次のような様々な装置が使用できます。

- ABI PRISM 310あるいは3100 Genetic Analyzer
- Applied Biosystems 3130あるいは3130xl Genetic Analyzer
- Applied Biosystems 3730あるいは3730xl DNA Analyzer
- Beckmann CEQ™ 8000およびCEQ 8800 Genetic Analysis Systems

高解像度シークエンシング装置に関する詳細は英語版 Handbook 45ページのAppendix Dを参照ください。

テンプレートDNA

スタートテンプレートとしての核酸の品質および量はPCR、特に感度および増幅効率に影響を与えます。

スタートテンプレートの品質

PCR反応では酵素反応が同時に複数回行なわれるために、一回のみの酵素反応に比べて不純物（タンパク質、フェノール/クロロホルム、塩類、エタノール、EDTA、その他の有機溶媒など）に対し、より鋭敏になります。QIAGENはPCR用の最高品質の核酸を確実に精製する様々な核酸調製システムを提供しています。これらの製品には、ヒト、植物、動物のゲノムDNAやバクテリア、ウイルス核酸の迅速な精製のためのQIAamp®およびDNeasy®システムのようなマニュアルおよび自動化用製品があります。あるいは、微量ゲノムDNAを均一に増幅し、配列によるバイアスのない全ゲノム増幅キット（例；REPLI-g® Kits）も使用できます。

QIAamp、DNeasy、REPLI-g Kit、PAXgene® Blood DNA Systemに関する詳細情報は弊社テクニカルサポートにお問い合わせになるか、ウェブサイト www.qiagen.co.jp をご覧ください。

スタートテンプレートの量

スタートテンプレートの量も複数のターゲットを同時に増幅するマルチプレックスPCRの成功のためには有用な要素の一つです。様々なDNAのテンプレート量に関する詳細情報は英語版 Handbook 43 ページ、Appendix Cをご覧ください。

適切なプロトコールの選択

このハンドブックには2種類のプロトコールが記載されています。

変異の増幅（アガロースゲル、QIAxcel システムあるいは Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて検出する場合）（8 ページ）

変異をマルチプレックスPCRで増幅し、その後アガロースゲル、QIAxcel システム、Agilent 2100 Bioanalyzerのいずれかを用いて解析する場合には、本プロトコールを使用してください。SNaPshot Technology を用いる場合のSNPs 検出前のマルチプレックス増幅にもこのプロトコールを使用することを推奨します。非蛍光標識プライマーを用いた増幅産物の中／低解像度検出に適しています。

変異の増幅（キャピラリーあるいはゲルを利用したシーケンシング装置を用いて検出する場合）（13 ページ）

変異を蛍光標識プライマーによりマルチプレックスPCR増幅し、その後キャピラリーあるいはゲルを利用したシーケンシング装置を用いて解析する場合には、本プロトコールを使用してください。このプロトコールには蛍光検出のために最適化されたサイクル数および最終エクステンションステップが掲載されています。蛍光標識プライマーを用いた増幅産物の1 bpの高解像度での検出に最適です。

プロトコール：変異の増幅（アガロースゲル、QIAxcelシステムあるいはAgilent 2100 Bioanalyzerを用いて検出する場合）

実験を始める前の重要事項

- **SNaPshot Technology** を用いる場合の **SNPs** 検出前のマルチプレックス増幅にもこのプロトコールを使用することを推奨します。
- 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。
- 変異の検出に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。
- 全てのプライマーは同一濃度にします (**0.2 μM**)。
- 最適な結果を得るためには、 T_m が68℃以上のプライマーペアの使用を推奨します。マルチプレックスPCRプライマーのデザインに関しては英語版 Handbook 38ページ、Appendix Bをご覧ください。
- **4ページの表3**の記載に従って**10x**プライマーミックスを調製します。
- Q-Solution™を使用する場合は、英語版 Handbook 38ページ、Appendix Aに従ってください。初めての実験ではQ-Solutionを使わずに行なってください。
- オプション：CoralLoad® Dyeを使用すると、PCRセットアップ中に溶液が見やすくなり、電気泳動による検出の際にDNAの移動距離が簡単にフォローできます。CoralLoad Dyeはキャピラリーシークエンサーには使用できないので注意してください。
- PCRは最初に**95℃、5分**の活性化ステップでHotStarTaq® Plus DNA Polymeraseを活性化します（このプロトコールのステップ6を参照）。

