



Rotor-Gene™ Q

優れた温度均一性を
実現する
リアルタイム PCR 装置





Rotor-Gene Q — 最先端の研究を高精度にサポート

リアルタイム定量 PCR は、装置、試薬、ソフトウェアの全てにおいて、高い安定性および再現性が求められる技術です。高精度で迅速な定量解析を行なうためには、厳密なサンプル間の温度および光学的な均一性と高速な加熱・冷却機能が重要です。また、試薬キットに含まれる DNA ポリメラーゼやその他の反応組成の性能も、反応の感度、スピードおよび特異性を実現する上で非常に重要です。

QIAGEN のリアルタイム PCR 装置 “Rotor-Gene Q” は、高い感度と再現性を実現するために数多くの工夫がなされており、最高のパフォーマンスと研究ニーズにマッチした最適な結果を実現します。また、至適化済みの QIAGEN® キットと組み合わせることにより、Rotor-Gene Q は様々なアプリケーションに効率よく対応することができます。



Rotor-Gene Q の特長：

- 最高のサンプル間温度均一性を誇るリアルタイム PCR 装置
- 補正が不要な蛍光検出システムで、高感度かつ高い再現性を実現
- High Resolution Melt 解析で SNP / 変異やメチル化の解析も可能に
- 熱源および光源の定期的な交換が不要
- QIAGEN キットおよびアッセイで信頼できる結果を実現

幅広いアプリケーションに対応

Rotor-Gene Q と至適化済みの QIAGEN キットの組み合わせは、全てのリアルタイム PCR および HRM (High Resolution Melt) アプリケーションに使用できます：

- 遺伝子発現解析
- 病原体検出
- DNA メチル化解析
- ジェノタイピング
- 遺伝子スキャニング
- miRNA 研究

詳細は 8 ～ 12 ページをご覧ください。

遠心エアコントロール方式による卓越した性能

遠心エアコントロール方式を採用した Rotor-Gene Q は、市販されているこれまでのリアルタイム PCR 装置の中で、最も精密性と機能性に富んでいます (図 1、2)。遠心エアコントロール方式では、サンプルローターが常に遠心されていることにより、反応サンプル間の温度均一性を高く保持します ($\pm 0.02^{\circ}\text{C}$)。また、蛍光検出においても、すべてのサンプルチューブが光源と検出器間の一定の光路上を通過し、サンプル間で光路長の差がないため、解析のために補正を行なう必要はありません。このような、遠心エアコントロール方式では、従来のブロック型装置で問題とされたサンプル間のばらつきやエッジ効果を排除することができます。

遠心エアコントロール方式の特長：

- ウェル間の温度均一性が $\pm 0.02^{\circ}\text{C}$ 以下 (ブロック型装置の 1/20 以下)
- 均一な検出により、ROX のようなレファレンス色素が不要
- 高速な加熱・冷却機構によるランニング時間の短縮
- 高い感度と再現性

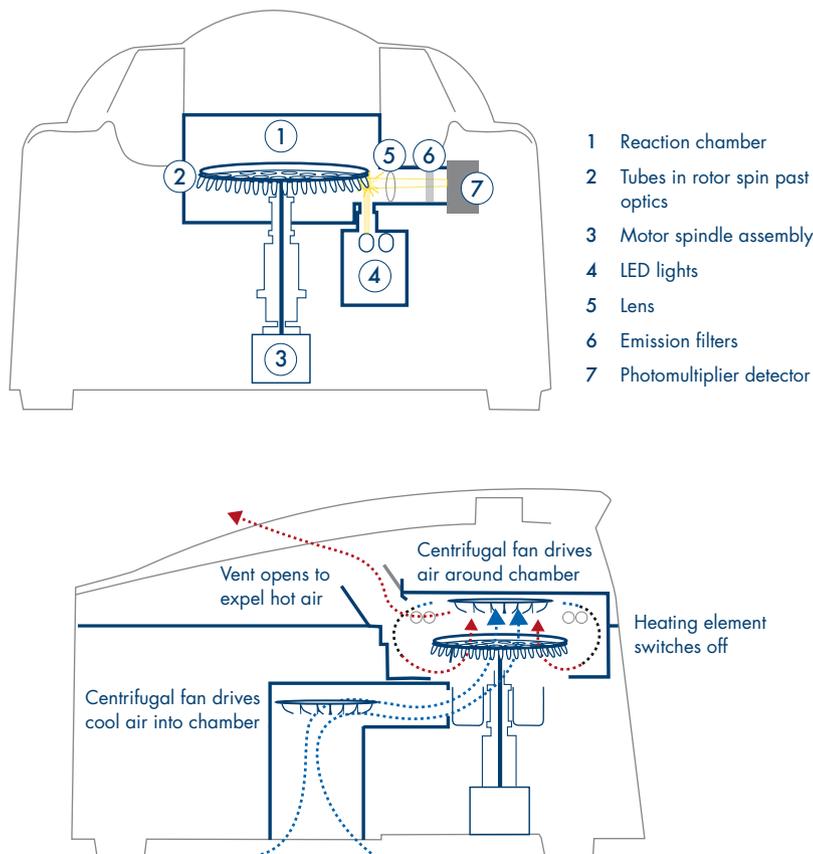


図 1. Rotor-Gene Q の断面図

エアチャンバーを冷却するには、加熱エレメントは一時的に電源が切れ、遠心ファンによって装置底面からリアクションチャンバー内に冷却用の空気を送り込む。装置後部にある排気口が開き、温かい空気を排気する。これにより迅速にリアクションチャンバーを冷却することを実現。

