

英語版 January 2009 に対応

QuantiTect® Primer Assay プロトコールとトラブルシューティング

QuantiTect Primer Assay

QuantiTect Primer Assay 96 Plate

QuantiTect Primer Assay 384 Plate

ゲノムワイドで即使用可能なリアルタイム RT-PCR
アッセイ (SYBR® Green 検出) 用



Sample & Assay Technologies

目次

プロトコール

Rotor-Gene Cyclor用の2ステップRT-PCR (高速プロトコール)	3
2ステップRT-PCR (高速プロトコール)	6
2ステップRT-PCR (標準プロトコール)	9
キャピラリーサイクラー用の2ステップRT-PCR (標準プロトコール)	12
Rotor-Gene Cyclor用の1ステップRT-PCR (高速プロトコール)	15
1ステップRT-PCR (高速プロトコール)	18
1ステップRT-PCR (標準プロトコール)	21
キャピラリーサイクラー用の1ステップRT-PCR (標準プロトコール)	24
トラブルシューティング	28

プロトコール: Rotor-Gene Cyclers用の2ステップRT-PCR (高速プロトコール)

本プロトコールはRotor-Gene™ Q、Rotor-Gene 3000、Rotor-Gene 6000でRotor-Gene SYBR Green PCR Kitを使用するためのものです。

実験を始める前の重要事項

- Rotor-Gene SYBR Green PCR Kitは、95℃の変性ステップと60℃のアニーリング/エクステンション・ステップを組み合わせた**2ステップサイクリング**プロトコールで使用するようにデザインされています。
- PCRステップは**まず95℃で5分のインキュベーション**を行なって、HotStarTaq® Plus DNA Polymerase (2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mixに含有されている)を活性化させます。
- 最終容量を25 µlにすることを推奨します。
- 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mixに**添加済みのMg²⁺濃度**で常に始めてください。

実験開始前の準備事項

- 初めて QuantiTect Primer Assay を使用される場合は、まず英語版 Handbook 6 ページ “Shipping and Storage” の説明に従って、使用前にこれを溶解します。

操作手順

1. **2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix** (-20℃で保存の場合)、**10x QuantiTect Primer Assay**、cDNA テンプレート、RNase フリー水を解凍する。各溶液を混和する。
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であるため、反応のセットアップ中あるいはRotor-Geneサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上で保冷する必要はありません。

注: 2x Rotor-Gene SYBR Green 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。

注: 添加するcDNAの容量(未希釈のRT反応液)はPCR最終容量の10%を超えないようにします。

表3. Rotor-Geneサイクラーを用いた2ステップRT-PCRの反応セットアップ

成分	容量/反応	最終濃度
2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix	12.5 µl	1x
10x QuantiTect Primer Assay	2.5 µl	1x
cDNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	≤100 ng / 反応
RNase フリー水	適量	-
トータル容量	25 µl	-

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量をPCRチューブに分注する。
4. 反応ミックスを含んだそれぞれのPCRチューブにcDNAテンプレート（反応あたり100 ng以下）を添加する。
5. Rotor-Geneサイクラーを表4に従ってプログラムする。
蛍光取り込みは、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いません。

表4. Rotor-Geneサイクラーを用いた高速2ステップRT-PCRのサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
PCR初期活性化 ステップ	5分	95℃	本ステップでHotStarTaq Plus DNA Polymeraseを活性化
2ステップサイクリング:			
変性	5秒	95℃	
アニーリング/ エクステンションの 組み合わせ	10秒	60℃	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35～40		サイクル数はcDNAテンプレート およびターゲット遺伝子の 発現量に依存

6. Rotor-Gene サイ클ー内に PCR チューブを入れ、プログラムをスタートする。

オプション：PCR産物を同定し特異性を確認するために、融解曲線解析を行なうことが可能です。融解曲線解析はRotor-Geneサイ클ーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。装置に添付の説明書に従ってください。

注：PCR産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。Rotor-Gene SYBR Green PCR 試薬を用いて得られた T_m 値は、その他の試薬を用いて得られる値とは異なることがあります。

Rotor-Gene サイ클ーのソフトウェアのセットアップに関しては、ステップごとのガイドが弊社ウェブサイト www.qiagen.com/literature/protocols の protocol PCR106 に掲載されています。

プロトコール：2ステップRT-PCR（高速プロトコール）

本プロトコールは、ほとんどのリアルタイム用サーマルサイクラーで QuantiFast™ SYBR Green PCR Kit を使用するためのものです。

実験を始める前の重要事項

- QuantiFast SYBR Green PCR Kit は、95℃の変性ステップと60℃のアニーリング/エクステンション・ステップを組み合わせた**2ステップサイクリング**プロトコールで使用するようデザインされています。
- PCRステップは**まず95℃で5分のインキュベーション**を行なって、HotStarTaq Plus DNA Polymerase（2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mixに含まれている）を活性化させます。
- 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。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。
- 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mixに**添加済みのMg²⁺濃度**で常に始めてください。

実験開始前の準備事項

- 初めて QuantiTect Primer Assay を使用される場合は、まず英語版 Handbook 6 ページ “Shipping and Storage” の説明に従って、使用前にこれを溶解します。
- **iCycler iQ®、iQ5、MyiQ** を使用する場合：各実験の初めに Well Factor の測定が必要です。システムやピペッティングによるばらつきを補正する際に Well Factor を使用します。詳細は機器に付属のユーザーマニュアルあるいは英語版 Handbook 55 ページの Appendix E をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix** (-20℃で保存の場合)、**10x QuantiTect Primer Assay**、cDNA テンプレート、RNase フリー水を解凍する。各溶液を混和する。
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法であるため、反応のセットアップ中あるいはリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上に保冷する必要はありません。

注：2x QuantiFast SYBR Green 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。

注：添加するcDNAの容量（未希釈のRT反応液）はPCR最終容量の10%を超えないようにします。

表5. 高速2ステップRT-PCRの反応セットアップ

成分	容量/反応			最終濃度
	96ウェル ブロック	キャピラリー サイクラー	384ウェル ブロック	
2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	12.5 µl	10 µl	5 µl	1x
10x QuantiTect Primer Assay	2.5 µl	2 µl	1 µl	1x
cDNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	適量	適量	≤100 ng/ 反応
RNase フリー水	適量	適量	適量	-
トータル容量	25 µl	20 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. cDNAテンプレート（1反応当たり100 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。
5. 表6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。
蛍光取り込みは、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います。

