

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

どのサーマルサイクラーでも迅速かつ特異的なPCR

目次	ページ
プロトコール	
QIAGEN Fast Cycling PCR Kit を用いた PCR	2
QIAGEN Fast Cycling PCR Kit と Q-Solution を用いた PCR	6
トラブルシューティング	11



プロトコール： QIAGEN Fast Cycling PCR Kit を用いた PCR

実験を始める前の重要事項

- QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix は 95 °C で 5 分間のホットスタート PCR 活性化ステップが必要です (本プロトコールのステップ 5 参照)。
- 変性ステップの温度は 96 °C に設定することを強く推奨します。この温度には、種々のサイマーサイクラー間の温度と時間の特性の相違が考慮されています。
- デフォルトのプライマー濃度は 0.5 μM (各プライマー) を推奨します。
- Eppendorf Mastercycler ep S を block mode で使用する際は、温度上昇が非常に速いので 98 °C、5 秒の変性ステップを使用します。
- 384 ウェル PCR プレートで PCR を行なう場合には、温度の上昇と下降を最適に行なうために、サーマルサイクラーのメーカーが推奨する PCR プレートを必ず使用してください。
- 60 °C より高い温度でのアニーリングは通常お勧めしません。蛍光標識プライマーを使用する際は、アニーリング温度を非修飾プライマーに比べて低く設定する必要があります。
- PCR 産物の精製 (例、QIAquick PCR Purification Kit あるいは MinElute PCR Purification Kit を使用) なしに、蛍光強度や吸光度の測定が必要なダウンストリーム・アプリケーションを行なう場合、CoralLoad™ Fast Cycling Dye の使用は、お勧めしません。

操作手順

1. QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix、プライマー溶液、核酸テンプレート、RNase フリー水、およびオプション使用の 10x CoralLoad Fast Cycling Dye を解凍する。
使用前にすべての溶液をよく混和します。
2. QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix を簡単にボルテックスして、表 1 に従って各 PCR チューブに 10 μl ずつ分注する。
塩濃度を均一にするために使用前に QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix を十分にミックスすることが重要です。
HotStarTaq Plus DNA Polymerase は室温で不活性なので、反応容器を氷上で保存する必要はありません。

表 1. QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix を用いた反応組成

成分	容量 / 反応	最終濃度
QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix	10 µl	HotStarTaq Plus DNA Polymerase、1x Fast Cycling Buffer、200 µM 各 dNTP、至適化済み Mg ²⁺ 濃度
オプション： 10x CoralLoad Fast Cycling Dye	2 µl	1x
希釈したプライマーミックス		
プライマー A	変更可	0.5 µM
プライマー B	変更可	0.5 µM
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 / 20 µl 反応液
トータル容量	20 µl*	-

* 20 µl 以上の反応容量を使用すると最適な温度勾配が妨害され、良好な結果が得られないことがあります。

- Master Mix の入った PCR チューブに適切な量を希釈したプライマーミックスを分注する。
- 個々の PCR チューブにテンプレート DNA (<300 ng / 20 µl 反応液) を添加する。

RT-PCR の場合には、逆転写反応溶液の一部を添加します。この溶液量は最終 PCR 溶液量の 10% を超えないようにします (英語版 Handbook 30 ページ、Appendix E 参照)。

5. メーカーの指示に従って表2に記載された条件をサーマルサイクラーにプログラムする。

注；加熱活性化のために95 で5分間インキュベートした後に各PCRを始めます。

一般的なPCRサイクリングプログラムを表2に掲載します。収量および特異性を最大にするには、新しいテンプレートあるいはプライマー・ペア毎に温度、サイクル時間を至適化する必要があります。

注；増幅するPCR産物の長さによりPCR時間を決めます。様々な長さの複数のPCR産物を増幅する際は、一番長いPCR産物用のプロトコール・パラメーターを選んでください。