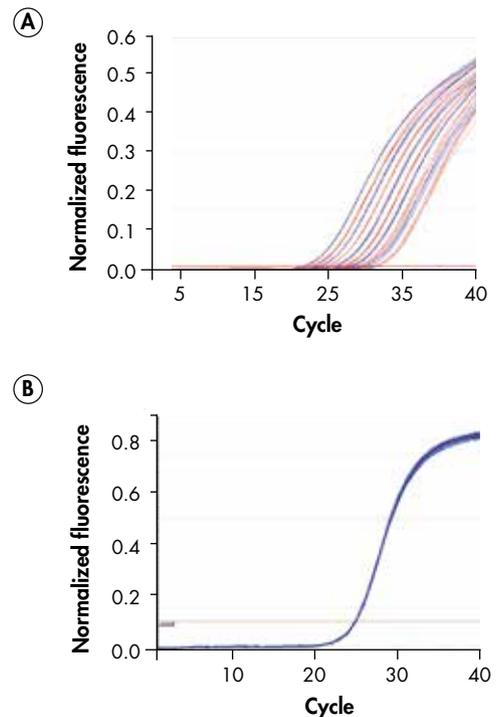


図 2. 精度と再現性の高いリアルタイム PCR 解析

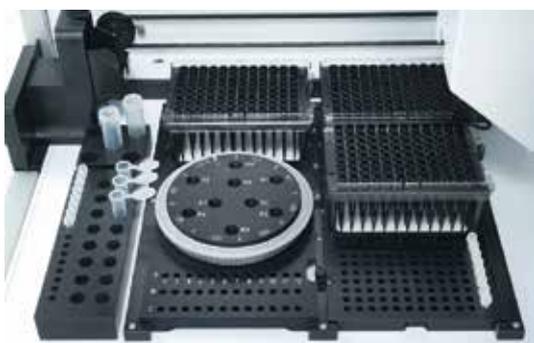
① ヒトゲノム DNA の 2 倍段階希釈液 (30 ng ~ 0.060 ng ; 10,000 コピー ~ 20 コピー) をテンプレートとしてリアルタイム PCR を行なった。IL1R2 用にデザインした TaqMan[®] アッセイ、Rotor-Gene Probe PCR Kit、Rotor-Gene Q を用いて各希釈系列で 5 replicate 反応を行なった。全希釈液間の C_T 値における平均サイクル差は 1.07 サイクルであった。② BCL2 用にデザインした TaqMan アッセイ、Rotor-Gene Probe PCR Kit、Rotor-Gene Q を用いて、ROX 補正なしにヒトゲノム DNA のリアルタイム PCR を 72 replicate で行なった。平均 C_T 値は 24.94 で、標準偏差は 0.05、CV 値は 0.2% であった。



Rotor-Gene Q と 72-Well Rotor



Rotor-Gene Q に対応するチューブフォーマット



QIAgility を用いた PCR セットアップの自動化

広い光源領域で様々なアプリケーションを実現

Rotor-Gene Q は、SYBR[®] Green のようなインターカラー色素や TaqMan プローブ、FRET プローブなど、幅広い蛍光波長の検出に最適です。搭載波長は、UV から赤外波長まで、最高 6 チャンネルを搭載しています (表 1)。さらに、ソフトウェア上での簡単な設定により、それぞれの励起光源/検出フィルタの組み合わせをカスタムで作製できるので、特殊な波長の色素にも Rotor-Gene Q は対応可能です。

表 1. 蛍光検出用チャンネル

チャンネル	励起波長 (nm)	検出波長 (nm)	検出可能な蛍光色素の例
Blue	365 ± 20	460 ± 20	Marina Blue [®] , Edans, Bothell Blue, Alexa Fluor [®] 350
Green	470 ± 10	510 ± 5	FAM [™] , SYBR Green I, Fluorescein, EvaGreen, Alexa Fluor 488
Yellow	530 ± 5	557 ± 5	JOE [™] , VIC [®] , HEX, TET, CAL Fluor [™] Gold 540, Yakima Yellow
Orange	585 ± 5	610 ± 5	ROX [™] , CAL Fluor Red 610, Cy [®] 3.5, Texas Red, Alexa Fluor 568
Red	625 ± 5	660 ± 10	Cy5, Quasar [™] 670, LightCycler [®] Red640, Alexa Fluor 633
Crimson	680 ± 5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
HRM	460 ± 20	510 ± 5	SYBR Green I, SYTO9, LC Green, LC Green Plus+, EvaGreen

スループットに応じて変更できる多様なフォーマット

Rotor-Gene Q は多様なニーズに対応するため、様々な PCR チューブ・フォーマットを使用できます。チューブを搭載するローターを取り替えるだけでフォーマットをわずか数秒で変更できます。

よりスループットの高い実験系には、Rotor-Disc[™] が使用できます。Rotor-Disc は、円周上にサンプルウェルが配置された円形プレートです。Rotor-Disc には、一周で 72 サンプルの反応を実施することができる Rotor-Disc 72 と 100 反応を実施することができる Rotor-Disc 100 があります。Rotor-Disc は、Rotor-Disc Heat Sealer を用いてプラスチックフィルムで簡単かつ迅速にシールできます。

また、PCR 反応溶液の調製を全自動で行なう QIAgility を使用すれば、Rotor-Gene Q 用のすべてのチューブフォーマットへの迅速かつ確実な分注が可能になります。QIAgility を用いた PCR セットアップの自動化に関しては www.qiagen.com/goto/QIAgility をご覧ください。

HRM 解析による PCR 産物の識別

PCR 産物は、その塩基組成 (GC 含量)、配列、長さなどに依存した産物特有の解離温度 (T_m 値) を有します。インターカレーターを用いた PCR の後に行なわれる融解曲線解析では、この産物特有の T_m 値の違いを利用して、プライマーダイマーや非特異的副産物の有無の確認が可能です。High Resolution Melt (HRM) 解析とは、この融解曲線解析を極めて精度の高い温度分解能を利用して、わずかな T_m 値の“ずれ”でさえも検出することができる技術です。Rotor-Gene Q の温度分解能は $\pm 0.02^\circ\text{C}$ であるため、PCR 産物中に一塩基の違いがあっても、高感度に検出することができます。Rotor-Gene Q の遠心エアコントロール方式による卓越した温度均一性と光学的均一性は HRM に最適です。

Rotor-Gene Q の HRM 機能の特長：

- 専用の HRM 励起チャンネルを搭載
- $\pm 0.02^\circ\text{C}$ の超高温分解能による厳密な識別
- 遠心方式による高速データ収集
- 自動ジェノタイピング機能を搭載したソフトウェア

Rotor-Gene Q は、最も困難とされている class IV SNP (AT 置換) の HRM による判別が可能な唯一のリアルタイム PCR 装置です。HRM は次のようなアプリケーションに最適です：