表6. 高速2ステップRT-PCRのサイクリング条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
PCR初期活性化 ステップ	5分	95℃	最高/ 高速モード	本ステップで HotStarTaq Plus DNA Polymerase を 活性化
2ステップサイクリング：				
変性	10秒	95℃	最高/ 高速モード	
アニーリング/ エクステンションの 組み合わせ	30秒	60℃	最高/ 高速モード	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35～40			サイクル数はcDNAテン プレートおよびターゲッ ト遺伝子の発現量に依存

6. PCR容器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。

オプション：PCR産物を同定し特異性を確認するために、融解曲線解析を行なうことが可能です。融解曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーの説明書に従ってください。

注：PCR産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiFast SYBR Green PCR試薬を用いて得られた T_m 値は、他の試薬によって得られた値と異なる可能性があります。

サイクラーのソフトウェアのセットアップに関しては、ステップごとのガイドが弊社ウェブサイト www.qiagen.com/fastPCR に掲載されています。

プロトコール：2ステップRT-PCR（標準プロトコール）

本プロトコールは Applied Biosystems®、Bio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Corbett/QIAGEN、Eppendorf®、Roche®（LightCycler® 480）、Stratagene® 社のリアルタイム用サーマルサイクラーで QuantiTect SYBR Green PCR Kit あるいは QuantiTect SYBR Green PCR +UNG Kit を使用するためのものです。キャピラリーサイクラー（例；LightCycler 1.x、LightCycler 2.0）上で **QuantiTect SYBR Green PCR Kit** あるいは **QuantiTect SYBR Green PCR +UNG Kit** を用いて 2ステップRT-PCR を行なう場合は、12 ページのプロトコールに従ってください。

実験を始める前の重要事項

- PCR ステップはまず **95 °C** で **15 分** のインキュベーションを行なって、HotStarTaq DNA Polymerase（2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix に添加済）を活性化させます。
- 毎回ランの解析ごとに threshold 値を調整します。
- ABI PRISM® 7000 を使用する際には optical adhesive cover で PCR プレート を密封することを強くお勧めします。この機器を使用する際には、最終容量が 25 µl 未満にならないようにします。

実験開始前の準備事項

- 初めて QuantiTect Primer Assay を使用される場合は、まず英語版 Handbook 6 ページ “Shipping and Storage” の説明に従って、使用前にこれを溶解します。
- **SmartCycler®** システムを使用する場合：12.5 µl の 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix および 2.5 µl の 10x QuantiTect Primer Assay を用いて反応液の最終容量が 25 µl になるようにします。
- **iCycler iQ、iQ5、MyiQ** を使用する場合：各実験の初めに Well Factor の測定が必要ですが、システムやピペッティングによるばらつきを補正する際に Well Factor を使用します。詳細は機器に付属のユーザーマニュアルあるいは英語版 Handbook 55 ページ、Appendix E をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix** (-20°C で保存の場合)、**10x QuantiTect Primer Assay**、**cDNA テンプレート**、**RNase フリー水**を解凍し、各々の溶液を均一になるように混和する。

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法であるため、反応のセットアップ中あるいはリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上に保冷する必要はありません。

注： Mg^{2+} 濃度の至適化は必要ありません。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix中に既に含有されている最終濃度2.5 mMの Mg^{2+} 溶液で最高の結果が得られます。

注：添加するcDNAの容量（未希釈RT反応液）はPCR最終容量の10%を超えないようにします。

表7. 2ステップRT-PCRの反応セットアップ

成分	容量/反応	最終濃度
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*	25 μl	1x
10x QuantiTect Primer Assay	5 μl	1x
cDNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	≤ 100 ng / 反応
オプション：Uracil-N-glycosylase [†]	0.5 μl	0.5 unit / 反応
RNase フリー水	適量	-
トータル容量	50 μl[‡]	-

* MgCl_2 の最終濃度は2.5 mM

[†] QuantiTect SYBR Green PCR +UNG Kitに添付。

[‡] 50 μl 以外の反応量を使用する場合には、その量に応じてmaster mixおよびprimer assayの最終濃度が1倍になるように調節してください。UNGは0.5 unit、cDNAテンプレートは100 ng以下のままでご使用ください。

3. 反応ミックスを完全に混和してPCRチューブあるいはプレートに適切な量を分注する。
4. cDNAテンプレート（1反応あたり100 ng以下）を反応ミックスの入ったそれぞれのPCRチューブあるいはウェルに添加する。
5. 表8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。
蛍光取り込みはエクステンション・ステップで行ないます。

表 8. 2 ステップ RT-PCR のサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
UNG (オプション) キャリアオーバー防止	2分	50℃	キャリアオーバーした dUMP を含む PCR 産物の コンタミを UNG が除去
PCR 初期活性化 ステップ	15分	95℃	本ステップで HotStarTaq DNA Polymerase を活性化
3ステップサイクリング：			
変性*	15秒	94℃	
アニーリング	30秒	55℃	
エクステンション†	30秒	72℃	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35～40		サイクル数は cDNA テンプレートおよびターゲット 遺伝子の発現量に依存

* SmartCycler を用いる場合はこのサイクラーの特性を利用して、変性時間を 1 秒間に短縮することが可能です。

† 各サイクラーの特性に応じて、蛍光検出ステップは ABI PRISM 7000 では最低 30 秒間、Applied Biosystems 7300 および 7500 では 34 秒間で行ないます。

6. PCR チューブあるいはプレートを実タイム用サーマルサイクラーにセットしてサイクリングプログラムをスタートする。

ラン後の解析において Applied Biosystems 7500 の場合は、0.2 に設定されているデフォルトの “Manual Ct” threshold 値をさらに低く設定（例； 0.02）することでデータ解析が適切に行なわれます。

オプション： PCR 産物を同定し特異性を確認するために、融解曲線解析を行なうことが可能です。融解曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーの説明書に従ってください。

注： PCR 産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiTect SYBR Green PCR 試薬を用いて得られた T_m 値は、他の試薬によって得られた値と異なる可能性があります。

プロトコール：キャピラリーサイクラー用の2ステップRT-PCR（標準プロトコール）

本プロトコールはキャピラリーサイクラー（例；LightCycler 1.x、LightCycler 2.0）で QuantiTect SYBR Green PCR KitあるいはQuantiTect SYBR Green PCR +UNG Kitを使用するためのものです。他のリアルタイム用サーマルサイクラー（LightCycler 480を含む）上で QuantiTect SYBR Green PCR Kitあるいは QuantiTect SYBR Green PCR +UNG Kitを用いて2ステップRT-PCRを行なう場合には、9ページのプロトコールに従ってください。

