

QIAGEN® Multiplex PCR *Plus* プロトコールとトラブルシューティング

至適化の必要なしに迅速かつ効率的な
マルチプレックス PCR — 高度なアプリケーション用

目次	ページ
プロトコール	
1.5 kb 以下のフラグメントのマルチプレックス PCR	2
500 bp 以下のフラグメントのマルチプレックス PCR	7
トラブルシューティング	12



プロトコール：1.5 kb 以下のフラグメントのマルチプレックス PCR

本プロトコールは 1.5 kb 以下のターゲットを増幅するためにデザインされています。増幅産物の解析はアガロースゲル、QIAxcel™ Advanced System、Agilent® 2100 Bioanalyzer により行ないます。1.5 kb を超える PCR 産物の場合には英語版 Handbook 46 ページ、Appendix E を参照してください。本プロトコールは、全ての標準的なマルチプレックス PCR アプリケーションに至適化されています。PCR 産物が 10 種類を超える場合あるいは微量のテンプレートを用いてマルチプレックス反応を行なう場合など、さらに高度なマルチプレックス PCR アプリケーションに関しては、英語版 Handbook 46 ページ、Appendix E をご覧ください。

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開始します。
- 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 (0.2 μM) にします。
- 最適な結果を得るためには、 T_m が 68°C 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 A をご覧ください。
- 英語版 Handbook 13 ページの Table 2 の記載に従って 10x プライマーミックスを調製します。
- オプション：GC リッチ (>65%) なテンプレートや高度な二次構造を持つテンプレートの増幅には Q-Solution® をご利用いただけます。Q-Solution をご使用になる場合は英語版 Handbook 9 ページをご覧ください。
- 初めて Q-Solution を使用するマルチプレックス PCR アッセイの場合には、増幅反応は Q-Solution 使用/未使用で並行して行ないます。Q-Solution の最終濃度は 0.5x にします。
- 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。
- HotStarTaq® Plus DNA Polymerase を活性化するため、PCR の最初に必ず 95°C で 5 分間の活性化ステップを行なってください (このプロトコールのステップ 5 を参照)。

操作手順

1. **2x Multiplex PCR Master Mix** (-20°Cで保存している場合)、**テンプレート DNA**、**RNase フリー水**、**Q-Solution** (オプション)、**CoralLoad Dye** (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和する。

塩濃度を均一にするため、使用前に溶液を十分に混和することが重要です。全てのプライマーが含まれるプライマーミックスを作ることで、実験ごとに各プライマーをピペッティングする必要がなく、ピペッティング回数を抑え、実験結果の再現性が増加します (プライマーミックスの調製は英語版 Handbook 13 ページの Table 2 を参照)。

2. **表 6 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 50 μ l 未満の場合、表 6 に記載されているように、Multiplex PCR Master Mix 量とそれ以外の反応成分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 Multiplex PCR Master Mix 中に既に含有されている 3 mM の Mg^{2+} 濃度で実験を始めることをお勧めします。

表 6. 2x Multiplex PCR Master Mix を用いた反応成分 (オプションで Q-Solution および CoralLoad Dye を使用)

成分	容量/反応	最終濃度
反応ミックス 2x Multiplex PCR Master Mix*	25 μ l	1x
10x プライマーミックス、 各プライマーは 2 μ M (英語版 Hand- book 13 ページの Table 2 参照)	5 μ l	0.2 μ M [†]
オプション: Q-Solution、5x	5 μ l	0.5x
オプション: CoralLoad Dye、10x [‡]	5 μ l	1x CoralLoad Dye
RNase フリー水	適量	-
テンプレート DNA テンプレート DNA、ステップ 4 で 添加	適量	\leq 300 ng DNA ; 100 ng の DNA で開始
トータル容量	50 μl[§]	

* $MgCl_2$ の最終濃度は 3 mM。

[†] 0.2 μ M 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 μ M) を使うことで増幅が改善されることがある。

[‡] 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 を使用しない。

[§] 50 μ l 未満の容量では、2x Multiplex PCR Master Mix 量とそれ以外の反応成分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て、PCR チューブあるいはプレートに適切な量を分注する。

例えばピペットで数回吸排出することにより反応ミックスを慎重に混和します。ホットスタート PCR なので、反応のセットアップ中にサンプルを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。実際の量は表 6 を参照する。