- ジェノタイピング (図 3)
- メチル化定量解析 (図 4)
- 遺伝子スクランニング
- 多型配列解析

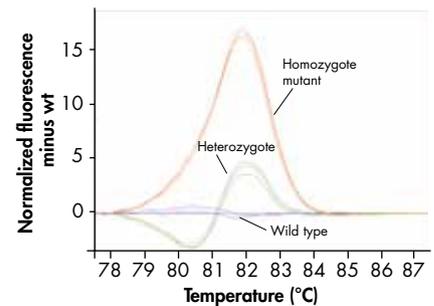
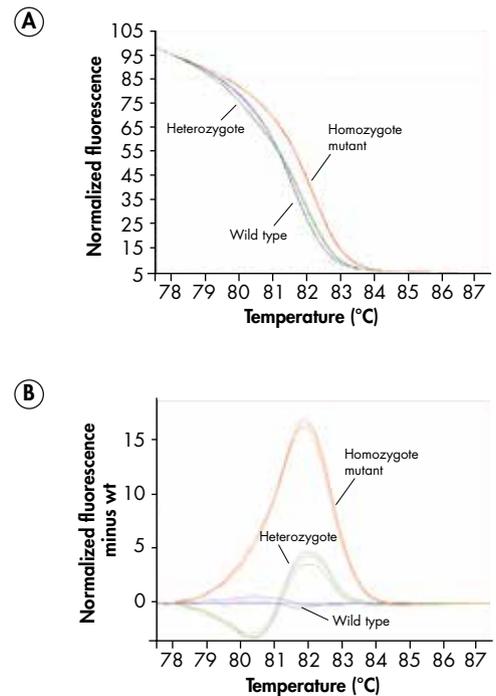
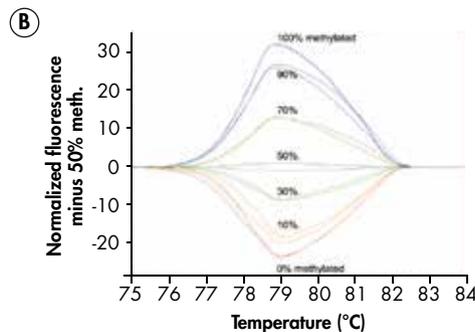
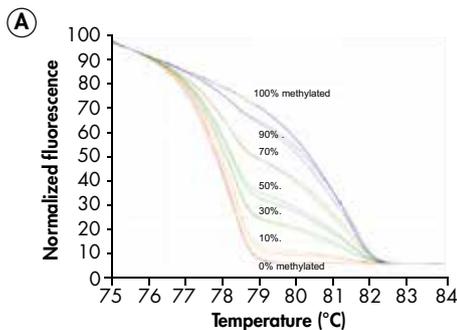
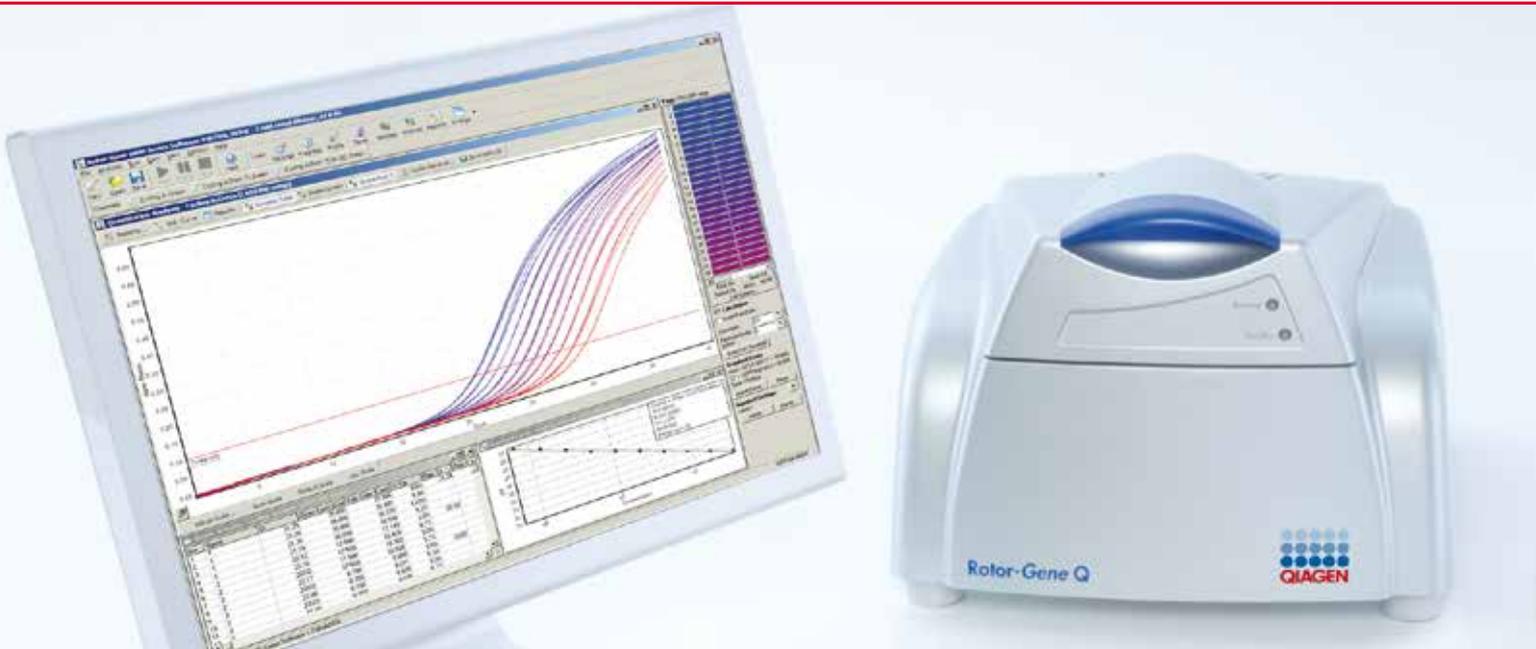


図 3. HRM による正確な SNP ジェノタイピング

ヒト PPP1R14B 遺伝子 (protein phosphatase 1, regulatory [inhibitor] subunit 14B) の SNP rs60031276 (A が G に置換) を異なる遺伝子型のゲノム DNA 10 ng と Type-it™ HRM PCR Kit を用いて Rotor-Gene Q で解析した。ホモ接合体野生型 (AA、青線)、ホモ接合体変異型 (GG、赤線)、ヘテロ接合体 (AG、緑線) サンプルを (A) HRM 解析融解曲線、(B) 野生型 (wt) に対して標準化した difference plot。

図 4. HRM によるメチル化解析

様々な割合のメチル化と非メチル化 DNA-APC (adenomatous polyposis coli) アンプリコンを EpiTect® HRM PCR Kit を用いて Rotor-Gene Q により HRM 解析を実施した。(A) HRM 解析融解曲線、および (B) 50%メチル化サンプルに対して標準化した difference plot。



使いやすいソフトウェアで多様な解析をサポート

Rotor-Gene Q のソフトウェアは、基本的な解析ツールから高度な解析アルゴリズムまで、現在使用されているリアルタイム PCR の解析法を幅広くサポートします (表 2)。新しくランニングを始めるときには、使用する試薬ごとにあらかじめプロトコルを設定しておくことで、簡単にランニングをスタートすることができます。また、ソフトウェアには、解析した結果を他のソフトウェアへエクスポートする機能が充実しています。

表 2. Rotor-Gene Q ソフトウェアによりサポートされている解析法

標準曲線法による定量
2つの標準曲線による相対定量
$\Delta\Delta C_T$ 相対定量
比較定量
Export to Relative Expression Software Tool (REST)
Export to LinRegPCR (assumption-free analysis)
Melt 解析
HRM 解析
エンドポイント解析
対立遺伝子の判別
Scatter Plot 解析
濃度解析