実験を始める前の重要事項

- PCRステップはまず**95℃で15分のインキュベーション**を行なって、HotStarTaq DNA Polymerase（2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mixに添加済み）を活性化させます。
- データ解析に“fit-point”法を使用する際には、毎回ランの解析ごとにnoise bandを調節します。

実験開始前の準備事項

- 初めて QuantiTect Primer Assayを使用される場合は、まず英語版 Handbook 6ページ“Shipping and Storage”の説明に従って、使用前にこれを溶解します。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix**（-20℃で保存の場合）、**10x QuantiTect Primer Assay**、cDNAテンプレート、RNaseフリー水を解凍し、各々の溶液を均一になるように混和する。
2. 表9に従って反応ミックスを調製する。

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

注：Mg²⁺濃度の至適化は必要ありません。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix中に既に含有されている最終濃度2.5 mMのMg²⁺溶液で最高の結果が得られます。

注：添加するcDNAの容量（未希釈のRT反応液）はPCR最終容量の10%を超えないようにします。

表9. キャピラリーサイクラーを用いた2ステップRT-PCRの反応セットアップ

成分	容量/反応	最終濃度
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*	10 μ l	1x
10x QuantiTect Primer Assay	2 μ l	1x
cDNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	\leq 100 ng/反応
オプション: Uracil-N-glycosylase [†]	0.5 μ l	0.5 unit/反応
RNase フリー水	適量	-
トータル容量	20 μl[‡]	-

* MgCl₂の最終濃度は2.5 mM。

[†] QuantiTect SYBR Green PCR +UNG Kitに添付。

[‡] 20 μ lキャピラリーの代わりに100 μ lキャピラリーを使用する際は、master mixとprimer assayの容量を5倍に調節してください。UNGは0.5 unit、cDNAテンプレートは100 ng以下のまご使用ください。

3. 反応ミックスを完全に混和し、PCRキャピラリーに適切な量を分注する。
4. 反応ミックスの入った各PCRキャピラリーにcDNAテンプレート（反応あたり100 ng以下）を添加する。
5. 表10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。LightCyclerのソフトウェアのバージョンが3.5より古い場合には、表11に記載されているようにfluorescence gainsをセットする。
蛍光取り込みはエクステンション・ステップで行ないます。
6. PCRキャピラリー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。

オプション: PCR産物を同定し特異性を確認するために、融解曲線解析を行なうことが可能です。融解曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーの説明書に従ってください。

注: PCR産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiTect SYBR Green PCR試薬を用いて得られた T_m 値は、他の試薬によって得られた値と異なる可能性があります。

表 10. キャピラリーサイクラーを用いた2ステップRT-PCRのサイクリング条件

ステップ	時間	温度	ランプ	コメント
UNG (オプション) キャリーオーバー 防止	2分	50℃	20℃/秒	キャリーオーバーした dUMPを含むPCR産物 のコンタミをUNGが 除去
PCR 初期活性化 ステップ	15分	95℃	20℃/秒	本ステップで HotStarTaq DNA Polymeraseを活性化
3ステップサイクリング：				
変性	15秒	94℃	2℃/秒	
アニーリング	20秒	55℃	2℃/秒	
エクステンション	20秒	72℃	2℃/秒	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35～40			サイクル数はcDNA テンプレートおよび ターゲット遺伝子の 発現量に依存

表 11. LightCycler 1.x用の蛍光パラメーター

Fluorimeter gain	Value
Channel 1 (F1)	15
Channel 2 (F2)	10
Channel 3 (F3)	10

Display mode (LightCycler 1.x) : fluorescence channel 1/1 (F1/1)

LightCycler ソフトウェアバージョン 3.5 またはそれ以降のものは fluorescence channels 用の fluorimeter gain が自動的に調節されます。ユーザーによるセッティングの必要はありません。

Display mode (LightCycler 2.0.x) : channel settings 530/610

プロトコール：Rotor-Gen^e Cycler用の1ステップRT-PCR (高速プロトコール)

本プロトコールはRotor-Gen^e Q、Rotor-Gen^e 3000、あるいはRotor-Gen^e 6000でRotor-Gen^e SYBR Green RT-PCR Kitを使用するためのものです。

実験を始める前の重要事項

- Rotor-Gen^e SYBR Green RT-PCR Kitは、95℃の変性ステップと60℃のアニーリング/エクステンション・ステップを組み合わせた**2ステップサイクリング**プロトコールで使用するようにデザインされています。
- 逆転写反応後、RT-PCRのPCRステップはまず、**95℃で5分のインキュベーション**を行なって、HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase (2x Rotor-Gen^e SYBR Green RT-PCR Master Mixに含有されている)を活性化させます。
- Rotor-Gen^e RT Mixによる不完全なcDNA合成やプライマーダイマーの形成を防ぐために、**すべての反応液は氷上でセットアップ**します。
- 最終容量を25 µlにすることを推奨します。
- 2x Rotor-Gen^e SYBR Green RT-PCR Master Mixに**添加済みのMg²⁺濃度**で常に始めてください。

実験開始前の準備事項

- 初めて QuantiTect Primer Assayを使用される場合は、まず英語版 Handbook 6ページ“Shipping and Storage”の説明に従って、使用前にこれを溶解します。

操作手順

1. **2x Rotor-Gen^e SYBR Green RT-PCR Master Mix** (-20℃で保存の場合)、**10x QuantiTect Primer Assay**、RNAテンプレート、RNaseフリー水を解凍する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**Rotor-Gen^e 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12に従って反応ミックスを調製する。

反応ミックス調製中はサンプルを氷上に置いておきます。

注：2x Rotor-Gen^e SYBR Green RT-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 12. Rotor-Gene サイ클ラーを用いた高速 1 ステップ RT-PCR の反応セットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Master Mix	12.5 μ l	1x
10x QuantiTect Primer Assay	2.5 μ l	1x
Rotor-Gene RT Mix	0.25 μ l	-
RNA テンプレート (ステップ 4 で添加)	適量	≤ 10 ng / 反応
RNase フリー水	適量	-
トータル容量	25 μl	-

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量を PCR チューブに分注する。
氷上でチューブを保冷します。
4. 反応ミックスを含む個々の PCR チューブに RNA テンプレート (反応あたり 10 ng 以下) を添加する。
5. **Rotor-Gene サイ클ラー**を表 13 に従ってプログラムする。**Rotor-Gene サイ클ラー**のプログラミングの間、サンプルを氷上で保冷する。
蛍光取り込みは、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います。