5. a) 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。

b) PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、表 7 のサイクリングプログラムをスタートする。

HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化するため、PCR の最初に必ず 95°C で 5 分間の活性化ステップを行なってください。

表 7. 1.5 kb 以下のフラグメントのマルチプレックス PCR 用に至適化済みのサイクリングプロトコール（オプションで Q-Solution および CoralLoad Dye を使用）

			コメント
最初の活性化ステップ	5 分	95°C	HotStarTaq Plus DNA Polymerase はこのステップで活性化される
3 ステップサイクリング			
変性：	30 秒	95°C	
アニーリング：	90 秒	60°C	殆どの PCR システムでアニーリング温度は 60°C が適している。プライマーミックスの一番低い T_m^* が 60°C 未満の場合には、アニーリング温度を 57°C から始める
エクステンション：	90 秒	72°C	1.5 kb 以下のターゲットに最適。ターゲットが 1.5 kb より長い場合には英語版 Handbook 46 ページ、Appendix E を参照
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（表 8 の推奨事項を参照）。
最終エクステンション	10 分	68°C	

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

表 8. 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 43 ページの Appendix C、Table 15 を参照。

6. 増幅後、サンプルは 2 ~ 8℃で一晩、あるいは -20℃で長期保存が可能。
7. サンプルをアガロースゲル、QIAxcel Advanced System あるいは Agilent 2100 Bioanalyzer のいずれかで解析する（それぞれの推奨事項に関しては英語版 Handbook 14、15 ページの Tables 3、4、5 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。

プロトコール：500 bp 以下のフラグメントのマルチプレックス PCR

本プロトコールは 0.5 kb 以下のターゲットを増幅するためにデザインされています。続く解析はキャピラリーシークエンサー、アガロースゲル、QIAxcel Advanced System、Agilent 2100 Bioanalyzer により行ないます。本プロトコールは、全ての標準的なマルチプレックス PCR アプリケーションに至適化されています。PCR 産物が 10 種類を超える場合あるいは微量のテンプレートをを用いてマルチプレックス反応を行なう場合など、さらに高度なマルチプレックス PCR アプリケーションに関しては、英語版 Handbook 46 ページ、Appendix E をご覧ください。

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開始します。
- 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 (0.2 μM) にします。
- 最適な結果を得るためには、 T_m が 68°C 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 A をご覧ください。
- 英語版 Handbook 13 ページの Table 2 の記載に従って 10x プライマーミックスを調製します。
- オプション：GC リッチ (>65%) なテンプレートや高度な二次構造を持つテンプレートの増幅には Q-Solution をご利用いただけます。Q-Solution をご利用になる場合は英語版 Handbook 9 ページで詳細をご覧ください。
- 初めて Q-Solution を使用するマルチプレックス PCR アッセイの場合には、増幅反応は Q-Solution 使用/未使用で並行して行ないます。Q-Solution の最終濃度は 0.5x にします。
- オプション：Coraload 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。Coraload 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。
- HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化するため、PCR の最初に必ず 95°C で 5 分間の活性化ステップを行なってください。
- マイクロサテライトの増幅には専用の Type-it™ Microsatellite PCR Kit (cat. no. 206243) を推奨します。

操作手順

1. **2x 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**、**Q-Solution** (オプション)、**CoralLoad Dye** (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和する。

塩濃度を均一にするため、使用前に溶液を十分に混和することが重要です。全てのプライマーが含まれるプライマーミックスを作ることで、実験ごとに各プライマーをピペッティングする必要がなく、ピペッティング回数を抑え、実験結果の再現性が増加します (プライマーミックスの調製は英語版 Handbook 13 ページの Table 2 を参照)。

2. **表 9 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 50 μ l 未満の場合、表 9 に記載されているように、Multiplex PCR Master Mix 量とそれ以外の反応成分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 Multiplex PCR Master Mix 中に既に含有されている 3 mM の Mg^{2+} 濃度で実験を始めることをお勧めします。

表 9. 2x Multiplex PCR Master Mix を用いた反応成分（オプションで Q-Solution および CoralLoad Dye を使用）

