

英語版 December 2009 に対応

Type-it™ Microsatellite PCR プロトコールとトラブルシューティング

マルチプレックス PCR による至適化不要の
マイクロサテライト解析



Sample & Assay Technologies

目次

準備すべき機器および試薬	3
重要事項	4
プロトコール	
マイクロサテライト遺伝子座増幅のためのマルチプレックス PCR (増幅後シーケンシング装置で解析)	8
Q-Solution を用いたマイクロサテライト遺伝子座増幅のための マルチプレックス PCR (増幅後シーケンシング装置で解析)	12
トラブルシューティング	17

準備すべき機器および試薬

試薬類を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。詳細は製品メーカーの対応する MSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

- 反応用チューブ
- ピペットおよびチップ (フィルター付きチップ)
- サーマルサイクラー
- プライマー
- プライマーは実績のあるオリゴメーカーから入手してください。凍結乾燥したプライマーをTEバッファーに溶解して、100 μ Mのストック溶液を調製します。濃度は分光光度計でチェックしてください。プライマーのストック溶液は分注し、 -20°C で保存してください。

重要事項

プライマー

Type-it Microsatellite PCR Kit は、実績のあるオリゴメーカーから入手した一般的な品質のプライマーと共に使用します。脱塩、逆相法または HPLC など適切な精製法により精製したプライマーを購入し、TE バッファー（10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0）に溶解して 50 あるいは 100 μ M のストック溶液を調製します（5 ページの表 2 参照）。プライマーの品質はマルチプレックス PCR を成功させるための重要なファクターの一つです。不正確なプライマー濃度や低品質なプライマーの使用がマルチプレックス PCR で問題が生じる原因となることが多々あります。

マイクロサテライト遺伝子座のマルチプレックス PCR は蛍光標識プライマーを用いて頻繁に行なわれています。使用する蛍光標識が検出システムに対応しているかを必ず確認してください。通常マイクロサテライトは高解像度のシークエンシング装置（ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer、Applied Biosystems® 3130 あるいは 3130xl、Applied Biosystems 3730 あるいは 3730xl Genetic Analyzer）上で検出されます。

同等量の PCR 産物が生成されているにもかかわらず、蛍光色素の種類により特定の検出機器では異なるシグナル強度を示すことがあります。検出機器メーカーの説明書に従って、マルチプレックス PCR 用の蛍光色素を組み合わせることを推奨します。蛍光標識プライマーは蛍光色素の退色を防ぐため必ず遮光してください。HPLC 精製したプライマーを使用することを推奨します。お持ちの検出装置に適合する蛍光色素標識を選択します。蛍光標識プライマーの取り扱いおよび保存に関する一般的なガイドラインは英語版 Handbook 39、43 ページの Appendix C および Appendix E を参照してください。

- マルチプレックス PCR アッセイ用にプライマーを組み合わせる前に、すべてのプライマーペアの性能を個別の PCR 反応で必ずテストします。
- マルチプレックス PCR で使用する多数のプライマーの取り扱いを簡単にするため、全プライマーを等モル濃度ずつ含むプライマーミックスの調製を推奨します。
- プライマーミックスは表 2（5 ページ）の記載に従って TE バッファーで調製し、凍結融解の繰り返しを避けるために少量ずつ分注し、 -20°C で保存してください。プライマーミックスを繰り返し凍結融解するとアッセイの性能が低下することがあります。

表 2. 10x プライマーミックスの調製 (2 μM の各プライマーを含む)*

プライマーストック 溶液の濃度 [†]	50 μM (50 pmol/ μl)	100 μM (100 pmol/ μl)
各プライマーストック	20 μl	10 μl
TE バッファー	適量	適量
トータル容量	500 μl	500 μl

* 最高 12 種類のプライマーペア (50 μM ストック溶液) あるいは 25 種類のプライマーペア (100 μM ストック溶液) を含む 10x プライマーミックスを調製可能。

[†] 記載の数値は蛍光標識プライマーおよび未標識のプライマーに適用可能。

解析の方法

Type-it Microsatellite PCR Kit で増幅したマイクロサテライトは蛍光標識プライマーを必要とするシーケンシング装置のような高解像度の検出機器上で簡単かつ 1 塩基の解像度で検出できます。