表 13. Rotor-Gene サイ클ラーを用いた高速 1 ステップ RT-PCR のサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	10分	55℃	
PCR 初期活性化 ステップ	5分	95℃	本ステップで HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化、逆転写反応の終了、cDNA テンプレートの変性を行なう
2ステップサイクリング：			
変性	5秒	95℃	
アニーリング/ エクステンションの 組み合わせ	10秒	60℃	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35～40		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量に依存

6. Rotor-Gene サイ클ラー内に PCR チューブを入れ、サイクリングプログラムをスタートする。

オプション：RT-PCR 産物の同定と特異性の確認は、融解曲線解析を行なうことにより可能です。融解曲線解析は Rotor-Gene サイ클ラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。装置に添付の説明書に従ってください。

注：RT-PCR 産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR 試薬を用いて得られた T_m 値は、その他の試薬を用いて得られる値とは異なることがあります。

Rotor-Gene サイ클ラーのソフトウェアのセットアップに関しては、ステップごとのガイドがウェブサイト www.qiagen.com/literature/protocols の protocol PCR107 に掲載されています。

プロトコール：1ステップRT-PCR（高速プロトコール）

本プロトコールは QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit をほとんどのリアルタイム用サーマルサイクラーで使用するためのものです。

実験を始める前の重要事項

- QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit は、95 °C の変性ステップと 60 °C のアニーリング/エクステンション・ステップを組み合わせた **2ステップサイクリング** プロトコールで使用するようにデザインされています。
- 逆転写反応後、RT-PCR の PCR ステップはまず、**95 °C で 5 分のインキュベーション** を行なって、HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase (2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix に含まれている) を活性化させます。
- QuantiFast RT Mix による不完全な cDNA 合成やプライマーダイマーの形成を防ぐために、**すべての反応液は氷上でセットアップ** します。
- 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 にすることを推奨します。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 μ l にすることを強く推奨します。
- 2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix に添加済みの Mg^{2+} 濃度で常に始めてください。

実験開始前の準備事項

- 初めて QuantiTect Primer Assay を使用される場合は、まず英語版 Handbook 6 ページ “Shipping and Storage” の説明に従って、使用前にこれを溶解します。
- **iCycler iQ、iQ5、MiyQ を使用する** 場合：各実験の初めに Well Factor の測定が必要です。システムやピペッティングによるばらつきを補正する際に Well Factor を使用します。詳細は機器に付属のユーザーマニュアルあるいは英語版 Handbook 55 ページ、Appendix E をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix** (-20 °C で保存の場合)、**10x QuantiTect Primer Assay**、RNA テンプレート、RNase フリー水を解凍する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiFast RT Mix** は使用直前に -20 °C から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに -20 °C に戻す。
2. 表 14 に従って反応ミックスを調製する。
反応ミックス調製中はサンプルを氷上に置いておきます。

注：2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix に添加済みの Mg^{2+} 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

表 14. 高速 1 ステップ RT-PCR の反応セットアップ

成分	容量/反応			最終濃度
	96 ウェル ブロック	キャピラリー サイクラー	384 ウェル ブロック	
2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix	12.5 µl	10 µl	5 µl	1x
10x QuantiTect Primer Assay	2.5 µl	2 µl	1 µl	1x
QuantiFast RT Mix	0.25 µl	0.2 µl	0.1 µl	-
RNA テンプレート (ステップ 4 で添加)	適量	適量	適量	≤10 ng/ 反応
RNase フリー水	適量	適量	適量	-
トータル容量	25 µl	20 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。

PCR 容器あるいはプレートを氷上に置いておきます。

4. RNA テンプレート（反応あたり 10 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。

5. 表 15 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。リアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミングの間、サンプルを氷上で保冷する。

蛍光取り込みは、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います。

表 15. 高速1ステップRT-PCRのサイクリング条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
逆転写反応	10分	50℃		
PCR 初期活性化 ステップ	5分	95℃	最高/ 高速モード	本ステップで HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymeraseの活性化、 逆転写反応の終了、 cDNA テンプレートの 変性を行なう
2ステップサイクリング:				
変性	10秒	95℃	最高/ 高速モード	
アニーリング/ エクステンションの 組み合わせ	30秒	60℃	最高/ 高速モード	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35~40			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 発現量に依存

6. PCR 容器あるいはプレートを実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。

オプション: RT-PCR 産物の同定と特異性の確認は、融解曲線解析を行なうことにより可能です。融解曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーの説明書に従ってください。

注: RT-PCR 産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiFast SYBR Green RT-PCR 試薬を用いて得られた T_m 値は、他の試薬によって得られた値と異なる可能性があります。

サイクラーのソフトウェアのセットアップに関しては、ステップごとのガイドがウェブサイト www.qiagen.com/FastPCR に掲載されています。

プロトコール：1ステップRT-PCR（標準プロトコール）

本プロトコールは Applied Biosystems、Bio-Rad/MJ Research、Cepheid、Corbett/QIAGEN、Eppendorf、Roche (LightCycler 480)、Stratagene 社のリアルタイム用サーマルサイクラーで QuantiTect SYBR Green PCR Kit を使用するためのものです。キャピラリーサイクラー（例；LightCycler 1.x、LightCycler 2.0）上で **QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit** を用いて 1ステップRT-PCR を行なう場合には、24 ページのプロトコールに従ってください。

実験を始める前の重要事項

- 逆転写反応後、RT-PCR のPCRステップは**まず95℃で15分のインキュベーション**を行なって、HotStarTaq DNA Polymerase（2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix に含まれている）を活性化させます。
- QuantiTect RT Mix による不完全な cDNA 合成やプライマーダイマーの形成を防ぐために、**すべての反応液は氷上でセットアップ**します。
- 毎回ランの解析ごとに threshold 値を調整します。
- ABI PRISM 7000 を使用する際には optical adhesive cover で PCR プレート を密封することをお勧めします。この機器を使用する際には、最終容量が 25 μ l 未満にならないようにします。
- オプションの UNG 処理（英語版 Handbook 54 ページ参照）を行なう際は、**熱感受性 UNG のみ**を使用してください。

実験開始前の準備事項

- 初めて QuantiTect Primer Assay を使用される場合は、まず英語版 Handbook 6 ページ “Shipping and Storage” の説明に従って、使用前にこれを溶解します。
- **Smart Cycler システムを使用する場合**：12.5 μ l の 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix、2.5 μ l の 10x QuantiTect Primer Assay および 0.25 μ l QuantiTect RT Mix を用いて反応液の最終容量を 25 μ l にします。さらに逆転写反応ステップは 20 分に短縮可能です。
- **iCycler iQ、iQ5、MyiQ を使用する場合**：各実験の初めに Well Factor の測定が必要です。システムやピペッティングによるばらつきを補正する際に Well Factor を使用します。詳細は機器に付属のユーザーマニュアルあるいは英語版 Handbook 55 ページ、Appendix E をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix** (-20℃で保存の場合)、**10x QuantiTect Primer Assay**、RNA テンプレート、RNase フリー水を解凍する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect 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 16 に従って反応ミックスを調製する。