操作手順

1. **2x Type-it 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**、**CoralLoad Dye** (オプション)、**Q-Solution** (オプション)、および**プライマーミックス**を解凍する。使用前に各溶液を完全に混合する。塩濃度が均一になるように使用前に各溶液を完全に混和することが重要です。

2. 表7に従って反応ミックスを調製する。Q-Solutionを使用する場合には、表8に従って調製する。

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に必要な全ての成分が含まれています。実施する全反応数に必要な反応ミックス量の10%増しで反応ミックスを調製します。反応容量が25 µl以下の場合、表7および8に記載されているように、Type-it 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。

注：2x Type-it 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7. Q-Solutionなしで2x Type-it Multiplex PCR Master Mixを用いる場合の反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
反応ミックス		
2x Type-it Multiplex PCR Master Mix*	12.5 µl	1x
10x プライマーミックス、各プライマーは2 µM（表3参照）	2.5 µl	0.2 µM [†]
オプション： CoralLoad Dye、10x [‡]	2.5 µl	1x CoralLoad Dye
RNase フリー水	変更可	–
テンプレートDNA		
テンプレートDNA、ステップ4で添加	変更可	≤ 300 ng DNA ; 100 ng のDNA で開始
トータル容量	25 µl[‡]	

* MgCl₂の最終濃度は3 mM。

[†] 0.2 µM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。しかしその他のプライマー濃度（例：0.1 ~ 0.3 µM）でも増幅が改善されることがある。

[‡] 25 µl以下の容量では、2x Type-it 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量の比が1 : 1になるようにする。

[§] 検出にキャピラリーシークエンサーを使用する場合には、CoralLoadを決して用いない。

表 8. Q-Solution と共に 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix を用いる場合の反応成分

成分	容量/反応	最終濃度
反応ミックス		
2x Type-it Multiplex PCR Master Mix*	12.5 µl	1x
10x プライマーミックス、 各プライマーは 2 µM (表 3 参照)	2.5 µl	0.2 µM†
オプション: CoralLoad Dye、10x‡	2.5 µl	1x CoralLoad Dye
Q-Solution, 5x	2.5 µl	0.5x Q-Solution
RNase フリー水	変更可	-
テンプレート DNA		
テンプレート DNA、 ステップ 4 で添加	変更可	≤ 300 ng DNA ; 100 ng の DNA で開始
トータル容量	25 µl‡	

* MgCl₂ の最終濃度は 3 mM。

† 0.2 µM 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。しかしその他のプライマー濃度 (例; 0.1 ~ 0.3 µM) でも増幅が改善されることがある。

‡ 25 µl 以下の容量では、2x Type-it 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量の比が 1 : 1 になるようにする。

§ 検出にキャピラリーシークエンサーを使用する場合には、CoralLoad を決して用いない。

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

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 (反応あたり 300 ng 以下) を添加する。実際の量に関しては 12 ページの表 10 を参照する。

5. メーカーの指示に従ってサーマルサイクラーにプログラムを入力する。

6. PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、11 ページの表 9 に従って入力したプログラムをスタートする。

各 PCR プログラムは、95 °C、5 分間の初期活性化ステップにより HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化し、開始します。

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9. 2x Type-it Multiplex PCR Master Mixを用いた至適化済みの変異検出用PCRサイクリングプロトコール (Q-Solutionを使用/不使用に共通)