マルチプレックス PCR 解析用のプライマーペアは注意してデザインしなければなりません。プライマーの塩基配列だけでなく、PCR 産物の長さも考慮しなければなりません。検出システムの解像度に応じて、それぞれの増幅産物を明確に区別できるように各増幅産物の長さを設定します。

複数の蛍光色素を使用する場合には、PCR 産物は別々の色素により識別できるので、同一反応で増幅産物の長さが同じでも解析ができます。

あるいは、増幅後にマイクロサテライトは QIAxcel™ システムや Agilent® 2100 Bioanalyzer などのキャピラリー電気泳動装置を用いて最高 3 ~ 5 bp の分離能で解析できます。

様々な検出システム上で Type-it Microsatellite PCR Kit を用いる際のガイドラインは英語版 Handbook 35 ページ、Appendix A を参照ください。

マイクロサテライトをキャピラリー・シークエンサーで解析する際のガイドライン

Type-it Microsatellite PCR Kit を用いたマルチプレックス PCR 産物をキャピラリーあるいはゲルによるシークエンシング装置により効果的に解析するには、次のような様々な装置が使用できます。

- ABI PRISM 310 あるいは 3100 Genetic Analyzer
- Applied Biosystems 3130 あるいは 3130xl Genetic Analyzer
- Applied Biosystems 3730 あるいは 3730xl DNA Analyzer
- ABI PRISM 377
- Beckmann CEQ™ 8000 および CEQ 8800 Genetic Analysis Systems

高解像度シークエンシング装置上でのマルチプレックス PCR の解析に関する詳細は 8 ページ、12 ページを参照ください。

マイクロサテライトは通常キャピラリー・シークエンサーを用いて検出します。アガロースゲルあるいはキャピラリー電気泳動装置 (QIAxcel システム) 上でのマイクロサテライト検出法に関するガイドラインは英語版 Handbook 35 ページ、Appendix A を参照してください。

テンプレート DNA

スタートテンプレートとしての核酸の品質および量は PCR、特に感度および増幅効率に影響を与えます。

スタートテンプレートの品質

PCR 反応では酵素反応が同時に複数回行なわれるために、一回のみの酵素反応に比べて不純物 (タンパク質、フェノール/クロロホルム、塩類、エタノール、EDTA、その他の有機溶媒など) に対し、より鋭敏になります。QIAGEN は PCR 用の最高品質の核酸を確実に精製する様々な核酸調製システムを提供しています。これらの製品には、ヒト、植物、動物のゲノム DNA やバクテリア、ウイルス核酸の迅速な精製のための QIAamp®、PAXgene® Blood DNA および DNeasy® システムのようなマニュアルおよび自動化用製品があります。微量ゲノム DNA を均一に増幅し、配列によるバイアスのない全ゲノム増幅キット REPLI-g® Kits も利用できます。QIAamp、DNeasy、REPLI-g Kit、PAXgene Blood DNA System に関する詳細情報はキアゲンテクニカルサポート (TEL : 03-6890-7300、E-mail : techservice-jp@qiagen.com) にお問い合わせになるか、弊社ウェブサイト www.qiagen.co.jp をご覧ください。

スタートテンプレートの量

スタートテンプレートの量もマイクロサテライト遺伝子座のマルチプレックス PCR を成功させるためには有用な要素の一つです。

テンプレートの量および品質に関する詳細は英語 Handbook 41 ページ、Appendix D を参照ください。

適切なプロトコルの選択

このハンドブックには2種類のプロトコルが記載されています。

マイクロサテライト遺伝子座増幅のためのマルチプレックス PCR（増幅後シークエンシング装置で解析）。

マイクロサテライト増幅をマルチプレックス PCR で行ない、その後キャピラリー・シークエンサー上で解析する場合にはこのプロトコル（8 ページ）を選びます。

Q-Solution™を用いたマイクロサテライト遺伝子座増幅のためのマルチプレックス PCR（増幅後シークエンシング装置で解析）。

増幅が困難な領域（例；GC リッチな領域）に存在するマイクロサテライトの増幅のため Q-Solution を用いてマルチプレックス PCR を行ない、その後キャピラリー・シークエンサー上で解析する場合にはこのプロトコル（12 ページ）を選びます。