使いやすいソフトウェア：

- ソフトウェアのみでの動作が可能 (Virtual mode での起動)
- 多数の解析法に対応
- 多様なデータエクスポート機能
- ランニングレポートの自動作成
- ユーザーライセンスに制限なし

最小限のメンテナンスで最大の簡便さ

Rotor-Gene Q は、日常のメンテナンスが必要なく、使いやすい設計になっています。そのため、装置本体のメンテナンスにかかる時間を低減し、研究に集中することが可能です。

Rotor-Gene Q の特長：

- 稼動部分が少なく壊れにくい
- 光学的なアライメントやキャリブレーションが不要
- 非常に高寿命な LED の採用によりランプやレーザーの交換が不要
- ブロック型のような清掃が不要
- 小さくて軽い装置なので使いやすく、ラボのどこにでも設置可能

装置の定期的なバリデーションも実施可能

検査機関や診断を目的とした研究施設では、使用しているサーマルサイクラーの温度精度のバリデーションを定期的実施することを求められる場合があります。殆どのサイクラーではこのためにサービスエンジニアに依頼しなければなりません、Rotor-Gene Q ではその必要はありません。Rotor-Gene Q では、温度精度の自動キャリブレーションを行なう専用ローター “Rotor-Disc OTV (Optical Temperature Verification) Kit” をセットしてランニングするだけで、自動的に装置の温度キャリブレーションを実施することができます。本キットには、温度感受性の液晶で充填済みの特殊な Rotor-Disc と専用の解析ソフトが入っています。

Rotor-Gene Q の仕様

Rotor-Gene Q の卓越した性能を、他のリアルタイム PCR 装置の特徴と比較してください (表 3)。

表 3. Rotor-Gene Q 仕様

サイズと重量	幅 370 mm x 奥行き 420 mm x 高さ 286 mm 奥行き (ドアを開けた状態) : 538 mm 重量 : 12.5 kg
温度性能	温度均一性 : $\pm 0.02^{\circ}\text{C}$ 温度精度 : $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 温度分解能 : $\pm 0.02^{\circ}\text{C}$ 温度制御範囲 : $35 \sim 99^{\circ}\text{C}$ 温度平衡化時間 : 0 秒
光学システム	最大 6 つの独立チャンネル (365 ~ 680 nm 励起、460 ~ 750 nm 検出) 固定した光学経路、チャンネルごとに独立した強力な励起 LED と検出フィルター Gain (感度) のセッティング (感度コントロール) が可能な高感度光電子倍增管 (PMT) ダイナミックレンジ : 10^{10} (アッセイに依存)
ローター および ウェル形状	ローター Rotor-Disc 100 : 30 μl x 100 ウェル、反応容量 15 ~ 20 μl Rotor-Disc 72 : 0.1 ml x 72 ウェル、反応容量 20 ~ 25 μl * ウェル形状 0.1 ml Strip Tubes : 0.1 ml x 72 ウェル、反応容量 10 ~ 50 μl PCR チューブ 0.2 ml : 0.2 ml x 36 ウェル、反応容量 20 ~ 50 μl
作動時間	QIAGEN Rotor-Gene Kit を用いて 45 分 ~ 60 分で 40 サイクル (検出法に依存)
電源	100 ~ 240 V AC、50/60 Hz ; 560 VA (peak)

* 0.1 ml Strip Tubes を使用する場合、反応最小容量を 20 μl とすることで、SN 比の向上とデータのばらつきを最小化できます。

全てのアプリケーションに至適化済みの試薬

Rotor-Gene Q 用の様々な QIAGEN キットは、反応やサイクル条件の至適化なしにリアルタイム PCR アプリケーションにおいて信頼できる定量を実現します (表 4)。非特異的なプライマーアニーリングを最小限に抑えるイオン配合比により、特異性の高い増幅が行なわれます (図 5)。画期的な PCR 添加物である Q-Bond™により性能を損なうことなく高速サイクリングが行なえ (図 6)、ラン時間はわずか 45 分です (アプリケーションに依存)。困難なマルチプレックス PCR アプリケーションに関しては、合成添加剤 Factor MP により同一反応溶液中の異なるターゲットすべてが、同等の高い増幅効率を示します。革新的な PCR 添加物である Factor MP はテンプレート周辺でのプライマー濃度を高め、特異的なプライマー・アニーリングを安定化し、DNA ポリメラーゼの効率的な伸長反応を可能にします。

表 4. 様々なアプリケーションに対応する解析用キット

アプリケーション	検出方法	操作	QIAGEN キット名	実験データ
遺伝子発現解析 (およびゲノム DNA を用いた リアルタイム PCR アプリケーション)	SYBR Green	PCR、2 ステップ RT-PCR	Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	表 5
	SYBR Green	1 ステップ RT-PCR	Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit	図 7
	プローブ (singleplex)	PCR、2 ステップ RT-PCR	Rotor-Gene Probe PCR Kit	図 2
	プローブ (singleplex)	1 ステップ RT-PCR	Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit	図 8
	プローブ (multiplex)	PCR、2 ステップ RT-PCR	Rotor-Gene Multiplex PCR Kit	図 9
miRNA 検出	SYBR Green	2 ステップ RT-PCR	miScript SYBR Green PCR Kit	-
ウイルス検出	プローブ (singleplex および multiplex)	PCR、2 ステップ RT-PCR、 1 ステップ RT-PCR	QuantiTect® Virus +ROX Vial Kit	図 10
SNP ジェノタイピング	プローブ	PCR	Type-it Fast SNP Probe PCR Kit	図 11
	EvaGreen	HRM	Type-it HRM PCR Kit	図 3
メチル化解析	プローブ	PCR	EpiTect Methylight PCR Kit	図 12
	EvaGreen	HRM	EpiTect HRM PCR Kit	図 4

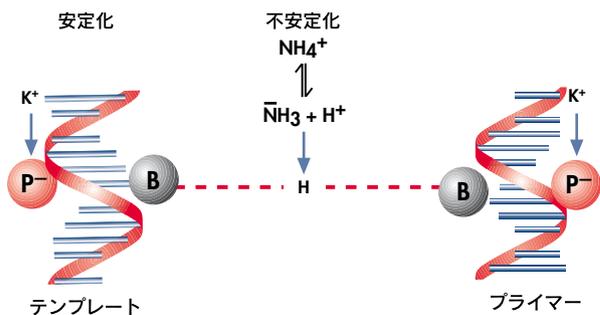


図 5. QIAGEN PCR バッファー中の NH_4^+ と K^+ がプライマーのアニーリングにおける特異性を増加
 K^+ が二本鎖 DNA バックボーンのリン酸基に結合し、プライマー・アニーリングを安定化する。 NH_4^+ は、ミスマッチ塩基対の弱い水素結合を不安定にする。