			コメント
酵素活性化ステップ	5分	95℃	HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこの加熱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：	30秒	95℃	
アニーリング：	90秒	60℃	殆どのPCRシステムでアニーリング温度は60℃が適している。一番低いプライマーの T_m^* が60℃以下の場合には、アニーリング温度を57℃から始める。
エクステンション：	30秒	72℃	0.5 kbまでのターゲットに最適。0.5 kb以上のターゲットではエクステンション時間を0.5 kbあたり30秒ずつ増加する。
サイクル数：	35		殆どの場合、35サイクルで良好な結果が得られる。サイクル数はテンプレートDNA量と、各検出法の感度に応じて変更する（その他の情報は12ページの表10を参照）。
最終エクステンション：	10分	68℃	

* 以下の計算式により決定した： $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{number of [A+T]}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{number of [G+C]})$

表 10. 推奨するテンプレート量とサイクル数

スタートテンプレート量 (PCR反応あたりのDNA量 ng) *	サイクル数
100～300	30～35
10～100	35～40
0.1～10	40～45

* 概算値；換算率は英語版 Handbook 44 ページ、Appendix C、Table 17 を参照。

7. サンプルをアガロースゲル、QIAxcel システム、Agilent 2100 Bioanalyzer のいずれかで解析する（それぞれのガイドラインに関しては 5、6 ページの表 4、5、6 を参照）。

各検出で十分なシグナルを得るために最適な PCR 産物のロード量を個々に決めてください。

プロトコール：変異の増幅（キャピラリーあるいはゲルを利用したシーケンシング装置を用いて検出する場合）

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。
- 変異の検出に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。
- 全てのプライマーは同一濃度にしませ (0.2 μ M)。
- 最適な結果を得るためには、 T_m が68℃以上のプライマーペアの使用を推奨します。マルチプレックスPCRプライマーのデザインに関しては英語版 Handbook 38ページ、Appendix Bをご覧ください。
- 4ページの表3に従って10xプライマーミックスを調製します。
- Q-Solutionを使用する場合は、英語版 Handbook 38ページ、Appendix Aに従ってください。初めての試験ではQ-Solutionを使わずに行なってください。
- 引き続きキャピラリーあるいはゲルを利用したシーケンシング装置を用いて検出する場合には、CoralLoad Dyeが検出法を妨害することがあるため使用しないでください。
- PCRは最初に95℃、5分の活性化ステップでHotStarTaq Plus DNA Polymeraseを活性化し、開始します（このプロトコールのステップ6を参照）。

操作手順

1. 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix (-20℃で保存している場合)、テンプレートDNA、蒸留水、Q-Solution（オプション）、およびプライマーミックスを解凍する。使用前に各溶液を完全に混合する。

塩濃度が均一になるように使用前に各溶液を完全に混和することが重要です。

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に必要な全ての成分が含まれています。実施する全反応数に必要な反応ミックス量の10%増しで反応ミックスを調製します。反応容量が25 μ l以下の場合、表11に記載されているように、Type-it 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。

注：2x Type-it 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 11. 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix を用いる場合の反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
反応ミックス		
2x Type-it Multiplex PCR Master Mix*	12.5 µl	1x
10x プライマーミックス、 各プライマーは 2 µM (表 3 参照)	2.5 µl	0.2 µM†
オプション：Q-Solution、5x 注：キャピラリーシークエンサー で PCR 産物を解析する場合には CoralLoad Dye は使用しない	2.5 µl	0.5x
RNase フリー水	変更可	–
テンプレート DNA		
テンプレート DNA、 ステップ 4 で添加	変更可	≤ 200 ng DNA ; 100 ng の DNA で開始
トータル容量	25 µl‡	

* MgCl₂ の最終濃度は 3 mM。

† 0.2 µM 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。しかしその他のプライマー濃度 (例； 0.1 ~ 0.3 µM) でも増幅が改善されることがある。

