

QuantiFast™ Multiplex PCR プロトコールとトラブルシューティング

QuantiFast Multiplex PCR Kit — ROX passive reference dye
を含むマスターミックス添付

QuantiFast Multiplex PCR +R Kit — ROX passive reference
dyeは別途包装され、マスターミックスにはROX色素を
含まない

配列特異的なプローブを用いた高速なマルチプレックス・
リアルタイム定量PCR／RT-PCR



目次

プロトコール

TaqMan プローブを用いた Duplex リアルタイム PCR (殆どの Applied Biosystems Cyclers)	3
TaqMan プローブを用いた Triplex / 4plex リアルタイム PCR (殆どの Applied Biosystems Cyclers)	6
TaqMan プローブを用いた Duplex リアルタイム PCR (Applied Biosystems 7500 およびその他のサイクラー)	10
TaqMan プローブを用いた Triplex / 4plex リアルタイム PCR (Applied Biosystems 7500 およびその他のサイクラー)	14
トラブルシューティング	18

プロトコール1：TaqManプローブを用いたDuplexリアルタイムPCR（殆どのApplied Biosystems Cyclers）

本プロトコールは、Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systemを除くApplied Biosystemsのリアルタイム用サーマルサイクラーで、Quantifast Multiplex PCR KitとTaqMan®プローブを使用するように至適化されています。詳細は英語版Handbook 9～10ページの“Passive reference dye”をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールに記載されているサイクリング条件およびプライマー濃度で常に開始してください。
- マルチプレックスアッセイで同時に複数の反応を行なう前に、個々の反応でプライマー／プローブセットのパフォーマンスをテストすることを強くお勧めします。
- 英語版Handbook 15ページ、“Guidelines for effective multiplex assays”をご覧ください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム用サーマルサイクラーと適合していることをチェックしてください。
- 既に確立されているduplexリアルタイムPCRアッセイを用いる場合には、確立したプライマーおよびプローブ濃度と、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。プライマー濃度を決め直す必要はありません。
- 正確な定量データのためには最適な解析設定が必須条件の一つです。データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、設定値（ベースラインとthreshold値など）を常に再設定する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲットごとに、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20xプライマー／プローブミックスを調製すると操作が容易になります。Duplex PCR用の20xプライマー／プローブミックスは、TEバッファー中に各濃度を10 μM forward primer、10 μM reverse primer、4 μM プローブに調製します。あるいは、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。この方法で反応セットアップを行なう場合には、英語版Handbook 56ページ、Appendix Bをご覧ください。

操作手順

1. 2x Quantifast Multiplex PCR Master Mix、プライマー／プローブ溶液、RNaseフリー水、テンプレートDNAあるいはcDNAを解凍する。それぞれの溶液を混和して氷上で保冷する。
2. 表16（4ページ）に従って反応ミックスを調製する。

注：2x Quantifast Multiplex PCR Master Mixに添加されている至適化済みのMg²⁺濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

注：ホットスタートPCRですから、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で保冷する必要はありません。

表 16. 反応セットアップ

成分	容量*	最終濃度
2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix	12.5 µl	1x
20x プライマー／プローブミックス 1 [†]	1.25 µl	0.5 µM forward primer 1 [‡] 0.5 µM reverse primer 1 [‡] 0.2 µM probe 1 [§]
20x プライマー／プローブミックス 2 [†]	1.25 µl	0.5 µM forward primer 2 [‡] 0.5 µM reverse primer 2 [‡] 0.2 µM probe 2 [§]
RNase フリー水	適量	–
テンプレート DNA または cDNA (ステップ 4 で添加)	適量	≤100 ng / 反応
トータル反応容量	25 µl*	–

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 µl 以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節してください。Applied Biosystems 7900HT で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10 µl の反応量を使用します。

[†] Duplex PCR 用の 20x プライマー／プローブミックスは、TE バッファー中に各濃度を 10 µM forward primer、10 µM reverse primer、4 µM プローブに調製しておきます。

[‡] 最終プライマー濃度は 0.5 µM が最適です。プライマー濃度を調節する前に、プライマー溶液の濃度を確認してください。

[§] 最終プローブ濃度は 0.2 µM でほとんどの場合満足できる結果が得られます。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によりですが、最適濃度は 0.1 ~ 0.4 µM の間です。