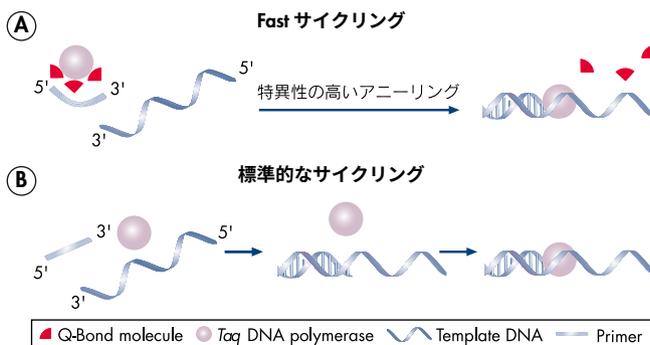


図 6. プライマーの高速なアニーリング
(A) Rotor-Gene Master Mix や Type-it Fast SNP PCR Master Mix 中の Q-Bond は、短い一本鎖 DNA への DNA ポリメラーゼの結合アフィニティを大幅に増大し、アニーリング時間を数秒間に短縮できる。さらに DNA の融解をサポートするユニークなバッファー組成が、変性およびエクステンション時間を短縮する。
(B) Q-Bond が存在しないと、プライマーとポリメラーゼが段階的にテンプレートに結合するのでプライマーのアニーリングに時間がかかる。

遺伝子発現解析

Rotor-Gene SYBR Green Kit、QuantiTect Primer Assay、Rotor-Gene Q の組み合わせは、最適化なしに開始できる遺伝子発現解析のためのトータルソリューションです。QuantiTect Primer Assay は、ヒト、マウス、ラット、その他の生物種のほとんどの遺伝子に対応するバイオフィーマティクスで検証済みのプライマーセットです。アッセイは GeneGlobe® ウェブサイト (www.qiagen.com/GeneGlobe) で容易にオーダーできます。アッセイは Rotor-Gene SYBR Green Kit と組み合わせると、最適化なしに特異的な PCR 産物の高感度定量が行なえます (図 7 および表 5)。

表 5. SYBR Green を用いた RT-PCR における卓越した性能

	QIAGEN		A ₁₁ 社	
	C _T	Mean deviation	C _T	Mean deviation
BAX (BCL2-associated X protein)	24.84	0.05	29.57	0.46
BCL2 (apoptosis gene)	26.96	0.05	32.83	0.29
MYC (proto-oncogene)	28.42	0.21	35.26	0.72
b-Actin (housekeeping gene)	20.24	0.03	24.39	0.12

ヒト白血球 cDNA (1 ng) をテンプレートとして、SYBR Green を用いた 2 ステップ・リアルタイム RT-PCR で使用した。4 種類のターゲットに対する QuantiTect Primer Assay を用いて triplicate で反応を行なった: BAX、BCL2、MYC、b-Actin。Rotor-Gene Q および Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit は、A₁₁ 社の装置とキットに比べて C_T 値と標準偏差が低いことから、感度が高いことが示唆された。

プローブ検出を用いた遺伝子発現解析には、TaqMan Gene Expression Assays と Rotor-Gene Probe Kit の組み合わせを Rotor-Gene Q 上で使用することで、高速で高感度な定量が可能になります。マスターミックスにアッセイとテンプレートを添加するだけで、その後は最適化済みのプロトコールに従います。発現量の低い転写物も、1 ステップ RT-PCR で信頼できる定量が行なえます (図 8)。

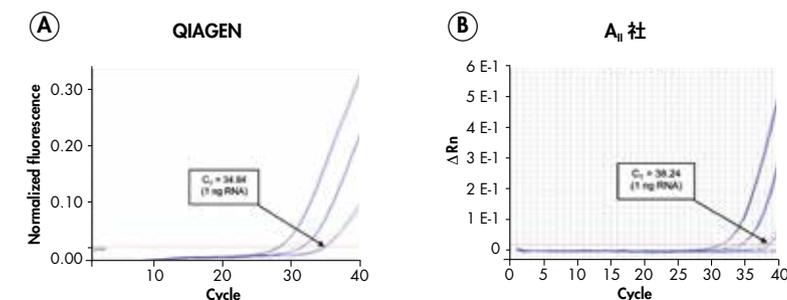


図 8. 配列特異的のプローブを用いた高感度検出

ヒト白血球 RNA の 10 段階階希釈液 (100 ng ~ 1 ng) をテンプレートとして、1 ステップ・リアルタイム RT-PCR で使用した。IL12RB1 (interleukin 12 receptor, beta 1) 用 TaqMan Gene Expression Assay を用いて Triplicate で反応を行なった。Rotor-Gene Q と Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit を用いた場合 (A)、A₁₁ 社の装置とキットを用いた場合 (B) よりも、非常に感度の高い結果 (C_T 値が低い) が得られた。

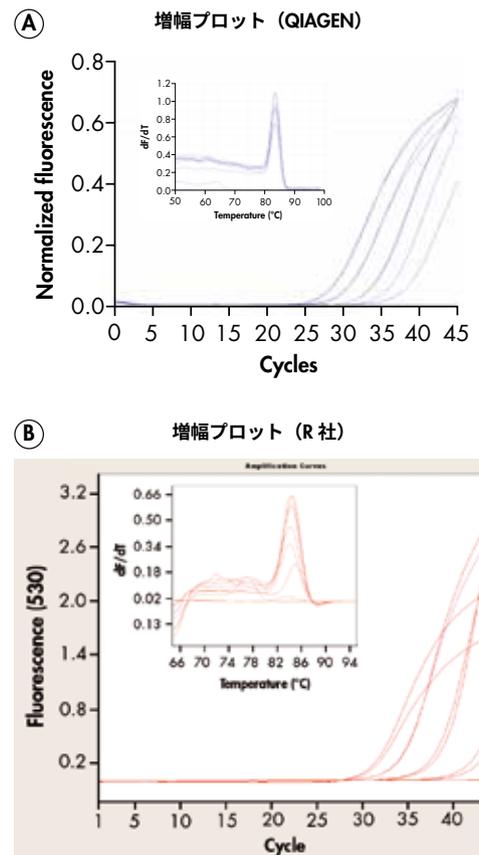


図 7. SYBR Green を用いた感度と特異性の高い検出

ヒト白血球 RNA の 10 段階階希釈液 (100 ng ~ 10 pg) をテンプレートとして、SYBR Green を用いた 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR で使用した。BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) 用の QuantiTect Primer Assay を用いて duplicate で反応を行なった。(A) Rotor-Gene Q および Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit は 10 pg の RNA を高感度で検出し、特異的な PCR 産物を増幅した (挿入図は融解曲線)。(B) R 社の装置とキットは Mg²⁺ 濃度の最適化後にはじめて検出できた。しかし、検出限界は 100 pg で、非特異的な PCR 産物の増幅が観察された (挿入図は融解曲線)。