成分	容量／反応	最終濃度
反応ミックス 2x Multiplex PCR Master Mix*	25 µl	1x
10x プライマーミックス、 各プライマーは 2 µM（英語版 Hand- book 13 ページの Table 2 参照）	5 µl	0.2 µM [†]
オプション：Q-Solution、5x	5 µl	0.5x
オプション：CoralLoad Dye、10x [‡]	5 µl	1x CoralLoad Dye
RNase フリー水	適量	-
テンプレート DNA テンプレート DNA、ステップ 4 で 添加	適量	≤ 300 ng DNA ; 100 ng の DNA で開始
トータル容量	50 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）を使うことで増幅が改善されることがある。

[‡] 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 を使用しない。

[§] 50 µl 未満の容量では、2x Multiplex PCR Master Mix 量とそれ以外の反応成分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て、PCR チューブあるいはプレートに適切な量を分注する。

例えばピペットで数回吸排出することにより反応ミックスを慎重に混和します。ホットスタート PCR なので、反応のセットアップ中にサンプルを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。実際の量は表 9 を参照する。

5. a) 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。

b) PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、次ページの表 10 のサイクリングプログラムをスタートする。

HofStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化するため、PCR の最初に必ず 95°C で 5 分間の活性化ステップを行なってください。

表 10. 500 bp までのフラグメント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 (オプションで Q-Solution および CoralLoad Dye を使用)

			コメント
最初の活性化ステップ	5 分	95°C	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase はこのステップで活性化される
3 ステップサイクリング			
変性:	30 秒	95°C	
アニーリング:	90 秒	60°C	殆どの PCR システムでアニーリング温度は 60°C が適している。プライマーミックスの一番低い T_m^* が 60°C 未満の場合には、アニーリング温度を 57°C から始める
エクステンション:	30 秒	72°C	
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 (表 11 の推奨事項を参照)
最終エクステンション	10 分	68°C	キャピラリー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は必ず 60°C、30 分間行なう [†]

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

[†] HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase により、キャピラリー/ゲルを用いた DNA シークエンサーによる高解像度解析に必要な A のオーバーハングの付加を行なう。

表 11. 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 43 ページの Appendix B、Table 15 を参照。

[†] 蛍光標識プライマーおよびキャピラリーシークエンシング装置を用いる場合は、一般に 5 サイクル減らすことを推奨。

6. 増幅後、サンプルは 2 ~ 8℃で一晩、あるいは -20℃で長期保存が可能です。
7. サンプルをキャピラリーシークエンサー、アガロースゲル、QIAxcel Advanced System あるいは Agilent 2100 Bioanalyzer のいずれかで解析する（それぞれの推奨事項は英語版 Handbook 14、15 ページの Tables 3、4、5 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

コメント

PCR 産物が少ないあるいはない

- 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 5 に記述されている HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase 活性化ステップ (95°C、5 分) が含まれていることを確認する (4、9 ページ)。
- b) ピペッティングエラー、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 0.2 μM を使用する。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 分間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、弱いシグナルを生成するプライマーのみ、プライマー濃度を 1 ~ 2 μM にして、エクステンション時間を 3 分間にすると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英語版 Handbook 13 ページの Table 2 を参照。
- d) サイクル数が不十分
PCR サイクル数を増やす。表 8 (5 ページ) および表 11 (10 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 (5 ページの表 7 および 10 ページの表 10 を参照)。90 秒のアニーリング時間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 46 ページ、Appendix E を参照)。

コメント

- f) PCR サイクリング条件が最適ではない 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。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。キャピラリーシーケ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、プライマーストック溶液から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。
- g) アニール温度が高い 英語 Handbook 39 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 46 ページ、Appendix E 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 を再度行なう。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 A 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 50 µl あたり最高 300 ng まで、シーケンサーを利用する検出では反応液 50 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 42 ページ、Appendix B 参照）。必要に応じて、ストック溶液から核酸テンプレート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 を再度行なう。
- m) PCR 産物が長すぎる 至適化されたプロトコールでは 1.5 kb 以下のターゲットの増幅が可能。1.5 kb を越す PCR 産物の場合には英語版 Handbook 46 ページ、Appendix E を参照。
- n) 感度が十分に高くない アッセイが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るかチェックする。
- 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（5 ページの表 7 および 10 ページの表 10）。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℃ で 30 分間行なう。必要に応じて 45 分まで延長する。10 種類を超える PCR 産物あるいは 1.5 kb を越える PCR 産物を、アガロースゲル、QIAxcel Advanced System、Agilent 2100 Bioanalyzer のいずれかで検出する際には、68℃ 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。