反応ミックス調製中はサンプルを氷上に置いておきます。

注：Mg²⁺濃度の至適化は必要ありません。2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix 中に既に含まれている最終濃度 2.5 mM の Mg²⁺ 溶液で最高の結果が得られます。

表 16. 1 ステップ RT-PCR の反応セットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix*	25 µl	1x
10x QuantiTect Primer Assay	5 µl	1x
QuantiTect RT Mix	0.5 µl	0.5 µl／反応
RNA テンプレート (ステップ 4 で添加)	適量	≤10 ng／反応
オプション：Uracil-N-glycosylase (UNG)、 熱感受性	適量	1～2 units／反応
RNase フリー水	適量	–
トータル容量	50 µl[†]	–

* MgCl₂ の最終濃度は 2.5 mM。

[†] 50 µl 以外の反応量を使用する場合には、その量に応じて master mix、primer assay、RT mix の割合が変わらないようにこれらの量を調節してください（例；トータル量が 25 µl の場合、12.5 µl の master mix、2.5 µl の primer assay、0.25 µl の RT mix を使用）。UNG は 1～2 unit、RNA テンプレートは 10 ng 以下のまま使用してください。

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

チューブあるいはプレートは氷上で保冷します。

4. RNA テンプレート (≤10 ng／反応) を反応ミックスの入った個々の PCR チューブあるいはウェルに添加する。

オプションの UNG 処理を行なう場合、サンプルを 10 分間以上氷上に放置してください。

5. 表 17 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。リアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミングの間、サンプルを氷上で保冷する。

蛍光取り込みはエクステンション・ステップで行ないます。

表 17.1 ステップPCRのサイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	30分	50℃	
PCR 初期活性化 ステップ	15分	95℃	本ステップで HotStarTaq DNA Polymerase の活性化、逆転写反応の終了、cDNA テンプレートの変性を行なう
3ステップサイクリング：			
変性*	15秒	94℃	
アニーリング	30秒	55℃	
エクステンション†	30秒	72℃	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35～40		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量に依存

* SmartCycler を用いる場合はこのサイクラーの特性を利用して、変性時間を1秒間に短縮することが可能です。

† ソフトウェアにより、蛍光検出ステップはABI PRISM 7000では最低30秒間、Applied Biosystems 7300および7500では34秒間で行ないます。

6. PCR チューブあるいはプレートを実タイム用サーマルサイクラーにセットしてサイクリングプログラムをスタートする。

ラン後の解析において Applied Biosystems 7500 を使用される場合は、0.2 に設定されているデフォルトの “Manual Ct” threshold 値をさらに低く設定（例；0.02）することでデータ解析が適切に行なわれます。

オプション： RT-PCR 産物の同定と特異性の確認は、融解曲線解析を行なうことにより可能です。融解曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーの説明書に従ってください。

注： RT-PCR 産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiTect SYBR Green RT-PCR 試薬を用いて得られた T_m 値は、他の試薬によって得られた値と異なる可能性があります。

プロトコール：キャピラリーサイクラー用の1ステップRT-PCR（標準プロトコール）

本プロトコールはキャピラリーサイクラー（例；LightCycler 1.x、LightCycler 2.0）で QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit を使用するためのものです。他のリアルタイム用サーマルサイクラー（LightCycler 480 を含む）上で QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit を用いて 1 ステップ RT-PCR を行なう場合には、21 ページのプロトコールに従ってください。

実験を始める前の重要事項

- 逆転写反応後、RT-PCR の PCR ステップは **まず 95℃ で 15 分のインキュベーションを行なって**、HotStarTaq DNA Polymerase（2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix に含まれている）を活性化させます。
- QuantiTect RT Mix による不完全な cDNA 合成やプライマーダイマーの形成を防ぐために、**すべての反応液は氷上でセットアップします。**
- データ解析に “fit-point” 法を使用する際には、毎回ランの解析ごとに noise band を調節します。
- オプションの UNG 処理（英語版 Handbook 54 ページ参照）を行なう際は、**熱感受性 UNG のみを使用してください。**

実験開始前の準備事項

- 初めて QuantiTect Primer Assay を使用される場合は、まず英語版 Handbook 6 ページ “Shipping and Storage” の説明に従って、使用前にこれを溶解します。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix**（-20℃ で保存の場合）、**10x QuantiTect Primer Assay**、RNA テンプレート、RNase フリー水を解凍する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect 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 18 に従って反応ミックスを調製する。

反応ミックス調製中は PCR キャピラリーを保冷してください。

注：Mg²⁺濃度の至適化は必要ありません。2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix 中に既に含まれている最終濃度 2.5 mM の Mg²⁺ 溶液で最高の結果が得られます。

表 18. キャピラリーサイクラーを用いた 1 ステップ RT-PCR の反応セットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix*	10 μ l	1x
10x QuantiTect Primer Assay	2 μ l	1x
QuantiTect RT Mix	0.2 μ l	0.2 μ l／反応
RNA テンプレート (ステップ 4 で添加)	適量	\leq 10 ng／反応
オプション：Uracil-N-glycosylase (UNG)、 熱感受性	適量	1～2 units／反応
RNase フリー水	適量	-
トータル容量	20 μl[†]	-

* MgCl₂ の最終濃度は 2.5 mM。

[†] 20 μ l キャピラリーの代わりに 100 μ l キャピラリーを使用する際は、master mix と primer assay、RT mix の溶液を 5 倍に調節してください。UNG は 1～2 unit、RNA テンプレートは 10 ng 以下のまま使用してください。

3. 反応ミックスを完全に混和し、PCR キャピラリーに適切な量を分注する。
キャピラリーは保冷してください。
4. RNA テンプレート (\leq 10 ng／反応) を反応ミックスの入った個々の PCR キャピラリーに添加する。
オプションの UNG 処理を行なう場合には、冷却した PCR キャピラリーにサンプルを少なくとも 10 分間放置する。
5. 表 19 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。
LightCycler のソフトウェアのバージョンが 3.5 より古い場合には、表 20 に記載されているように fluorescence gains をセットする。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まで、PCR キャピラリーを保冷する。
蛍光取り込みはエクステンション・ステップで行ないます。