3. 反応ミックスを完全に混和し、PCR チューブあるいは PCR プレーートのウェルに適切な量を分注する。
4. それぞれの PCR チューブあるいはウェルにテンプレート DNA あるいは cDNA (≤100 ng) を添加する。

注：2 ステップ RT-PCR では、テンプレートとして添加した cDNA 量（未希釈の逆転写反応液）が最終 PCR 溶液量の 10% を超えないようにします。

5. 表 17 (5 ページ) 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。

注：リアルタイム用サーマルサイクラーのユーザーマニュアルをチェックしてマルチプレックス解析用のセットアップを正しく行なってください（例；同じウェルから複数の色素を検出するための設定）。用いるレポーター色素毎に検出プログラムを設定してください。機器によっては初めて使用する前に各レポーター色素ごとにキャリブレーション操作が必要になることがあります。

表 17. 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 °C	HotStarTaq® Plus DNA Polymerase はこの加熱ステップで活性化される
2ステップサイクリング			重要：これらのサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる
変性：	30 秒	95 °C	
アニーリング/ エクステンション：	30 秒	60 °C	アニーリング/エクステンションステップと蛍光データ収集の組み合わせ
サイクル数：	40 ~ 45		サイクル数はテンプレート DNA あるいは cDNA の量とターゲット遺伝子の発現量に依存

6. PCR チューブあるいはプレートを実験用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。

7. データ解析を行なう。

データ解析を始める前に、解析設定（ベースラインと threshold 値など）は各プローブごとに選択します。最適な解析設定が正確な定量データのために必須です。

プロトコール2：TaqMan プローブを用いた Triplex／4plex リアルタイム PCR（殆どの Applied Biosystems Cycler）

本プロトコールは、**Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System**を除く Applied Biosystems のリアルタイム用サーマルサイクラーで、**Quantifast Multiplex PCR Kit**と TaqMan プローブを使用するように至適化されています。詳細は英語版 Handbook 9～10 ページの “Passive reference dye” をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールに記載されているサイクリング条件およびプライマー濃度で常に開始してください。このサイクリング条件は duplex アッセイプロトコール（3 ページ）に記載されているサイクリング条件とは異なります。
- マルチプレックスアッセイで同時に複数の反応を行なう前に、個々の反応でプライマー／プローブセットのパフォーマンスをテストすることを強くお勧めします。
- 英語版 Handbook 15 ページ、 “Guidelines for effective multiplex assays” をご覧ください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム用サーマルサイクラーと適合していることをチェックしてください。
- 既に確立されているマルチプレックス・リアルタイム PCR アッセイを用いる場合には、確立したプライマーおよびプローブ濃度と、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。プライマー濃度を決め直す必要はありません。
- **正確な定量データのためには最適な解析設定が必須条件の一つです。**データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、設定値（ベースラインと threshold 値など）を常に再設定する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ 20x プライマー／プローブミックスをターゲットごとに調製すると操作が容易になります。Triplex および 4plex PCR 用の 20x プライマー／プローブミックスは、TE バッファー中に各濃度を 10 μ M forward primer、10 μ M reverse primer、4 μ M プローブに調製します。あるいは、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。この方法で反応セットアップを行なう場合には、英語版 Handbook 56 ページ、Appendix B をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix**、プライマー／プローブ溶液、RNase フリー水、テンプレートDNAあるいはcDNAを解凍する。それぞれの溶液を混和して氷上で保冷する。

2. 表 18 (8 ページ) に従って反応ミックスを調製する。

注：2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix に添加されている至適化済みの Mg^{2+} 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

注：ホットスタートPCRですから、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で保冷する必要はありません。

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

4. それぞれのPCR チューブあるいはウェルにテンプレートDNAあるいはcDNA (≤ 100 ng / 反応) を添加する。

注：2ステップRT-PCRでは、テンプレートとして添加したcDNA量（未希釈の逆転写反応液）が最終PCR溶液量の10%を超えないようにします。

5. 表 19 (9 ページ) 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。

注：リアルタイム用サーマルサイクラーのユーザーマニュアルをチェックしてマルチプレックス解析用のセットアップを正しく行なってください（例：同じウェルから複数の色素を検出するための設定）。用いるレポーター色素毎に検出プログラムを設定してください。機器によっては初めて使用する前に各レポーター色素ごとにキャリブレーション操作が必要になることがあります。