Rotor-Gene Multiplex PCR Kit と Rotor-Gene Q の組み合わせは、迅速で信頼できる遺伝子発現解析を実現する究極のソリューションです。4種類までの cDNA ターゲットを同一チューブ内で同時に迅速定量でき、スループット数を増やし、貴重なサンプルを節約します (図9)。同一チューブ内の発現量が異なる遺伝子を全て同じ効率で増幅するので、信頼できる遺伝子発現の相対定量が可能です。

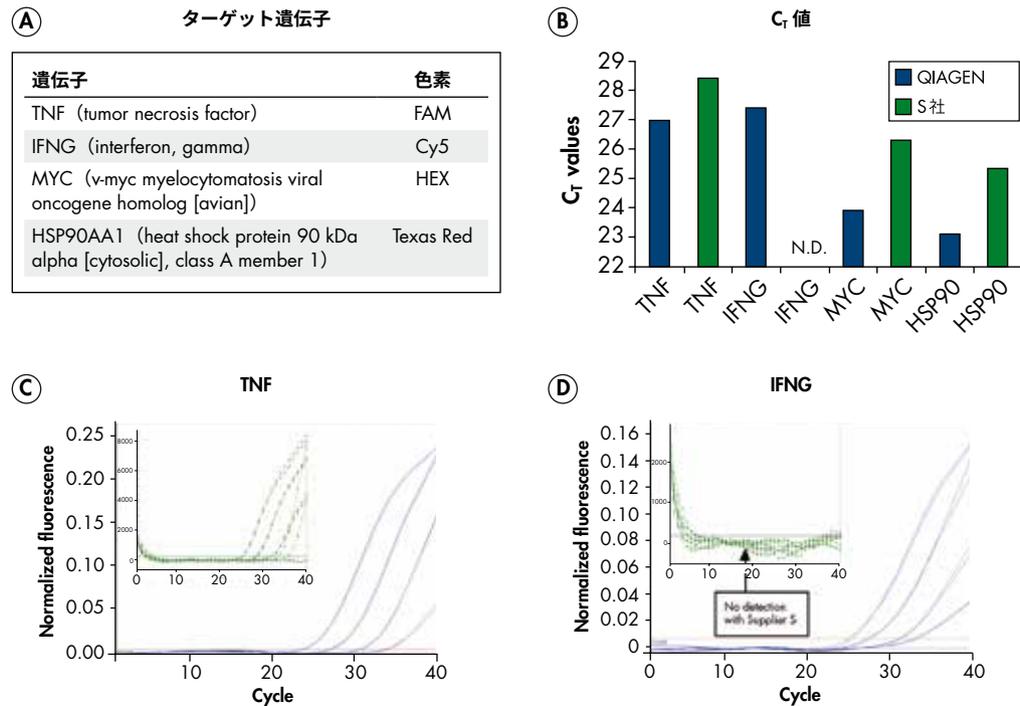


図9. 信頼できるマルチプレックス解析

ヒト白血球 cDNA の 10 倍段階希釈液 (10 ng ~ 10 pg) をテンプレートとして、4-plex リアルタイム PCR を行なった。Rotor-Gene Q と Rotor-Gene Multiplex PCR Kit、あるいは S 社の装置とキットを用いて triplicate で反応を行なった。(A) ; 増幅したターゲットと対応する TaqMan プローブのレポーター色素。(B) ; 4 種類のターゲットで得られた C_t 値 (S 社の装置とキットでは IFNG が増幅しなかった ; N.D.)。Rotor-Gene Q で得られた C_t 値が低いことは、高感度検出を証明している。(C) ; TNF の増幅プロット (挿入図は S 社のプロット)。(D) ; IFNG の増幅プロット (挿入図は S 社のプロット)。

miRNA 検出

miRNA は様々な生物学的なプロセスにおいて重要な役割を果たし、いくつかの癌やその他疾病に関与しています。非常に関心が高まっているこの研究分野のために QIAGEN では、3 つの要素で構成されている、発現解析のための miScript PCR System を提供しています。このシステムは miRNA と mRNA を同時に cDNA に変換するステップ、および SYBR Green を用いたリアルタイム PCR による miRNA 検出のすべてを網羅しています。miScript II Reverse Transcription Kit を用いた迅速で容易な逆転写反応、その後続いて miScript SYBR Green PCR Kit、miScript Primer Assay、Rotor-Gene Q を組み合わせて使うことで感度と特異性の高い miRNA 検出が行なえます。miScript PCR System に関する詳細はウェブサイト www.qiagen.com/miRNA をご覧ください。

ウイルス検出

QuantiTect Virus +ROX Vial KitとRotor-Gene Qの組み合わせは、最高4種類のウイルスDNAおよびRNAターゲットの迅速かつ高感度な同時検出を実現します。高濃度マスターミックスのため、アッセイに添加するテンプレート量を増やし、検出限界を下げるすることができます。ウイルス核酸ターゲットはsingleplexアッセイで個々に検出、あるいはマルチプレックス・アッセイで内部コントロールと一緒に検出できます。マルチプレックスアッセイにより、感度を損なうことなく複数のウイルスRNAやDNAターゲットおよびインターナルコントロールを広範囲で直線性のある検出を行なえます(図10)。

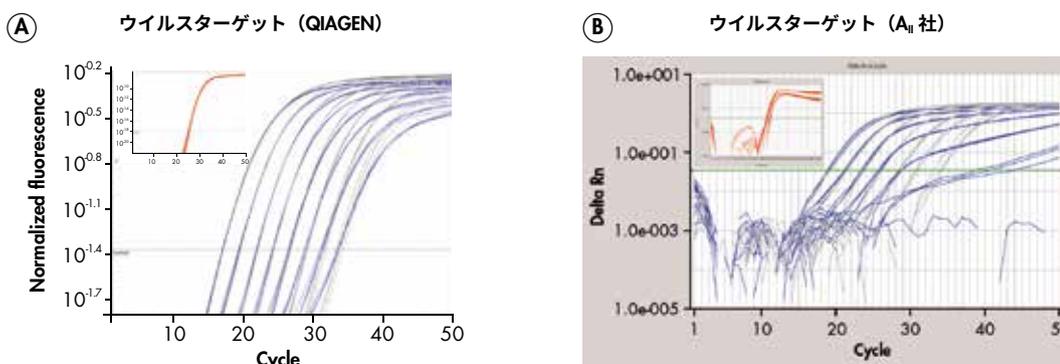


図 10. 高感度なウイルス検出

5倍段階希釈したウイルスターゲット (influenza virus B RNA) と、一定量のインターナルコントロール (10⁴ コピー数の in vitro 転写物) を duplex リアルタイム RT-PCR で解析した。比較のために、ウイルスターゲットを singleplex リアルタイム・1ステップ RT-PCR でも解析した。TaqMan カスタムアッセイを用いて triplicate で解析した。Rotor-Gene Q と QuantiTect Virus +ROX Vial Kit は、(A)；広範囲ダイナミックレンジにわたり高感度で再現性のあるウイルス検出を実現し (duplex アッセイ [青] のプロットが singleplex アッセイ [グレー] と重なる)、インターナルコントロールも再現性のある検出が行なえた (インターナルコントロールは挿入図)。(B)；一方 A₁ 社の装置とキットは、低コピー数のウイルスターゲットの信頼できる検出は不可能で (duplex アッセイ [青] のプロットが singleplex アッセイ [グレー] と重ならない)、インターナルコントロールも再現性のある検出が行なえなかった (インターナルコントロールは挿入図)。