表 19. キャピラリーサイクラーを用いた 1 ステップ RT-PCR のサイクリング条件

ステップ	時間	温度	ランプ	コメント
逆転写反応	20 分	50 °C	20 °C/秒	
PCR 初期活性化 ステップ	15 分	95 °C	20 °C/秒	本ステップで HotStarTaq DNA Polymerase の活性化、 逆転写反応の終了、 cDNA テンプレートの 変性を行なう
3 ステップサイクリング :				
変性	15 秒	94 °C	2 °C/秒	
アニーリング	20 秒	55 °C	2 °C/秒	
エクステンション	20 秒	72 °C	2 °C/秒	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35 ~ 40			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 発現量に依存

表 20. LightCycler 1.x 用の蛍光パラメーター

Fluorimeter gain	Value
Channel 1 (F1)	15
Channel 2 (F2)	10
Channel 3 (F3)	10

Display mode (LightCycler 1.x) : fluorescence channel 1/1 (F1/1)

LightCycler ソフトウェアバージョン 3.5 またはそれ以降のものは fluorescence channels 用の fluorimeter gain が自動的に調節されます。ユーザーによるセッティングの必要はありません。

Display mode (LightCycler 2.0.x) : channel settings 530/610

6. PCRキャピラリー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。

LightCycler 1.xおよび2.0を使用している場合、“seek sample”プロセス中の温度が50℃に設定されていることを確認してください。

オプション： RT-PCR産物の同定と特異性の確認は、融解曲線解析を行なうことにより可能です。溶解曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトウェアに搭載されている解析ステップです。メーカーの説明書に従ってください。

注： RT-PCR産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiTect SYBR Green RT-PCR試薬を用いて得られた T_m 値は、他の試薬によって得られた値と異なる可能性があります。

トラブルシューティングガイド

コメント

PCR産物がない、PCR産物の検出が遅れる、プライマーダイマーのみを検出

- a) PCR アニーリング時間が短すぎる
- Rotor-Gene サイ클ー用高速プロトコール (3ページと15ページ) :** アニーリング/エクステンションを組み合わせた時間は10秒に設定していることを確認する。
- 高速プロトコール (6ページと18ページ) :** アニーリング/エクステンションを組み合わせた時間は30秒に設定していることを確認する。
- 標準プロトコール (9ページと21ページ) :** アニーリング時間は30秒に設定していることを確認する。
- キャピラリーサイ클ー用標準プロトコール (12ページと24ページ) :** アニーリング時間は20秒に設定していることを確認する。
- b) エクステンション時間が短い
- Rotor-Gene サイ클ー用高速プロトコール (3ページと15ページ) :** アニーリング/エクステンションを組み合わせた時間は10秒に設定していることを確認する。
- 高速プロトコール (6ページと18ページ) :** アニーリング/エクステンションを組み合わせた時間は30秒に設定していることを確認する。
- 標準プロトコール (9ページと21ページ) :** エクステンション時間は30秒に設定していることを確認する。Applied Biosystems 7300や7500ではエクステンション時間を34秒にする。
- キャピラリーサイ클ー用標準プロトコール (12ページと24ページ) :** エクステンション時間は20秒に設定していることを確認する。
- c) ピペッティングエラーまたは試薬の入れ忘れ
- プライマーやRNAテンプレートを含んだ試薬の濃度や保存条件をチェックする。RT-PCRをやり直す。

コメント

- d) Hot-start DNA polymerase が活性化されていない
- Rotor-Gene サイ클ラー用高速プロトコール (3 ページと 15 ページ)** : サイクリングプログラムの最初に HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase を活性化 (95 °C で 5 分間) していることを確認。
- 高速プロトコール (6 ページと 18 ページ)** : サイクリングプログラムの最初に HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase を活性化 (95 °C で 5 分間) していることを確認。
- 標準プロトコール (9、12、21、24 ページ)** : サイクリングプログラムの最初に HotStarTaq DNA Polymerase を活性化 (95 °C で 15 分間) していることを確認。
- e) HotStarTaq DNA Polymerase 活性化が早すぎる (1 ステップ RT-PCR プロトコール)
- Rotor-Gene サイ클ラー用高速プロトコール (15 ページ)** : HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase の活性化前に逆転写反応 (50 °C で 10 分) が完了していることを確認。
- 高速プロトコール (18 ページ)** : HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase の活性化前に逆転写反応 (50 °C で 10 分) が完了していることを確認。
- 標準プロトコール (21 ページ)** : HotStarTaq DNA Polymerase の活性化前に逆転写反応 (50 °C で 30 分) が完了していることを確認。SmartCycler システムでは逆転写反応を 50 °C、20 分間で行なうことが可能。
- キャピラリーサイ클ラー用標準プロトコール (24 ページ)** : HotStarTaq DNA Polymerase の活性化前に逆転写反応 (50 °C で 20 分) が完了していることを確認。
- f) 逆転写反応の温度が正確でない (1 ステップ RT-PCR プロトコール)
- Rotor-Gene サイ클ラー用高速プロトコール (15 ページ)** : 逆転写反応は 55 °C を推奨する。
- 高速および標準プロトコール (18 ページと 21 ページ)** : 逆転写反応は 50 °C を推奨する。

コメント

- g) RT Mixの量が適切でない (1ステップRT-PCR プロトコール) **Rotor-Gene サイ클ー用高速プロトコール (15ページ)** : 反応液 25 μ l 当たり 0.25 μ l の Rotor-Gene RT Mix を使用していることを確認。
高速プロトコール (18ページ) : 利用しているサイクラーに特化した QuantiFast RT Mix 量を使用しているか確認する (19ページ、表 14)。
標準プロトコール (21ページ) : 反応液 50 μ l 当たり 0.5 μ l の QuantiTect RT Mix を使用していることを確認。SmartCycler システムでは、25 μ l の反応液当たり 0.25 μ l の QuantiTect RT Mix を使用していることを確認。
キャピラリーサイクラー用標準プロトコール (24ページ) : 20 μ l の反応液当たり 0.2 μ l の QuantiTect RT Mix を使用していることを確認。
- h) RT Mix と 2x RT-PCR Master Mix の割合が正しくない (1ステップRT-PCR プロトコール) RT Mix と 2x RT-PCR Master Mix の比率は常に 1 : 50 でなければならない (例えば 0.1 μ l の RT Mix に対して 5 μ l の 2x RT-PCR Master Mix)。
- i) ターゲット遺伝子が目的の細胞株や組織で発現していない 目的の遺伝子が実験中の細胞株や組織で発現するかどうかを調べる。まず www.ncbi.nlm.nih.gov で “UniGene” データベースを選び、遺伝子名を入れて “Go” をクリックする。遺伝子のリストが表示される。適切な遺伝子をクリックして、次のページに表示される “Expression Profile” をクリックすると様々な組織での遺伝子発現を確認できる。
- j) RNA に問題がある RNA の濃度、分解を受けていないこと、純度、および保存条件をチェックする (英語版 Handbook 48 ページ、Appendix A 参照)。必要な場合には、RNA のストック溶液を新しく段階的に希釈する。新しい希釈液を用いて RT-PCR を繰り返す。
- k) RNA が不十分 可能なら RT-PCR で使用する RNA の量を増やす。
- l) サイクル数が少ない サイクル数を増やす。