表 18. 反応セットアップ

成分	容量 *	最終濃度
2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix	12.5 µl	1x
20x プライマー／プローブミックス 1 [†]	1.25 µl	0.5 µM forward primer 1 [‡] 0.5 µM reverse primer 1 [‡] 0.2 µM probe 1 [§]
20x プライマー／プローブミックス 2 [†]	1.25 µl	0.5 µM forward primer 2 [‡] 0.5 µM reverse primer 2 [‡] 0.2 µM probe 2 [§]
20x プライマー／プローブミックス 3 [†]	1.25 µl	0.5 µM forward primer 3 [‡] 0.5 µM reverse primer 3 [‡] 0.2 µM probe 3 [§]
4plex PCRのみ：		
20x プライマー／プローブミックス 4 [†]	1.25 µl	0.5 µM forward primer 4 [‡] 0.5 µM reverse primer 4 [‡] 0.2 µM probe 4 [§]
RNase フリー水	適量	—
テンプレート DNA または cDNA (ステップ 4 で添加)	適量	≤100 ng / 反応
トータル反応容量	25 µl*	—

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 µl 以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節してください。Applied Biosystems 7900HT で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10 µl の反応量を使用します。

[†] Triplex および 4plex PCR 用の 20x プライマー／プローブミックスは、TE バッファー中に各濃度を 10 µM forward primer、10 µM reverse primer、4 µM プローブに調製しておきます。

[‡] 最終プライマー濃度は 0.5 µM が最適です。プライマー濃度を調節する前に、プライマー溶液の濃度を確認してください。

[§] 最終プローブ濃度は 0.2 µM でほとんどの場合満足できる結果が得られます。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によりますが、最適濃度は 0.1 ~ 0.4 µM の間です。

表 19. 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℃	HotStarTaq Plus DNA Polymerase はこの加熱ステップで活性化される
2ステップサイクリング			重要：これらのサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる*
変性：	45秒	95℃	
アニーリング/ エクステンション：	45秒	60℃	アニーリング/エクステンションステップと蛍光データ収集の組み合わせ
サイクル数：	40～45		サイクル数はテンプレートDNAあるいはcDNAの量とターゲット遺伝子の発現量に依存

* アッセイによっては、変性およびアニーリング/エクステンションステップの時間をそれぞれ30秒まで短縮可能です。最初の実験は、この表に記載されているサイクリング条件で常に開始することをお奨めします。

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、サイクリングプログラムをスタートする。

7. データ解析を行なう。

データ解析を始める前に、解析設定（ベースラインと threshold 値など）は各プローブごとに選択します。最適な解析設定が正確な定量データのために必須です。

プロトコール3：TaqManプローブを用いたDuplexリアルタイムPCR（Applied Biosystems 7500およびその他のサイクラー）

本プロトコールは、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System および Bio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Corbett、Eppendorf®、Roche®、Stratagene® のリアルタイム用サーマルサイクラー上での TaqMan プローブと **QuantiFast Multiplex PCR +R Kit** の使用に至適化されています。詳細は英語版 Handbook 9～10 ページの “Passive reference dye” をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールに記載されているサイクリング条件およびプライマー濃度で常に開始してください。
- マルチプレックスアッセイで同時に複数の反応を行なう前に、個々の反応でプライマー／プローブセットのパフォーマンスをテストすることを強くお勧めします。
- 英語版 Handbook 15 ページ、 “Guidelines for effective multiplex assays” をご覧ください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム用サーマルサイクラーと適合していることをチェックしてください。
- 既に確立されている duplex リアルタイム PCR アッセイを用いる場合には、確立したプライマーおよびプローブ濃度と、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。プライマー濃度を決め直す必要はありません。
- **正確な定量データのためには最適な解析設定が必須条件の一つです。** データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、設定値（ベースラインと threshold 値など）を常に再設定する必要があります。
- **LightCycler® 2.0** あるいは **LightCycler 480** を使用する際は、色校正ファイルを作成します。詳細は英語版 Handbook 57 ページ、Appendix C を参照ください。広範にわたり分別可能な発光スペクトルをもつレポーター色素を LightCycler 480 上で使用する場合は、色校正は不要です。