表2. 最適なPCRサイクリング・プロトコール

			コメント
初期活性化ステップ：	5分	95	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase はこのヒーティングステップで活性化される。
3ステップのサイクリング			
変性：	5秒	96	注意；Eppendorf Mastercycler ep S を block mode で使用する際は、98 で変性を行なう。
アニーリング：	5秒	60 *	アニーリング温度は60 以下を推奨。プライマーのT _m より約5 低い温度を使用（英語版 Handbook 27ページ、Appendix B 参照）*
エクステンション：	3秒 / 100 bp	68	100 bp DNAあたり3秒のエクステンション時間を使用(例、500 bp のフラグメントは15秒、1 kb では30秒) [†]
サイクル数：	30 ~ 40		英語版 Handbook 29ページ、Appendix C 参照。
最終エクステンション：	1分	72	

* 既存のプライマー・テンプレートペアに関しては、すでに確立している最適なアニーリング温度を使用します。ほとんどのプライマー・テンプレートペアでアニーリング温度は60 が適していますが、これを超えないようにします。

[†] このエクステンション率は、ゲノムDNAのような複雑なテンプレートを増幅する際に、最高3.5 kbまでのフラグメントに使用できます。プラスミドDNAを用いる場合には、3.5 kb以上の長いフラグメント増幅が可能です。

6. サーマルサイクラーにPCRチューブをセットし、サイクリングプログラムをスタートする。

注；増幅後、サンプルは2～8 で一晩、-20 で長期間保存できます。

7. CoralLoad Fast Cycling Dye を用いた際は、PCR反応液を直接アガロースゲルにロードできる。ゲルローディング・バッファーおよびマーカー色素を添加する必要はない。

CoralLoad Fast Cycling Dye にはマーカー色素が入っています。色素の移動距離、アガロースゲルの濃度および泳動バッファーとの相関関係は表3を参照してください。

注；溶液の粘性が高いため、アガロースゲルのウェルにゆっくりと溶液をアプラインしてください。

注；CoralLoad Fast Cycling Dye は、次に行なうクローニングや制限酵素解析などの酵素反応を妨害しません。

表3. マーカー色素の移動距離

%TAE (TBE)		
アガロースゲル	赤色の色素	オレンジ色の色素
0.8	500 bp (270 bp)	~ 80 bp (<10 bp)
1.0	300 bp (220 bp)	~ 40 bp (<10 bp)
1.5	250 bp (120 bp)	~ 20 bp (<10 bp)
2.0	100 bp (110 bp)	<10 bp (<10 bp)
3.0	50 bp (100 bp)	<10 bp (<10 bp)

プロトコール： QIAGEN Fast Cycling PCR Kit と Q-Solution を用いた PCR

本プロトコールは PCR アッセイで Q-Solution を使用するために作製されました。Q-Solution は、DNA の変性環境を変え、スタンダードな条件では増幅されない PCR システムに有用です。Q-Solution を特定のプライマーとテンプレートの組み合わせに初めて使用する際には、常に Q-Solution 添加と未添加の反応を同時に行なってください。特定のプライマーとテンプレートの組み合わせに以前 DMSO のような他の PCR 添加物を使用していた場合にも、同様に実験することを推奨します。

Q-Solution を使用する場合、それぞれの PCR アッセイにより以下のような影響が観察されます：

- ケース A： Q-Solution によって以前には得られなかった産物が増幅可能になった。
- ケース B： Q-Solution はある種のプライマー・テンプレートシステムで PCR の特異性を高めた。
- ケース C： Q-Solution は PCR パフォーマンスに関与しなかった。
- ケース D： 以前は成功した増幅反応が Q-Solution により失敗したり、増幅効率が低下した。この場合、Q-Solution の添加が適切であったが、プライマー・テンプレートアニーリングを妨害している。従って Q-Solution を特定のプライマーとテンプレートの組み合わせに初めて使用する際には、常に Q-Solution 添加と未添加の反応を同時に行なう。