コメント

- m) PCR アニーリング温度が高すぎる **Rotor-Gene サイ클ラー用高速プロトコール (3 ページと 15 ページ)** : 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を 60℃で行なったかを確認。
高速プロトコール (6 ページと 18 ページ) : 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を 60℃で行なったかを確認。
標準プロトコール (9、12、21、24 ページ) : アニーリング温度は 55℃に設定していることを確認。
- n) 検出の設定がない サイクリングプログラムで蛍光検出が設定されているかをチェックする。
- o) 検出ステップが間違っている **Rotor-Gene サイ클ラー用高速プロトコール (3 ページと 15 ページ)** : 各 PCR サイクルのアニーリング/エクステンションを組み合わせたステップ中に蛍光検出が行なわれていることを確認する。
高速プロトコール (6 ページと 18 ページ) : 各 PCR サイクルのアニーリング/エクステンションを組み合わせたステップ中に蛍光検出が行なわれていることを確認する。
標準プロトコール (9、12、21、24 ページ) : 各 PCR サイクルのエクステンションステップで蛍光検出が行なわれたか確認する。
- p) 凍結/融解サイクルを繰り返したために QuantiTect Primer Assay が分解 変性ポリアクリルアミドゲルで QuantiTect Primer Assay 分解の可能性をチェックする。詳細に関しては www.qiagen.com/literature/protocols/pdf/PCR03.pdf でプロトコールを参照。20 µl の溶解した QuantiTect Primer Assay 使用を推奨。

Applied Biosystems、Bio-Rad、Corbett/QIAGEN、Stratagene システムのみ :

- q) 間違った検出チャンネル/フィルターを選択 正しい検出チャンネルが設定されているか、または SYBR Green I に正しいフィルターを選択しているかを確認する。

Applied Biosystems 7300 と 7500 のみ :

- r) QuantiTect Kit を用いた時に増幅シグナルが自動検出されない デフォルトの "Manual Ct" threshold 値 0.2 より低い値 (例 ; 0.02) に調節して再解析する。

LightCycler 1.xのみ：

- s) 選択した fluorescence gain が低すぎる 3.5 より以前のソフトウェアバージョンを用いている場合には、channel 1 の fluorescence gain を “15” にセットしていることを確認する。

融解温度解析でピークが複数ある／RT-PCR 産物が複数ある

- a) 室温で反応をセットアップした (1 ステップ RT-PCR プロトコール) 冷却した反応容器の中に RT-PCR をセットして、非特異的なプライマーアニーリングからの cDNA 合成が起きないようにする。
- b) プライマー濃度が高すぎる 英語版 Handbook 6 ページ、Table 1 で推奨されている容量以下の TE, pH 8.0 で 10x QuantiTect Primer Assay を溶解した。
- c) 逆転写反応のスタート条件が適切でない (1 ステップ RT-PCR プロトコール) リアルタイム用サーマルサイクラーにサンプルをセットし、直ちに RT-PCR プログラムを開始したかを確認する。
- d) Mg²⁺濃度が最適でない 2x PCR Master Mix あるいは 2x RT-PCR Master Mix に既に添加済みの最終濃度 Mg²⁺ を変更しない。
- e) PCR アニーリング温度が低すぎる **Rotor-Gene サイクラー用高速プロトコール (3 ページと 15 ページ)：**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を 60℃ で行なったかを確認。
高速プロトコール (6 ページと 18 ページ)：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を 60℃ で行なったかを確認。
標準プロトコール (9、12、21、24 ページ)：アニーリング温度は 55℃ で行なったかを確認。
- f) ゲノム DNA のコンタミ RNA サンプルを DNase I で前処理する。QIAGEN RNase-Free DNase Set を推奨 (英語版 Handbook 60 ページの “ordering information” 参照)。
2 ステップ、リアルタイム RT-PCR を行なう場合、ゲノム DNA 除去を含む QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて cDNA 合成する。
- g) 逆転写反応の温度が低すぎる 逆転写反応の温度は Rotor-Gene Kit では 55℃ を推奨。QuantiFast および QuantiTect Kit では 50℃ を推奨。満足する結果が得られない場合には反応温度を 55℃ まで上げることが可能。

コメント

- h) 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。詳細は www.qiagen.com/literature/protocols/pdf/PCRO3.pdf でプロトコルを参照。20 μ l の溶解した QuantiTect Primer Assay 使用を推奨。

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 2ステップRT-PCRでは100 ng以上のcDNA、1ステップRT-PCRでは10 ng以上のRNAを使用しない。
- b) テンプレート量が少すぎる 可能ならテンプレート核酸の量を増やす。
- c) RT Mixの量が適切でない (1ステップRT-PCRプロトコル) **Rotor-Gene サイ클ー用高速プロトコル (15ページ)** : 25 μ l の反応液当たり0.25 μ l の Rotor-Gene RT Mixを使用していることを確認。

高速プロトコル (18ページ) : 利用しているサイクラーに特化した QuantiFast RT Mix量を使用しているか確認する (19ページ、表14)。

標準プロトコル (21ページ) : 50 μ l の反応液当たり0.5 μ l の QuantiTect RT Mixを使用していることを確認。SmartCycler システムでは、25 μ l の反応液当たり0.25 μ l の QuantiTect RT Mixを使用していることを確認。

キャピラリーサイクラー用標準プロトコル (24ページ) : 20 μ l の反応液当たり0.2 μ l の QuantiTect RT Mixを使用していることを確認。

- d) アッセイ溶解後、QuantiTect Primer Assays Plate のスピンドウンを行っていない プレート中の QuantiTect Primer Assays を溶解後、ウェルの底にアッセイを回収するためにプレートを必ずスピンドウンする。詳細は、英語版 Handbook 6 ページの “Shipping and Storage” を参照する。

LightCycler 1.x および 2.0 のみ :