実験開始前の準備事項

- ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ 20x プライマー／プローブミックスをターゲットごとに調製すると操作が容易になります。Duplex PCR 用の 20x プライマー／プローブミックスは、TE バッファー中に各濃度を 10 μ M forward primer、10 μ M reverse primer、4 μ M プローブに調製します。あるいは、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。この方法で反応セットアップを行なう場合には、英語版 Handbook 56 ページ、Appendix B をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix (w/o ROX)、50x ROX Dye Solution、プライマー/プローブ溶液、RNase フリー水、テンプレート DNA あるいは cDNA を** 解凍する。それぞれの溶液を混和して氷上で保冷する。

2. 表 20 (12 ページ) に従って反応ミックスを調製する。

注：2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix (w/o ROX) に添加されている至適化済みの Mg^{2+} 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

注：ホットスタート PCR ですから、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で保冷する必要はありません。

3. 反応ミックスを完全に混和し、PCR チューブ、PCR キャピラリー、あるいは PCR プレートウェルに適切な量を分注する。

4. それぞれの PCR チューブ、キャピラリー、あるいはウェルにテンプレート DNA あるいは cDNA (≤ 100 ng) を添加する。

注：2ステップ RT-PCR では、テンプレートとして添加した cDNA 量 (未希釈の逆転写反応液) が最終 PCR 溶液量の 10% を超えないようにします。

5. 表 21 (13 ページ) 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。

注：リアルタイム用サーマルサイクラーのユーザーマニュアルをチェックしてマルチプレックス解析用のセットアップを正しく行なってください (例：同じウェルから複数の色素を検出するための設定)。用いるレポーター色素毎に検出プログラムを設定してください。機器によっては初めて使用する前に各レポーター色素ごとにキャリブレーション操作が必要になることがあります。

表 20. 反応セットアップ

成分	容量/反応*		
	96ウェル ブロック	高速/ キャピラリー†	最終濃度
2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix (w/o ROX)	12.5 µl	10 µl	1x
50x ROX Dye Solution‡	0.5 µl	0.4 µl	1x
20x プライマー/ プローブミックス 1§	1.25 µl	1 µl	0.5 µM forward primer 1¶ 0.5 µM reverse primer 1¶ 0.2 µM probe 1**
20x プライマー/ プローブミックス 2§	1.25 µl	1 µl	0.5 µM forward primer 2¶ 0.5 µM reverse primer 2¶ 0.2 µM probe 2**
RNase フリー水	適量	適量	-
テンプレート DNA または cDNA (ステップ 4 で添加)	適量	適量	≤100 ng/反応
トータル反応容量	25 µl*	20 µl*	-

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 µl あるいは 20 µl 以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節してください。LightCycler 480 で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10 µl の反応量を使用します。

† Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System および LightCycler 2.0 のようなキャピラリー・サイクラー。

‡ ROX 色素が不要なサイクラーでは、代わりに RNase フリー水を添加します。

§ Duplex PCR 用の 20x プライマー/プローブミックスは、TE バッファー中に各濃度を 10 µM forward primer、10 µM reverse primer、4 µM プローブに調製しておきます。

¶ 最終プライマー濃度は 0.5 µM が最適です。プライマー濃度を調節する前に、プライマー溶液の濃度を確認してください。

** 最終プローブ濃度は 0.2 µM でほとんどの場合満足できる結果が得られます。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法により異なりますが、最適濃度は 0.1 ~ 0.4 µM の間です。

表 21. 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 °C	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase はこの加熱ステップで活性化される
2ステップサイクリング			重要：これらのサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる
変性：	30 秒	95 °C	
アニーリング/ エクステンション：	30 秒	60 °C	アニーリング/エクステンションステップと蛍光データ収集の組み合わせ
サイクル数：	40 ~ 45		サイクル数はテンプレート DNA あるいは cDNA の量とターゲット遺伝子の発現量に依存

6. PCR チューブ、キャピラリー、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。

7. データ解析を行なう。

データ解析を始める前に、解析設定（ベースラインと threshold 値など）は各プローブごとに選択します。最適な解析設定が正確な定量データのために必須です。

プロトコール4：TaqManプローブを用いたTriplex／4plexリアルタイムPCR（Applied Biosystems 7500およびその他のサイクラー）