すべ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ろうじて検出できる

- 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。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から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。

* 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。多数のターゲット（10 種類以上）を同時に増幅後シークエンサーで検出を行なう場合は、弱いシグナルを生成するプライマーのみ、プライマー濃度を 1 ~ 2 μM にして、エクステンション時間を 3 分間にするると結果が改善されることがある。QIAxcel Advanced 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 の精度に影響するため、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 39 ページ、Appendix B 参照）。
- c) 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（5 ページの表 7 および 10 ページの表 10 を参照）。90 秒のアニーリング時間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 46 ページ、Appendix E 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（5 ページの表 7 および 10 ページの表 10）。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。10 種類を超える PCR 産物あるいは 1.5 kb を越える PCR 産物を、アガロースゲル、QIAxcel Advanced System、Agilent 2100 Bioanalyzer のいずれかで検出する際には、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。
- e) アニーリング温度が高い
- 正しいサイクリング条件を使用したかチェックする（5 ページの表 7 および 10 ページの表 10 を参照）。90 秒のアニーリング時間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 46 ページ、Appendix E 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 同じサイクリング条件で、0.5x Q-Solution を用いてマルチプレックス PCR を再度行なう。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) 感度が十分に高くない アッセイが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。

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 (5 ページの表 7 および 10 ページの表 10 を参照)。90 秒のアニーリング時間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 46 ページ、Appendix E 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 サイクルずつ減らし、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 英語版 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°C 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 46 ページ、Appendix E を参照)。
- d) Mg^{2+} 濃度が最適でない 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。多数のターゲット（10 種類以上）を同時に増幅後シークエンサーで検出を行なう場合は、弱いシグナルを生成するプライマーのみ、プライマー濃度を 1 ~ 2 μM にして、エクステンション時間を 3 分間にすると結果が改善されることがある。QIAxcel Advanced 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 の精度に影響するため、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 B 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 A を参照する。
- g) 複数の PCR 産物を生成するプライマーがある 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が近い距離でテンプレートに結合する。その様な場合、外側に結合しているプライマー同士がペアになり、より大きな産物を付加的に増幅することがある。
- 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機能性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から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。
- i) 偽遺伝子の増幅 プライマーが偽遺伝子シークエンスにアニーリングし、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 A 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
同じサイクリング条件で、0.5x Q-Solution を用いてマルチプレックス PCR を再度行なう。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*）

スミアあるいは非特異的な PCR 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 44 ページ、Appendix B、Table 16 を参照）。少量の DNA（例えば 50 μ l 反応液あたり 300 ng 未満）でマルチプレックス PCR を再度行なう。
- 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（5 ページの表 7 および 10 ページの表 10）。10 種類を超える PCR 産物あるいは 1.5 kb を越えるマルチプレックス PCR 産物を、未変性条件下で検出する際には、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。
- 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°C、15 分間にする。10 種類を超える PCR 産物、あるいは 1.5 kb を越える 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) 2 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ために、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。

キャピラリーあるいはゲルを使用するシークエ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 上では相対蛍光ユニットが 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。この影響を回避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。水ではなく脱イオンホルムアミドを使用すると良い結果が得られる。
- 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 (5 ページの表 7 および 10 ページの表 10)。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 同量の 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。

マルチプレックス実験で検出されない増幅産物がある

- 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規定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。

コメント

- b) 様々な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。アニーリング時間を 90 秒から 3 分間に延長することにより、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 種類以下の増幅産物では 1 μM 、10 種類を越える増幅残物では 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 39 ページ、Appendix B に記載の推奨事項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。

ピークが弱いあるいはアレルピークがない

- 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は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 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満でなければならない。

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
- シークエンシング装置にサンプルを注入する前の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®, QIAxcel™, CoralLoad®, DNeasy®, HotStarTaq®, Type-it™, Q-Solution® (QIAGEN Group); ABI™ (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.).

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。

© 2011 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