実験を始める前の重要事項

- HotStarTaq Plus DNA Polymerase は 95 で 5 分間の活性化ステップが必要です（本プロトコールのステップ 5 参照）。
- 変性ステップの温度は 96 に設定することを強く推奨します。この温度には、種々のサイマーサイクラー間の温度と時間の特性の相違が考慮されています。
- デフォルトのプライマー濃度は 0.5 μM （各プライマー）を推奨します。
- Eppendorf Mastercycler ep S を block mode で使用する際は、温度上昇が非常に速いので 98、5 秒の変性ステップを使用します。
- 384 ウェル PCR プレートで PCR を行なう場合には、温度の上昇と下降を最適に行なうために、サーマルサイクラーのメーカーが推奨する PCR プレートを必ず使用してください。
- 60 より高い温度でのアニーリングは通常お薦めしません。蛍光標識プライマーを使用する際は、アニーリング温度を非修飾プライマーに比べて低く設定する必要があります。

- PCR産物の精製(例、QIAquick PCR Purification KitまたはMinElute PCR Purification Kitを使用)なしに、蛍光強度や吸光度の測定が必要なダウンストリーム・アプリケーションを行なう場合、CoralLoad Fast Cycling Dyeの使用はお勧めしません。
- 初めてQ-Solutionを使用する場合には、Q-Solution添加 / 未添加の実験を並行して行ないます。

操作手順

1. QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix、プライマー溶液、核酸テンプレート、5x Q-Solution、RNaseフリー水、およびオプシオン使用の10x CoralLoad Fast Cycling Dyeを解凍する。
使用前にすべての溶液をよく混和します。
2. QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mixを簡単にボルテックスして、表4に従って各PCRチューブに10 µlずつ分注する。
塩濃度を均一にするために使用前にQIAGEN Fast Cycling PCR Master Mixを十分にミックスすることが重要です。
HotStarTaq Plus DNA Polymeraseは室温で不活性なので、反応容器を氷上で保存する必要はありません。
3. Master Mixの入ったPCRチューブに適切な量の希釈したプライマーミックスを分注する。
4. 個々のPCRチューブにテンプレートDNA (<300 ng / 20 µl反応液)を添加する。
RT-PCRの場合には、逆転写反応溶液の一部を添加します。この溶液量は最終PCR溶液量の10%を超えないようにします(英語版 Handbook 30ページ、Appendix E参照)。

表 4. QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix を用いた反応組成

成分	容量 / 反応	最終濃度
QIAGEN Fast Cycling PCR Master Mix	10 µl	HotStarTaq Plus DNA Polymerase、1x Fast Cycling Buffer、200 µM 各 dNTP、至適化済み Mg ²⁺ 濃度
5x Q-Solution	4 µl	1x
オプション： 10x CoralLoad Fast Cycling Dye	2 µl	1x
希釈したプライマーミックス		
プライマー A	変更可	0.5 µM
プライマー B	変更可	0.5 µM
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/20 µl 反応液
トータル容量	20 µl*	-

* 20 µl 以上の反応容量を使用すると最適な温度勾配が妨害され、良好な結果が得られないことがあります。

5. メーカーの指示に従って表 5 に記載された条件をサーマルサイクラーにプログラムする。

注；加熱活性化のために 95 °C で 5 分間インキュベートした後に各 PCR を始めます。

一般的な PCR サイクリングプログラムを表 5 に掲載します。収量および特異性を最大にするには、新しいテンプレートあるいはプライマー・ペア毎に温度、サイクル時間を至適化する必要があります。

注；増幅する PCR 産物の長さにより PCR 時間を決めます。様々な長さの複数の PCR 産物を増幅する際は、一番長い PCR 産物用のプロトコル・パラメーターを選んでください。

表5. 最適なPCRサイクリング・プロトコール

			コメント
初期活性化ステップ：	5分	95	HotStarTaq Plus DNA Polymerase はこのヒーティングステップで活性化される。
3ステップのサイクリング			
変性：	5秒	96	注意；Eppendorf Mastercycler ep S を block mode で使用する際は、98 で変性をおこなう。
アニーリング：	5秒	60 *	アニーリング温度は60 以下を推奨。プライマーの T_m より約5 低い温度を使用（英語版 Handbook 27ページ、Appendix B 参照）*
エクステンション：	3秒 / 100 bp	68	100 bp DNAあたり3秒のエクステンション時間を使用（例、500 bp のフラグメントは15秒、1 kb では30秒） [†]
サイクル数：	30 ~ 40		英語版 Handbook 29ページ、Appendix C 参照。
最終エクステンション：	1分	72	