本プロトコールは、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System および Bio-Rad/MJ Research、Cepheid、Corbett、Eppendorf、Roche、Stratagene のリアルタイム用サーマルサイクラー上での TaqMan プローブと **QuantiFast Multiplex PCR +R Kit** の使用に至適化されています。詳細は英語版 Handbook 9～10ページの“Passive reference dye”をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- このプロトコールに記載されているサイクリング条件およびプライマー濃度で常に開始してください。このサイクリング条件はduplexアッセイプロトコール（10ページ）で記載されているサイクリング条件とは異なります。
- マルチプレックスアッセイで同時に複数の反応を行なう前に、個々の反応でプライマー／プローブセットのパフォーマンスをテストすることを強くお勧めします。
- 英語版 Handbook 15 ページ、“Guidelines for effective multiplex assays”をご覧ください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム用サーマルサイクラーと適合していることをチェックしてください。
- 既に確立されているマルチプレックス・リアルタイムPCRアッセイを用いる場合には、確立したプライマーおよびプローブ濃度と、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。プライマー濃度を決め直す必要はありません。
- **正確な定量データのためには最適な解析設定が必須条件の一つです。**データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、設定値（ベースラインとthreshold値など）を常に再設定する必要があります。
- **LightCycler 2.0**あるいは**LightCycler 480**を使用する際は、色校正ファイルを作成します。詳細は英語版 Handbook 57 ページ、Appendix Cを参照してください。広範にわたり分別可能な発光スペクトルをもつレポーター色素をLightCycler 480上で使用する場合は、色校正は不要です。

実験開始前の準備事項

- ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20xプライマー／プローブミックスをターゲットごとに調製すると操作が容易になります。Triplexおよび4plex PCR用の20xプライマー／プローブミックスは、TEバッファー中に各濃度を10 μ M forward primer、10 μ M reverse primer、4 μ M プローブに調製します。あるいは、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。この方法で反応セットアップを行なう場合には、英語版 Handbook 56 ページ、Appendix Bをご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix (w/o ROX)、50x ROX Dye Solution、プライマー/プローブ溶液、RNase フリー水、テンプレート DNA あるいは cDNA を解凍する。それぞれの溶液を混和して氷上で保冷する。**

2. **表 22 (16 ページ) に従って反応ミックスを調製する。**

注：2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix (w/o ROX) に添加されている至適化済みの Mg^{2+} 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

注：ホットスタート PCR ですから、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で保冷する必要はありません。

3. **反応ミックスを完全に混和し、PCR チューブ、PCR キャピラリー、あるいは PCR プレートのウェルに適切な量を分注する。**

4. **それぞれの PCR チューブ、キャピラリー、あるいはウェルにテンプレート DNA あるいは cDNA (≤ 100 ng/反応) を添加する。**

注：2ステップ RT-PCR では、テンプレートとして添加した cDNA 量（未希釈の逆転写反応液）が最終 PCR 溶液量の 10% を超えないようにします。

5. **表 23 (17 ページ) 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。**

注：リアルタイム用サーマルサイクラーのユーザーマニュアルをチェックしてマルチプレックス解析用のセットアップを正しく行なってください（例：同じウェルから複数の色素を検出するための設定）。用いるレポーター色素毎に検出プログラムを設定してください。機器によっては初めて使用する前に各レポーター色素ごとにキャリブレーション操作が必要になることがあります。

表 22. 反応セットアップ

成分	容量／反応*		
	96 ウェル ブロック	高速/ キャピラリー†	最終濃度
2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix (w/o ROX)	12.5 µl	10 µl	1x
50x ROX Dye Solution†	0.5 µl	0.4 µl	1x
20x プライマー/ プローブミックス 1§	1.25 µl	1 µl	0.5 µM forward primer 1¶ 0.5 µM reverse primer 1¶ 0.2 µM probe 1**
20x プライマー/ プローブミックス 2§	1.25 µl	1 µl	0.5 µM forward primer 2¶ 0.5 µM reverse primer 2¶ 0.2 µM probe 2**
20x プライマー/ プローブミックス 3§	1.25 µl	1 µl	0.5 µM forward primer 3¶ 0.5 µM reverse primer 3¶ 0.2 µM probe 3**
4plex PCRのみ： 20x プライマー/ プローブミックス 4§	1.25 µl	1 µl	0.5 µM forward primer 4¶ 0.5 µM reverse primer 4¶ 0.2 µM probe 4**
RNase フリー水	適量	適量	-
テンプレート DNA または cDNA (ステップ 4 で添加)	適量	適量	≤100 ng/反応
トータル反応容量	25 µl*	20 µl*	-

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 µl あるいは 20 µl 以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節してください。LightCycler 480 で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10 µl の反応量を使用します。

† Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System および LightCycler 2.0 のようなキャピラリー・サイクラー。

‡ ROX 色素が不要なサイクラーでは、代わりに RNase フリー水を添加します。

§ Triplex および 4plex PCR 用の 20x プライマー/プローブミックスは、TE バッファー中に各濃度を 10 µM forward primer、10 µM reverse primer、4 µM プローブに調製しておきます。

¶ 最終プライマー濃度は 0.5 µM が最適です。プライマー濃度を調節する前に、プライマー溶液の濃度を確認してください。

** 最終プローブ濃度は 0.2 µM でほとんどの場合満足できる結果が得られます。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によりませんが、最適濃度は 0.1 ~ 0.4 µM の間です。

表 23. 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 °C	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase はこの加熱ステップで活性化される
2ステップサイクリング			重要：これらのサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる
変性：	45 秒	95 °C	
アニーリング/ エクステンション：	45 秒	60 °C	アニーリング/エクステンションステップと蛍光データ収集の組み合わせ
サイクル数：	40 ~ 45		サイクル数はテンプレート DNA あるいは cDNA の量とターゲット遺伝子の発現量に依存

6. PCR チューブ、キャピラリー、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。

7. データ解析を行なう。

データ解析を始める前に、解析設定（ベースラインと threshold 値など）は各プローブごとに選択します。最適な解析設定が正確な定量データのために必須です。

トラブルシューティングガイド

コメント

PCRでシグナルがない、あるいは一つ以上のサンプルのシグナルが遅れて検出される

- a) サイクル条件が間違っている
常にプロトコールに記載されている至適化済みのサイクリング条件で始める。サイクリング条件に HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase 活性化ステップ (95 °C、5分) と、変性およびアニーリング/エクステンションの時間設定がプロトコール通りになっていることを確認する。
- b) HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase が活性化されていない
プロトコールに記載されているようにサイクリングプログラムに 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。
- c) ピペッティングエラー、あるいは試薬の入れ忘れ
プライマー、プローブ、テンプレート核酸を含んだ試薬の濃度と保存条件をチェックする。プライマーおよびプローブ濃度を評価する際の詳細は英語版 Handbook 53 ページ、Appendix A を参照する。再度アッセイを行なう。
- d) 検出ステップが間違っている、あるいはない
TaqMan プローブを用いた時、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。
- e) プライマーあるいはプローブ濃度が適切でない
ほとんどの場合、ほぼ全てのリアルタイム用サーマルサイクラーでプライマー濃度は 0.5 μM で満足できる結果が得られる。リアルタイム PCR アッセイによっては、プライマー濃度を 0.3 ~ 0.6 μM に調節することで結果が改善されることがある。
ほとんどの場合、プローブ濃度は 0.2 μM で満足できる結果が得られる。使用したプローブの品質によっては、0.1 ~ 0.4 μM にプローブ濃度を調節することで結果が改善されることがある。
プライマーおよびプローブ濃度は分光光度計でチェックする (英語版 Handbook 53 ページ、Appendix A を参照)。

コメント

- f) Mg^{2+} 濃度が最適ではない
2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mixes 中の Mg^{2+} 濃度は既に最適化されている。 Mg^{2+} 濃度を 0.5 ~ 1.0 mM 増やすと結果が改良されることがある。
- g) スタートテンプレートに問題
スタート核酸の濃度、保存条件、品質をチェックする。
必要な場合には、テンプレート核酸のストック溶液の連続希釈系列を新しく調製する。新しい希釈液を用いてアッセイを再度行なう。
テンプレート核酸の分離および希釈に使用した試薬、バッファー、溶液のすべてがヌクレアーゼ・フリーであることを確認する。
- h) スタートテンプレート量が不十分
可能ならテンプレート量を増やす。十分なコピー数のターゲット核酸がサンプル中に存在していることを確認する。
- i) サイクル数が少ない
サイクル数を増やす。
- j) プローブデザインが適正でない
増幅反応が成功しているのなら、プローブに問題のある可能性がある。プローブ・デザインのガイドラインを参照する (英語版 Handbook 53 ページ、Appendix A 参照)。
- k) 間違った検出チャンネル/フィルターを選択した
正しい検出チャンネルが有効かどうか、あるいはレポーター色素に正しいフィルターを選択しているかを確認する。選択したレポーター色素の組み合わせが検出チャンネルあるいはフィルターセットに適合しているかチェックする。
- l) 蛍光のクロストーク
アッセイに使用したレポーター色素がサイクラー上のマルチプレックス 解析に適切であることをチェックする。クロストーク効果の可能性を評価するために適切なコントロールを用いてテストする。