SNP ジェノタイピング

Type-it Fast SNP Probe PCR Kit は、増幅の難しいテンプレートおよび SNPs、あるいは微量テンプレートでも Rotor-Gene Q 上で正確な SNP ジェノタイピングを実現します。アレルの明確な分離および、ばらつきのないクラスタリングにより、高いコールレートおよび正確で再現性の高い確実なジェノタイピング結果が得られます(図11)。本キットは市販の SNP ジェノタイピングアッセイにより性能を検証済みで、TaqMan MGB、TaqMan、その他ダブル標識プローブからなるカスタムアッセイとも同様に使用できます。

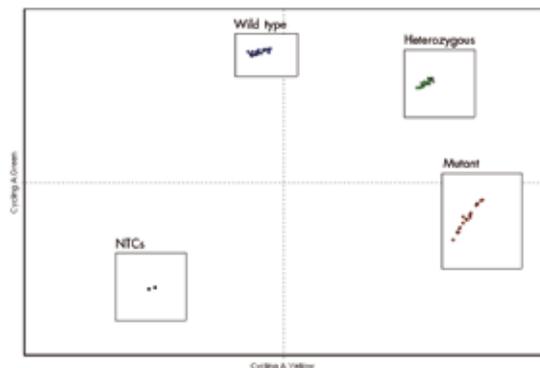
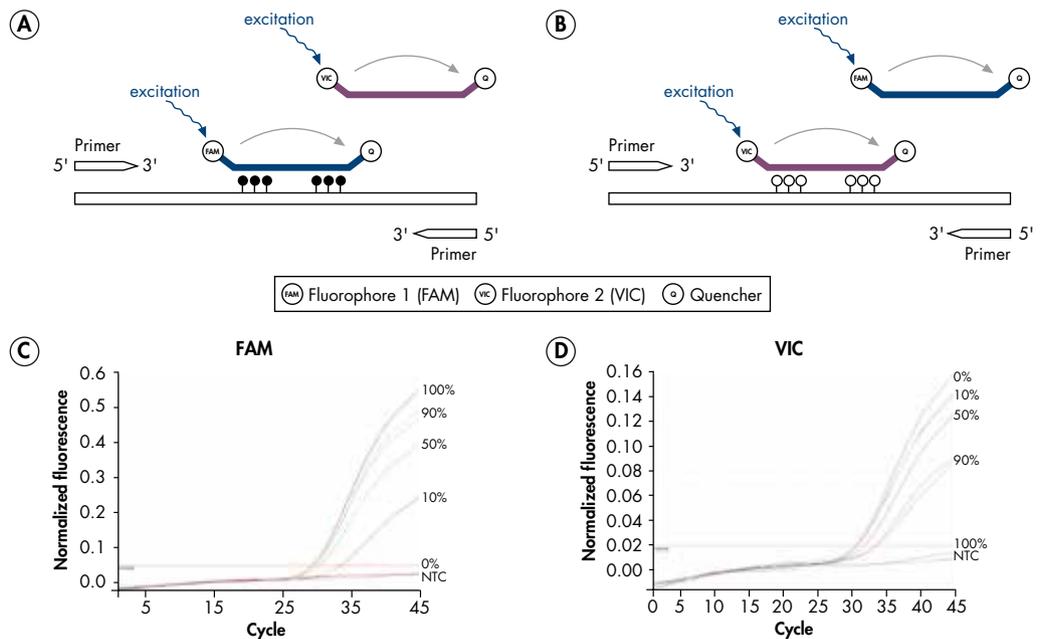


図 11. 微量テンプレートからでも信頼できる SNP ジェノタイピング

Type-it Fast SNP Probe PCR Kit を用いて、70 種類のゲノム DNA パネル (各 1 ng) の Allelic discrimination プロット解析 (対立遺伝子の識別) を行なった。rs 951134 用 TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイと 2 つのテンプレートを含まないコントロール (NTCs) と Rotor-Gene Q で PCR を行なった。黒: NTCs。青: FAM 蛍光により検出されたホモ接合体 (T allele)。緑: ヘテロ接合体サンプル。赤: VIC 蛍光により検出されたホモ接合体 (A allele)。微量のテンプレートを使用した場合でも、ばらつきのないクラスタリングと信頼できる結果が得られた。

DNA メチル化解析

HRM はメチル化部位のスクリーニングにとって有用なツールの一つです (5 ページ、図 4)。メチル化部位が同定されたら、CpG 部位の高感度な定量にはプローブ法による手法を使用できます。EpiTect MethyLight PCR Kit と Rotor-Gene Q の組み合わせにより、TaqMan あるいは他のダブル標識プローブを用いて高感度で信頼できるメチル化状態の解析が行なえます。本キットをプローブ利用のメチル化アッセイ (例; EpiTect MethyLight Assay など) と組み合わせた際に、高精度のメチル化定量解析を実現します。EpiTect MethyLight Assay は PCR プライマーと 2 種類のプローブ (メチル化に特異的なプローブと非メチル化に特異的なプローブ) で構成され、single リアルタイム PCR 反応でメチル化および非メチル化部位を同時に検出できます (図 12)。



メチル化を示すシグナル:
 $C_{T(CG)}$ (FAM) は CG レポーター (FAM チャンネル) の threshold サイクル数を示す。
非メチル化を示すシグナル:

$C_{T(TG)}$ (VIC) は TG レポーター (VIC チャンネル) の threshold サイクル数を示す。

メチル率:
 $C_{meth} = 100 / [1 + 2^{(C_{T(CG)} - C_{T(TG)})}] \%$

実験的に定義したメチル化程度	$C_{T(CG)}$ 平均値 (FAM プローブ)	$C_{T(TG)}$ 平均値 (VIC プローブ)	サンプルあたり計算したメチル化の程度 (%)
0%メチル化	45	30.37	0.004
10%メチル化	34.62	30.72	6.278
50%メチル化	31.27	31.67	56.887
90%メチル化	30.52	33.43	88.258
100%メチル化	30.05	45	99.997