‡ 25 µl 以下の容量では、2x Type-it 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。

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

例えば反応ミックスを数回、上下にピペッティングして、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 (反応あたり 200 ng 以下) を添加する。実際の量に関しては 16 ページの表 13 を参照する。

5. メーカーの指示に従ってサーマルサイクラーにプログラムを入力する。

6. PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし 15 ページの表 12 に従って入力したプログラムをスタートする。

各 PCR プログラムは、まず 95 °C、5 分間の初期活性化ステップを行なうことにより HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化します。

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 12. 変異のマルチプレックスPCR増幅用に至適化済みのサイクリングプロトコール

			コメント
酵素活性化ステップ	5分	95℃	HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこの加熱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：	30秒	95℃	
アニーリング：	90秒	60℃	殆どのPCRシステムでアニーリング温度は60℃が適している。一番低いプライマーの T_m^* が60℃以下の場合には、アニーリング温度を57℃から始める。
エクステンション [†] ：	30秒	72℃	0.5 kbまでのターゲットに最適。0.5 kb以上のターゲットではエクステンション時間を0.5 kbあたり30秒ずつ増加する。
サイクル数：	28		殆どの場合、28サイクルで良好な結果が得られる。サイクル数はテンプレートDNA量と、各検出法の感度に応じて変更する（その他の情報は16ページの表13を参照）。
最終エクステンション：	30分	60℃	

* 以下の計算式により決定した： $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{number of [A+T]}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{number of [G+C]})$

[†] 0.5 kb以上のターゲットではエクステンション時間を0.5 kbあたり30秒増加する。

表 13. 推奨するテンプレート量とサイクル数

スタートテンプレート量 (PCR 反応あたりの DNA 量 ng) *	サイクル数
50 ~ 200	20 ~ 24
10 ~ 50	24 ~ 28
0.1 ~ 10	28 ~ 32

* 概算値；換算率は英語版 Handbook 44 ページ、Appendix C、Table 17 を参照。

7. PCR 増幅したサンプルの希釈溶液を調製し、高分離能なキャピラリー・シーケンシング装置上でサンプルを解析する（詳細は 6 ページおよび英語版 Handbook 45 ページの Appendix D を参照）。

各検出法で十分なシグナルを得るために最適な PCR 産物のロード量を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

PCR産物が少ないあるいは皆無である

- a) HotStarTaq Plus DNA Polymeraseが活性化されていない
サイクリングプログラムにプロトコールのステップ6に記述されているHotStarTaq Plus DNA Polymerase活性化ステップ（95℃、5分間）が含まれていることを確認する（10、14ページ）。
- b) ピペティングエラー、あるいは試薬の入れ忘れ
PCRを再度行なう。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正でない
各プライマー濃度は0.2 μMで使用。多数のターゲットの同時増幅反応では、0.1 μMのプライマー濃度および3分のエクステンション時間で結果が改善されることがある。アガロースゲルあるいはQIAxcelによる検出を行なうマルチプレックスPCRの場合、0.3～0.4 μM以上のプライマー濃度はマルチプレックスPCRの正確性に影響を及ぼすことがあるため、推奨しない。シークエンサーを利用したフラグメント解析を行なうマルチプレックスPCRでは、プライマーにより弱いシグナルを生じる場合のみ、1～2 μMのプライマー濃度と3分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。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4ページの表3を参照。
- d) サイクル数が少ない
PCRサイクル数を増やす。表10（12ページ）および表13（16ページ）をガイドラインとして参考にする。
- 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使用したかチェックする（11ページの表9および15ページの表12を参照）。アニーリング時間は90秒を使用したかを確認する。可能な場合、グラジエントPCRを用いて最適なアニーリング温度を決める（英語版Handbook 47ページ、Appendix Fを参照）。