* 既存のプライマー・テンプレートペアに関しては、すでに確立している最適なアニーリング温度を使用します。ほとんどのプライマー・テンプレートペアでアニーリング温度は60 が適していますが、これを超えないようにします。

[†] このエクステンション率は、ゲノムDNAのような複雑なテンプレートを増幅する際に、最高3.5 kbまでのフラグメントに使用できます。プラスミドDNAを用いるとより長いフラグメントが可能です。

6. サーマルサイクラーにPCRチューブをセットし、サイクリングプログラムをスタートする。

注；増幅後、サンプルは2 ~ 8 で一晩、-20 で長期間保存できます。

7. CoralLoad Fast Cycling Dye を用いた際は、PCR 反応液を直接アガロースゲルにロードできる。ゲルローディング・バッファーおよびマーカー色素を添加する必要はない。

CoralLoad Fast Cycling Dye にはマーカー色素が入っています。色素の移動距離、アガロースゲルの濃度および泳動バッファーとの相関関係は表6を参照してください。

注；溶液の粘性が高いため、アガロースゲルのウェルにゆっくりと溶液をアプ
ライしてください。

注；CoralLoad Fast Cycling Dye は、次に行なうクローニングや制限酵素解析な
どの酵素反応を妨害しません。

表6. マーカー色素の移動距離

%TAE (TBE) アガロースゲル	赤色の色素	オレンジ色の色素
0.8	500 bp (270 bp)	~ 80 bp (<10 bp)
1.0	300 bp (220 bp)	~ 40 bp (<10 bp)
1.5	250 bp (120 bp)	~ 20 bp (<10 bp)
2.0	100 bp (110 bp)	<10 bp (<10 bp)
3.0	50 bp (100 bp)	<10 bp (<10 bp)

トラブルシューティングガイド

コメント

増幅産物が皆無あるいは少ない

- | | |
|---|---|
| a) HotStarTaq Plus DNA Polymeraseが活性化されていない | 95 で5分間の初期活性化を行ないPCRを開始したかチェックする。 |
| b) 変性温度あるいは時間が正確でない | 96 、5秒間の変性時間を常に使用する。Eppendorf Mastercycler ep Sをblock modeで使用する際は、98 、5秒間で変性を行なう。 |
| c) プライマー濃度が最適でない、あるいはプライマーが分解している | 0.5 μMの各プライマーを使用。特に高感度なPCRを行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲルでプライマーが分解していないかをチェックする。* |
| d) PCRチューブあるいはプレートがサイクラーブロックに完全にフィットしていない | サーマルサイクラーのメーカーが推奨するPCRチューブあるいはプレートを必ず使用する。384ウェルPCRプレートでPCRを行なう際は特に重要。 |
| e) 修飾プライマーを使用 | 蛍光標識プライマーのような修飾プライマーを使用する際には、アニリング温度を2 ずつ低くするか、温度勾配PCRを行なう。 |
| f) ピペット操作ミスあるいは試薬の入れ忘れ | PCRをもう一度行なう。プライマーなどの試薬の濃度および保存条件をチェックする。Fast Cycling PCR Master Mixとプライマー・テンプレート溶液の割合が1 : 1であることを確認する。 |
| g) PCRサイクリング条件が最適でない | 同じサイクリング条件でQ-Solutionを用いてPCRを再度行なう。6ページのプロトコールに従う。 |
| h) サイクル数が少ない | サイクル数を5サイクルずつ増やす(英語版 Handbook 29ページ、Appendix C参照)。 |
| i) スタート・テンプレートに問題がある | 濃度、保存条件、スタート・テンプレートの品質をチェックする(英語版 Handbook 26ページ、Appendix A参照)。必要に応じてストック溶液からテンプレート核酸の連続希釈溶液を新しく調製する。これを用いてPCRを再度行なう。 |