- e) QuantiTect Kit を用いた時のランプ設定が不正確 すべてのサイクリングステップでランプを 2 $^{\circ}$ C / 秒に設定する。

コメント

“No Template” コントロールで強い蛍光強度

- a) 試薬のコンタミ 反応に使用した試薬を捨てて、新しい試薬でもう一度繰り返す。
- b) 反応セットアップ中にコンタミ 適切な対応策を講じる（例えばフィルターチップを使用）。

QuantiTect SYBR Green Kitのみ：測定済み反応液からのキャリーオーバーを防ぐために uracil-N-glycosylase を使用する。1ステップRT-PCRでは熱感受性 uracil-N-glycosylaseのみを使用する。

“No RT” コントロールの反応液で強い蛍光強度

- RNA 調製中にゲノム DNAがコンタミ RNAサンプルをDNaseで分解する。
2ステップ、リアルタイムRT-PCRを行なう場合、ゲノムDNA除去処理を含む QuantiTect Reverse Transcription Kitを用いてcDNA合成する。

蛍光強度がバラつく

- a) アッセイ溶解後、QuantiTect Primer Assays Plateのスピンダウンを行なっていない プレート中のQuantiTect Primer Assaysを溶解後、ウェルの底にアッセイを回収するためにプレートを必ずスピンドウンする。詳細は、英語版 Handbook 6ページの“Shipping and Storage”を参照する。
- b) リアルタイム用サーマルサイクラーのコンタミ 使用説明書に従って、リアルタイム用サーマルサイクラーのコンタミを除去する。
- c) リアルタイム用サーマルサイクラーの補正ができていない 使用説明書に従って、リアルタイム用サーマルサイクラーのキャリブレーションを再度行なう。

Applied Biosystems、Bio-Rad、Stratagene システムのみ：

- d) 高濃度のテンプレートで曲線が波打つ ベースラインを計算するために使用したサイクル数を減らす。

コメント

LightCycler 1.x および 2.0 のみ :

- e) 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。
- f) 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 カローセルに押し込まれていることを確認する。
- g) Detection channel が間違っている
LightCycler 1.x : Channel 1 を選んだことを確認する。
LightCycler 2.0 : Channel setting 530 を選んだことを確認する。

ランが開始しない (Bio-Rad® iQ システムの場合のみ) :

- External Well Factor の測定が必要とされる
セットしていた反応実験プレートをBio-Rad iQ システムから取り外し、external well factor plate と置き換え、well factor を測定する (英語版 Handbook 55 ページ、Appendix E 参照)。Well factor を測定後、実験反応プレートをBio-Rad iQ システムに戻し、ランを開始する。
1 ステップ RT-PCR を行なう場合は、well factor の測定の間は実験反応プレートを氷上に置いておく。これにより不完全長な cDNA 合成を防ぐことができる。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, QuantiFast™, QuantiTect® (QIAGEN Group); Rotor-Gene™ (Corbett Research); ABI PRISM™, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); LightCycler®, Roche® (Roche Group); Bio-Rad®, iCycler iQ® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Eppendorf® (Eppendorf AG); Cepheid®, SmartCycler® (Cepheid); Stratagene® (Stratagene); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

NOTICE TO PURCHASER: DISCLAIMER OF LICENSE

This product (QuantiTect Primer Assays) is compatible for use in real-time PCR methodologies, including 5' nuclease processes and dsDNA-binding dye processes claimed in patents owned by Roche Molecular Systems, Inc., F. Hoffmann-La Roche Ltd, and Applied Biosystems Corporation. No right to perform any of these patented processes is conveyed, expressly, by implication or by estoppel to the purchaser by the purchase of this product. A license to use these patented processes for the purchaser's own internal research accompanies the purchase of certain reagents of Applied Biosystems and other licensed suppliers, or is available from Applied Biosystems. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

The purchase price of this product (Rotor-Gene SYBR Green Kits, QuantiFast SYBR Green Kits, and QuantiTect SYBR Green Kits) includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patents Nos. 5,994,056 and 6,171,785 and corresponding patent claims outside the United States, owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd (Roche), to use only this amount of the product for dsDNA-binding dye processes covered by said patents solely for the purchaser's own internal research. This product is also a Licensed dsDNA Dye Binding Kit for use with service sublicensees available from Applied Biosystems. No right under any other patent claims (such as apparatus or system claims in U.S. Patent No. 6,814,934) and no right to use this product for any other purpose or for commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby granted expressly, by implication or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

The purchase price of this product (Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit, QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit, and QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit) includes a limited, non-transferable license under U.S. Patents Nos. 5,407,800, 5,322,770, 5,310,652 and corresponding patent claims outside the United States, owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd (Roche), to use only this amount of product solely for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claims (such as apparatus or system claims) and no right to use this product for any other purpose or for commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby granted expressly, by implication or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE.

This product (QuantiTect SYBR Green Kits) or its use is covered by at least one claim of U.S. Pat. Nos. 5,035,996; 5,945,313; 6,287,823; or 6,518,026, owned by Invitrogen Corporation. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product, (b) its components, or (c) materials made by the employment of this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made by the employment of this product or its components for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity for which a party receives or is due to receive consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. The buyer cannot use this product or its components or materials made using this product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes. Further information on purchasing licenses under the above patents may be obtained by contacting the Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008. Email: outlicensing@invitrogen.com.

The purchase of this product (Rotor-Gene SYBR Green Kits, QuantiFast SYBR Green Kits, and QuantiTect SYBR Green Kits) includes a limited, non-transferable license under U.S. Patent No. 5,871,908 and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics applications with authorized reagents with regard to Melting Curve Analysis. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, under any other patent or patent claims owned by Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party.

The QIAGEN silver logo is exclusively licensed to Corbett Research.

NOTICE TO PURCHASER:

The purchase of this product (Rotor-Gene Q, Rotor-Disc) includes a limited, non-transferable license to certain patents (see details below) surrounding rapid polymerase chain reaction (PCR) methods and instrumentation, the use of SYBR Green I in PCR reactions, melting curve analysis, analysis methods of DNA melting data, specifically high resolution melting (HRM) and others.

The purchase of this product (Rotor-Gene Q, Rotor-Disc) includes a limited, non-transferable license to one or more of US Patents Nos 6,787,338; 7,238,321; 7,081,226; 6,174,670; 6,245,514; 6,569,627; 6,303,305; 6,503,720; 5,871,908; 6,691,041; 7,387,887; and U.S. Patent Applications Nos. 2003-0224434 and 2006-0019253 and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., and/or Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics applications. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, for any reagent or kit, or under any other patent or patent claims owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., and/or Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party. For information on purchasing licenses for in-vitro diagnostics applications or reagents, contact Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, USA.

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。

© 2005–2009 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