コメント

- 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性と特異性をチェックする。十分品質の高いプライマーを必ず使用する。キャピラリーシークエンシング装置での検出では必ず蛍光標識プライマーを使用する。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。必要に応じて、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希釈調製し、少量に分注して-20℃で保存する。プライマーミックスの凍結・融解を繰り返さない。
- g) アニール温度が高すぎる 英語版 Handbook 38 ページ、Appendix B に記載されている推奨事項に従い、使用のプライマーに最適なアニール温度を決定する。アニール温度を3℃ずつ下げる。アニール時間は90秒を使用したかを確認する。可能な場合、グラジエントPCRを用いて最適なアニール温度を決める（英語版 Handbook 47 ページ、Appendix F を参照）。
- 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 同じサイクリング条件で、0.5 x Q-Solution を用いてマルチプレックスPCRをやり直す。英語版 Handbook 36 ページ、Appendix A を参照。これらの条件では増幅不可能な非常に高いGC含量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) プライマーデザインが適切ではない プライマーをデザインし直す。マルチプレックスPCRのプライマーデザインに関する一般的なガイドラインは英語版 Handbook 38 ページ、Appendix B を参照する。
- j) スタートテンプレート量が不十分 ゲルを利用する検出では反応液 25 µlあたり最高300 ngまで、シークエンサーを利用する検出では反応液 25 µlあたり最高200 ngまでスタートテンプレート量を増加する。
- k) スタートテンプレートの品質が低い DNeasy Kitなどで精製した高品質なDNAのみを使用する。

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

コメント

- l) 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、品質をチェックする（英語版 Handbook 40 ページ、Appendix C 参照）。ストック溶液からテンプレート核酸の連続希釈溶液を調製する。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 0.5 kb までのターゲットの増幅が可能。0.5 kb ごとにエクステンション時間を 30 秒間ずつ延長する。
- n) 感度が十分に高くない
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 の感度はさらに増大する。
- o) サーマルサイクラーの問題
サーマルサイクラーのスイッチがオンになっているか、正しくプログラムされていたかチェックする。
- p) 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
最終エクステンションステップが記載通りに行なわれたか確認する（11 ページの表 9 および 15 ページの表 12）。シークエンサーを使用する解析には、最終エクステンションステップは必ず 60 °C で 30 分間行なう。必要に応じて 45 分まで延長する。アガロースゲル、QIAxcel システム、Agilent 2100 Bioanalyzer のいずれかで 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 °C で 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。

全ての増幅産物が検出されない、あるいはいくつかの増幅産物がかるうじて検出できる

- 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性と特異性をチェックする。十分品質の高いプライマーを必ず使用する。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。必要に応じて、プライマーストック溶液のプライマーミックスを新たに希釈調製し、少量に分注して -20 °C で保存する。プライマーミックスの凍結・融解を繰り返さない。

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当する MSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

コメント

- b) プライマー濃度が最適でない
0.2 μM のプライマー濃度を用いる。シークエンサーを利用し検出を行なう。多数のターゲット（10種類以上）の同時増幅では、プライマーにより弱いシグナルを生じる場合のみ、1～2 μM のプライマー濃度と3分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。QIAxcelあるいはアガロースゲルでPCR産物を検出する場合には、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（英語版 Handbook 40 ページ、Appendix C 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使用したかチェックする（11 ページの表 9 および 15 ページの表 12 を参照）。アニーリング時間は 90 秒を使用したかを確認する。可能な場合、グラジエント PCR を用いて最適なアニーリング温度を決める（英語版 Handbook 47 ページ、Appendix F を参照）。
- 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
最終エクステンションステップが記載通りに行なわれたか確認する（11 ページの表 9 および 15 ページの表 12）。シークエンサーを使用する解析には、最終エクステンションステップは必ず 60 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間行なう。必要に応じて 45 分まで延長する。アガロースゲル、QIAxcel システム、Agilent 2100 Bioanalyzer のいずれかで 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 $^{\circ}\text{C}$ で 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。
- e) アニーリング温度が高すぎる
正しいサイクリング条件を使用したかチェックする（11 ページの表 9 および 15 ページの表 12 を参照）。アニーリング時間は 90 秒を使用したかを確認する。可能な場合、グラジエント PCR を用いて最適なアニーリング温度を決める（英語版 Handbook 47 ページ、Appendix F を参照）。