* 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) アニーリング温度
あるいは時間が正確で
はない
- 2 ずつアニーリング温度を下げる。アニーリング時間を5秒にする。最適なアニーリング温度の決定は難しいが、サーマルサイクラーに温度勾配機能がある場合には、温度勾配PCRを行なうことで多くの場合は解決できる。
- k) エクステンション時間が短すぎる
- 100 bpの増幅DNAあたり3秒のエクステンション時間を使用。異なる長さのPCR産物を増幅する際は、一番長いPCR産物用のエクステンション時間を使用する。
- l) プライマー・デザインが適切でない
- プライマー・デザインを再考する（英語版 Handbook 27ページ、Appendix B参照）。
- m) RT反応が間違っている
- RT-PCRでは逆転写反応効率の平均値が10～30%である事を考慮しなければならない。逆転写反応液の添加量は最終PCR溶液量の10%を超えてはならない（英語版 Handbook 30ページ、Appendix E）
- n) ゲノムDNAからのロングフラグメントのPCR
- ゲノムDNAから4 kb以上の産物を増幅する際は、反応液中のゲノムDNA量を増やす（英語版 Handbook 26ページ、Appendix A参照）。
- o) 加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用し、ミネラルオイルを重層してPCRを行なった
- 加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用する際には、PCR産物の収量が減少するのでPCRサンプルの上にミネラルオイルを重層しない。
- p) サーマルサイクラーに問題がある
- 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。

増幅産物が多数検出

- | | | |
|----|---|--|
| a) | HotStarTaq Plus DNA Polymerase の活性時間が長過ぎる | 95 で5分間のみ最初の活性化を行ないPCRを開始したことを確認する。 |
| b) | PCRサイクリング条件が最適でない | 同じサイクリング条件でQ-Solutionを用いてPCRを再度行なう。6ページのプロトコールに従う。 |
| c) | アニーリング温度が低過ぎる | 2 ずつアニーリング温度を上げる。アニーリング時間を5秒にする。最適なアニーリング温度の決定は難しいが、サーマルサイクラーに温度勾配機能がある場合には、温度勾配PCRを行なうことで多くの場合は解決できる。 |
| d) | プライマー濃度が最適でない、またはプライマーが分解 | デフォルトの各プライマー濃度は0.5 μMを使用。各プライマー濃度を0.1 ~ 0.5 μM (0.1 μMずつ) でPCRを再度行なう。特に高感度なPCRを行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲルでプライマーが分解していないかをチェックする。* |
| e) | プライマー・デザインが適切でない | プライマー・デザインを再考する (英語版 Handbook 27ページ、Appendix B参照)。 |

スミア状の産物

- | | | |
|----|---|---|
| a) | HotStarTaq Plus DNA Polymerase の活性時間が長過ぎる | 95 で5分間のみ最初の活性化を行ないPCRを開始したことを確認する。 |
| b) | スタートサンプル量が多過ぎる | スタート・テンプレートの濃度と保存温度を確認する (英語版 Handbook 26ページ、Appendix A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新しく調製する。この連続希釈溶液を用いてPCRを行なう。 |
| c) | キャリアオーバーが混入 | ネガティブ・コントロールのPCR(テンプレートDNAなし)でPCR産物あるいはスミア状が観察される場合には、試薬を全て交換する。クロスコンタミを最小限に抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用。DNAを調製する場所あるいはPCR産物を解析する場所から離れたところで反応液のセットアップを行なう。 |

* 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

- d) サイクル数が多過ぎる 3サイクルずつサイクル数を減らす
- e) プライマー濃度が最適でない、あるいはプライマーが分解している 各プライマー濃度を0.1 ~ 0.5 μM (0.1 μM ずつ) でPCRを再度行なう。特に高感度なPCRを行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲルでプライマーが分解していないかをチェックする*。
- 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 (英語版 Handbook 27ページ、Appendix B参照)。

* 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。

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



WWW.QIAGEN.CO.JP

2301077 10/2006