コメント

マルチプレックス・アッセイと相当する singleplex アッセイとで C_T 値あるいは PCR 効率の違いがある

- a) サイクル条件が間違っている 常にプロトコールに記載されている至適化済みのサイクリング条件で始める。サイクリング条件に HotStarTaq Plus DNA Polymerase 活性化ステップ (95 °C、5分) と、変性およびアニーリング/エクステンションの時間設定を確認する。
- b) 解析の設定値 (ベースラインと threshold 値など) が最適でない 各レポーター色素ごとに解析設定値 (ベースラインと threshold 値など) をチェックする。各レポーター色素で最適な設定を用いて再度解析する。
- c) レポーター色素のスペクトル分離が不正確 マルチプレックス・アッセイは蛍光標識した複数のプローブを使用しているために、バックグラウンドが増加し、リアルタイム用サーマルサイクラーによっては得られる増幅プロットの形に影響することがある。これにより、マルチプレックス・アッセイと相当する singleplex アッセイで C_T 値が最高 5% 異なることがある; この違いは最適な threshold 値を設定することにより通常回避できる。
- ABI PRISM® 7700 を使用している場合には、spectral compensation を用いた解析と用いない解析の両方を行なう。

テンプレート量のログ値と C_T 値 / Crossing point 間の相関関係に直線性がない

- a) テンプレート量が多すぎる シグナルの増幅が非常に早く C_T 値が小さい場合は、適宜解析設定を調節する。
- b) テンプレート量が少すぎる 可能ならテンプレート量を増やす。非常にコピー数の少ないサンプルの検出は標準曲線の直線性のある範囲に入らないことがある。

コメント

No Template Control (NTC ; テンプレート無添加のコントロール) で蛍光強度あるいはC_t値が高い

- a) 試薬のコンタミ アッセイに使用した試薬（例；マスターミックス、プライマー、プローブ）をすべて廃棄する。新しい試薬でもう一度繰り返す。
- b) わずかなプローブ分解により蛍光強度が増加 増幅プロットをチェックし、threshold 値を調節する。

蛍光強度がバラつく

- a) リアルタイム用サーマルサイクラーがコンタミ メーカーの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。
- b) リアルタイム用サーマルサイクラーの較正ができていない メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーの較正をもう一度行なう。
- c) ターゲットの発現が高く多量のテンプレートで曲線が波状になる 解析設定でバックグラウンドを計算するために使用したサイクル数を（ご使用のリアルタイム用サーマルサイクラーが変更可能な場合）減らすか、テンプレート量を減らす。
- d) **ABI PRISM 7000** : 曲線が乱れる、あるいは実験結果のバラつきが大きい 25 μ l未満の反応液量を用いない。プレートを密封するOptical adhesive coverを必ず使用する。反応液量を50 μ lに増加すると、結果が改良されることがある。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, QuantiFast™ (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Eppendorf® (Eppendorf AG); Roche®, LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); Stratagene® (Stratagene); Cepheid® (Cepheid).

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

A license to perform the 5' nuclease process for research requires the use of a Licensed 5' Nuclease Kit (containing Licensed Probe), or the combination of an Authorized 5' Nuclease Core Kit plus Licensed Probe, or license rights that may be purchased from Applied Biosystems. This product (Quantifast Multiplex PCR Kit and QuantiFast Multiplex PCR +R Kit) is an Authorized 5' Nuclease Core Kit without Licensed Probe. Its purchase price includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patents Nos. 5,210,015, 5,487,972, 5,476,774, and 5,219,727, and corresponding patent claims outside the United States, owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd (Roche), for using only this amount of the product in the practice of the 5' nuclease process solely for the purchaser's own internal research when used in conjunction with Licensed Probe. This product is also an Authorized 5' Nuclease Core Kit for use with service sublicenses available from Applied Biosystems. This product conveys no rights under U.S. Patents Nos. 5,804,375, 6,214,979, 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, or 6,258,569, or corresponding patents outside the United States, expressly, by implication or by estoppel. 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 perform 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.

Certain specific embodiments of the process of multiplex PCR may be covered by patents of third parties in certain countries and may require a license.

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