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
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。これらの条件では増幅不可能な非常に高いGC含量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) 検出に感度が不十分
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産物以外の増幅副産物を検出

- a) PCRサイクリング条件が最適ではない
正しいサイクリング条件を使用したかチェックする(11ページの表9および15ページの表12を参照)。アニーリング時間は90秒を使用したかを確認する。可能な場合、グラジエントPCRを用いて最適なアニーリング温度を決める(英語版Handbook 47ページ、Appendix Fを参照)。
- 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。ゲルを使用する検出ではサイクル数を3サイクルずつ、シークエンサーを使用する検出では1~2サイクルずつ増やし、最適なサイクル数を決定する。
- c) アニーリング温度が低すぎる
英語Handbook 38ページ、Appendix Bに記載されている推奨事項に従って、使用のプライマーの最適なアニーリング温度を決定する。アニーリング温度を2℃ずつ上げる。アニーリング時間は90秒を使用したかを確認する。可能な場合、グラジエントPCRを用いて最適なアニーリング温度を決める(英語版Handbook 47ページ、Appendix Fを参照)。
- d) Mg^{2+} 濃度が最適でない
Type-it 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。 Mg^{2+} 濃度を増加すると産物収量が増加することが稀にある。 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。

コメント

- e) プライマー濃度が最適でない
0.2 μM のプライマー濃度を用いる。シークエンサーを利用し検出を行なう多数のターゲット（10種類以上）の同時増幅では、プライマーにより弱いシグナルを生じる場合のみ、1~2 μM のプライマー濃度と3分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。QIAxcelあるいはアガロースゲルでPCR産物を検出する場合には、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（英語版 Handbook 40 ページ、Appendix C 参照）。
- f) プライマーデザインが最適でない
プライマーデザインを再度調べる。マルチプレックスPCRのプライマーデザインに関する一般的なガイドラインは英語版 Handbook 38 ページ、Appendix B を参照する。
- g) いくつかのプライマーが種類のPCR産物だけでなく副産物を生成する
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い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 47 ページ、Appendix F 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性能と特異性をチェックする。使用したプライマーが十分に高品質であったことを確認する。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。必要に応じ、プライマーストック溶液のプライマーミックスを新たに希釈調製し、少量に分注して-20℃で保存する。プライマーミックスの凍結・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스에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のプライマーデザインに関する一般的なガイドラインは英語版 Handbook 38 ページ、Appendix B を参照する。

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS（material safety data sheet）をご覧ください。

コメント

- j) 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
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。これらの条件では増幅不可能な非常に高いGC含量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。

未変性条件下でマルチプレックスPCR産物の検出を行なう場合（例；アガロースゲル、あるいはネイティブ・ポリアクリルアミドゲル）*

あるPCR産物と共にスメア、あるいは非特異的な増幅副産物が検出される

- 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) スタートサンプル量が多すぎる
スタートDNAテンプレートの濃度をチェックする（英語版Handbook 43ページ、Appendix C、Table 16を参照）。少量のDNA（例えば25 µl反応液あたり300 ng未満）でマルチプレックスPCRをやり直す。
- 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
最終エクステンションステップが記載通りに行なわれたか確認する（11ページの表9および15ページの表12）。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。
- d) GC含量が低い、あるいはPCR産物が長いために未変性状態への移行が不完全
最終エクステンションステップは68℃、15分間にする。10種類以上のPCR産物、あるいは1.5 kb以上のPCR産物でのマルチプレックスシステムではこの条件を推奨する。
- 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。泳動バッファーを熱しすぎないように、電圧を下げる。