図 12. メチル化状態のわずかな変化を高感度に検出

プローブを用いたメチル化アッセイと組み合わせて EpiTect MethyLight PCR Kit はサンプル中のメチル化状態を定量できる。アッセイは標的配列上のメチル化および非メチル化 DNA に特異的な 2 本の TaqMan プローブと標的配列を増幅するためのメチル化部位を含まない PCR プライマーペアで構成されている。標的配列のメチル化状態により、Bisulfite 変換したメチル化 DNA に特異的な FAM 標識 TaqMan プローブのみ (A)、あるいは Bisulfite 変換した非メチル化 DNA に特異的な VIC 標識 TaqMan プローブのみ (B) が標的配列にハイブリダイズできる。プローブが DNA にハイブリダイズすると蛍光色素が遊離され、蛍光量は PCR 産物量に比例している。本実験では、10 ng の Bisulfite 変換したメチル化および非メチル化 DNA、あるいはメチル化 DNA が 90% から 10% の一定の割合になるように両 DNA を混合した溶液を Hs_TMEFF2 EpiTect MethyLight Assay と EpiTect MethyLight PCR Kit を用いて Rotor-Gene Q でメチル化定量を行なった。メチル化 DNA ($C_{T(CG)}$) を検出するプローブの FAM チャンネルでの C_T 値 (C)、および非メチル化 DNA ($C_{T(TG)}$) を検出するプローブの VIC チャンネルでの C_T 値 (D) と上記の計算式を用いてメチル化の程度を計算した。

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.	価格 (¥)
Rotor-Gene Q 2plex System*	Rotor-Gene Q 2plex 本体 (green、yellow)、Rotor-Gene Q Software、ノート型 PC、取扱説明書、設置・基本取扱説明	9001620	2,500,000
Rotor-Gene Q 2plex HRM System*	Rotor-Gene Q 2plexHRM 本体 (green、yellow、HRM)、Rotor-Gene Q Software、ノート型 PC、取扱説明書、設置・基本取扱説明	9001630	3,900,000
Rotor-Gene Q 5plex System*	Rotor-Gene Q 5plex 本体 (green、yellow、orange、red、crimson)、Rotor-Gene Q Software、ノート型 PC、取扱説明書、設置・基本取扱説明	9001640	3,500,000
Rotor-Gene Q 5plex HRM System*	Rotor-Gene Q 5plex HRM 本体 (green、yellow、orange、red、crimson、HRM)、Rotor-Gene Q Software、ノート型 PC、取扱説明書、設置・基本取扱説明	9001650	4,900,000
Rotor-Gene Q 6plex System*	Rotor-Gene Q 6plex 本体 (blue、green、yellow、orange、red、crimson)、Rotor-Gene Q Software、ノート型 PC、取扱説明書、設置・基本取扱説明	9001660	4,200,000
Rotor-Disc 100 Starter Kit	Rotor-Disc 100, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 100 Rotor and Locking Ring, Rotor-Disc 100 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	9001602	680,000
Rotor-Disc 100 (30)	Pack of 30 individually wrapped discs for 3000 reactions	981311	38,000
Rotor-Disc 72 Starter Kit	Rotor-Disc 72, Rotor-Disc Heat Sealer, Rotor-Disc Heat Sealing Film, Rotor-Disc 72 Rotor and Locking Ring, Rotor-Disc 72 Loading Block, Rotor-Disc Pipetting Aid	9001600	680,000
Rotor-Disc 72 (24)	Pack of 24 individually wrapped discs for 1728 reactions	981301	35,000
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips of 4 tubes and caps for 1000 reactions	981103	25,000
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 thin-walled tubes for 1000 reactions	981005	10,000
Rotor-Disc OTV Kit	Kit for optical temperature verification of Rotor-Gene Q systems; requires Rotor-Disc 72 Rotor and Locking Ring or Rotor-Disc 72 Starter Kit	981400	52,000
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (400) [†]	For 400 x 25 µl reactions: 2x Master Mix, RNase-Free Water	204074	54,000
Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit (400)	For 400 x 25 µl reactions: 2x Master Mix, RT Mix, RNase-Free Water	204174	100,000
Rotor-Gene Probe PCR Kit (400) [†]	For 400 x 25 µl reactions: 2x Master Mix, RNase-Free Water	204374	60,000
Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit (400)	For 400 x 25 µl reactions: 2x Master Mix, RT Mix, RNase-Free Water	204574	86,000
Rotor-Gene Multiplex PCR Kit (400) [†]	For 400 x 25 µl reactions: 2x Master Mix, RNase-Free Water	204774	86,000

* 複数年保証のパッケージも用意しています。お問い合わせください。 † その他のサイズのキットもございます。お問い合わせください。

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.	価格 (¥)
QuantiTect Primer Assay (200)*	For 200 x 50 µl reactions: 10x QuantiTect Primer Assay (lyophilized)	Varies	20,000
QuantiTect Reverse Transcription Kit (50)*	For 50 x 20 µl reactions: Buffers, Quantiscript™ Reverse Transcriptase, RT Primer Mix, RNase-Free Water	205311	40,000
miScript SYBR Green PCR Kit (200)*†	For 200 x 50 µl reactions: 2x Master Mix, Universal Primer, RNase-Free Water	218073	56,000
QuantiTect Virus +ROX Vial Kit (200)*	For 200 x 50 µl reactions: 5x Master Mix, RT Mix, RNase-Free Water, Nucleic Acid Dilution Buffer	211033	100,000
Type-it Fast SNP Probe PCR Kit (800)*	For 800 x 25 µl reactions: 2x Master Mix, RNase-Free Water, Q-Solution™	206045	140,000

* その他のサイズのキットもございます。お問い合わせください。

† 本キットは miScript PCR System の一部です；詳細は www.qiagen.com/miRNA をご覧ください。

Rotor-Gene Q 専用の QIAGEN Kit と組み合わせて使用した場合、それぞれの QIAGEN Kit ハンドブックに記載されているアプリケーションで使用してください。Rotor-Gene Q を QIAGEN 以外のキットと共に使用する場合は、どのような特別のアプリケーションでもそれらのキットと組み合わせた性能の検証はユーザーの責務です。

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.com 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.com から入手可能です。

記載の価格は希望小売価格です。

Rotor-Gene Q に関する詳細は www.qiagen.com/goto/Rotor-GeneQ をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, EpiTect®, GeneGlobe®, Q-Bond™, Q-Solution™, Quantiscript™, QuantiTect®, Rotor-Gene™, Rotor-Disc™, Type-it™ (QIAGEN Group); Alexa Fluor®, SYBR®, Texas Red® (Molecular Probes, Inc.); CAL Fluor™, Quasar™ (Biosearch Technologies, Inc.); Cy® (GE Healthcare); FAM™, JOE™, ROX™, VIC® (Applied Biosystems or its subsidiaries); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group).

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。© 2020 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.com

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