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS（material safety data sheet）をご覧ください。

コメント

キャピラリーあるいはゲルを使用するシーケンサー上で解析する際のPCR条件の至適化

特定の産物だけでなく他のPCR副産物が検出される

- a) ロードしたサンプル量が多すぎる
多量のPCR産物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低く判定できるピークの高さが得られるレベルまでサイクル数あるいは／およびPCR反応のテンプレート量を減らす（例；通常のピークの高さはABI™ 3730や3730xl DNA Analyzer上では相対的ユニットが10,000未満）。
- b) ピークが弱い（“stutter peaks”）
いくつかのDNA配列の増幅の際、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検出されることがある。この影響を削減するためにはサイクル数を減らすことを推奨する。弱いピークの長さが1塩基分短い場合には以下の“n-1産物が検出される”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5分間変性する。水より脱イオンホルムアミドを使用するべきである。
- d) n-1産物が検出される
最終エクステンションステップが記載通りに行なわれたか確認する（11ページの表9および15ページの表12）。結果を改善するために、最終エクステンションステップを45分まで延長可能である。最終エクステンションステップが正確に行なわれた場合には、サイクル数および／あるいはテンプレート量を減らす。
- e) シグナル強度が変動
同等のPCR産物を添加したにもかかわらず、特定の検出機器上では異なる蛍光色素の種類によりシグナル強度が変動することがある。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

マルチプレックス実験でいくつかの増幅産物が検出されない

- a) ロードしたPCR産物が少なすぎる 少量のPCR産物をロードした場合、シークエンサーでの解析後にいくつかのピークが検出されないことがある。全てのPCR産物が機器メーカーが記載したシグナル範囲に入るまで1~2サイクルずつサイクル数を増加する。
- b) 種々のターゲットが不均一に増幅 シークエンシング装置上でフラグメントを解析した際に得られた弱いシグナルピークは、サイクル数の増加およびPCRでのテンプレート量を減らすことにより改善される。90秒の代わりに3分のアニーリング時間により、複数のフラグメント解析で最も高いピークに対して弱いシグナルを増大できる。いくつかのピークのシグナルがまだ低すぎる場合には、弱いシグナルのプライマーペアだけのプライマー濃度を増加する。10種類までの増幅産物では1 μM 、10種類以上の増幅残物では2 μM までの増加を推奨する。
- ある種のプライマーペアは他のペアより弱いシグナルになる。英語版 Handbook 38 ページ、Appendix B に記載のガイドラインに従ってプライマーをデザインしたかをチェックする。そうでない場合には、プライマーをデザインしなおす。あるいは弱いピークのプライマーペアによる増幅を改善するために Q-Solution を使用してみる。

弱いピークあるいはアレレルピークがない

- a) キャピラリー電気泳動に問題がある（分子量マーカーにも影響） サンプルをもう一度注入してみる。シリンジのO-リングをチェックし、サンプルが漏れていないことをチェックする。蛍光検出機器が正しく機能していることをチェックする。
- b) ホルムアミドが低品質 キャピラリーシークエンシング装置でのサンプル解析用に高品質なホルムアミドを使用する。ホルムアミドの導電率は100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下でなければならない。

コメント

幅広いピーク；解析の終わりになるに従いピークが小さくなっていく

サンプルが完全に
変性されていない

シーケンシング装置にサンプルを注入する前に
サンプル希釈には脱イオンホルムアミドを使用する。
サンプルは水よりホルムアミド中でより安定である。
ロード前に 95 °C で 5 分間の変性ステップを行なう。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, CoralLoad®, DNeasy®, HotStarTaq®, REPLI-g®, Q-Solution™ (QIAGEN Group); ABI™, ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); CEQ™ (Beckman Coulter, Inc.); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); LabChip® (Caliper Life Sciences, Inc.); Operon® (Operon Biotechnologies).

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。

© 2008 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