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。増幅が困難なマイクロサテライトのマルチプレックス PCR にはこのプロトコルを使用してください。増幅が困難な理由は、テンプレートの高い GC 含有量、あるいは複雑な二次構造によります。

マイクロサテライトは通常キャピラリー・シークエンサーを用いて解析します。アガロースゲルあるいは QIAxcel システム、Agilent 2100 Bioanalyzer システムを用いてマイクロサテライトを解析する場合には、英語版 Handbook 35 ページ、Appendix A のガイドラインを参照してください。

プロトコール：マイクロサテライト遺伝子座増幅のためのマルチプレックス PCR（増幅後シーケンシング装置で解析）

マイクロサテライト増幅をマルチプレックス PCR で行ない、その後キャピラリーシーケンサー上で解析する場合にはこのプロトコールを選びます。

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始めます。
- 本プロトコールはキャピラリー・シーケンサー上でマイクロサテライトを検出するためにデザインされています。その他の検出装置を用いる場合は、英語版 **Handbook 35** ページ、**Appendix A** に従ってください。
- 既に確立されているマイクロサテライト・マルチプレックス PCR アッセイ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。
- 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 B** をご覧ください。
- 全てのプライマーは同一濃度にします (**$0.2\ \mu\text{M}$**)。
- **5 ページの表 2** に従って **10x** プライマーミックスを調製します。
- PCR は最初に **95°C** 、**5 分**の活性化ステップで **HotStarTaq[®] Plus DNA Polymerase** を活性化し、開始します（このプロトコールのステップ 6 を参照）。

操作手順

1. **2x Type-it 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**、**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合する。

注：塩濃度が均一になるように使用前に各溶液を完全に混和することが重要です。

2. **表 3** に従って**反応ミックス**を調製する。

注：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 に必要なすべ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%** 増して反応ミックスを調製します。反応容量が **25 μl** 以下の場合、表 3 に記載されているように、**Type-it Multiplex PCR Master Mix** 量と**プライマーミックス**および**テンプレート**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 Type-it 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 3. マイクロサテライト用マルチプレックス PCR の反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
反応ミックス		
2x Type-it Multiplex PCR Master Mix*	12.5 µl	1x
10x プライマーミックス、 各プライマーは 2 µM (表 2 参照)	2.5 µl	0.2 µM †
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	≤ 200 ng DNA ; 10 ng の DNA で開始
トータル容量	25 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) でも増幅が改善されることがある。

‡ 25 µl 以下の容量では、2x Type-it Multiplex PCR Master Mix 量とプライマーミックスおよびテンプレート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、PCR チューブあるいはプレートに適切な量を分注する。

注:例えば反応ミックスを数回、上下にピペッティングして、静かに混和します。ホットスタート PCR なので、反応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 チューブあるいはウェルにテンプレート DNA (反応あたり 200 ng 以下) を添加する。実際の量は表 5 (10 ページ) を参照する。

5. 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。

6. PCR チューブあるいはプレートをサーマルサイクラーにセットし、表 4 (10 ページ) のサイクリングプログラムをスタートする。

注 : 各 PCR プログラムは 95°C、5 分間の初期活性化ステップにより HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化し、開始します。

増幅後、サンプルは 2 ~ 8°C で一晩、あるいは -20°C で長期保存が可能です。

表 4. マイクロサテライ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（増幅後にシークエンサーで解析）*

ステップ	時間	温度	コメント
酵素活性化ステップ	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。
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	ほとんどの PCR システムでアニーリング温度は 60°C が適している。一番低いプライマーの T_m [†] が 60°C 以下の場合には、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	0.5 kb までのターゲットに最適 [‡]
サイクル数	28		ほとんどの場合、28 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、検出に必要な感度に依存する。追加情報は表 5 を参照。
最終エクステンション	30 分	60°C	

* 本プロトコールは増幅後にシークエンサーで解析するために最適化されている；その他の検出システムを使用する場合には、英語版 Handbook 37 ページ、Table 13 のサイクリングプロトコールを参照。

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

[‡] 0.5 kb 以上のターゲットではエクステンション時間を 0.5 kb あたり 30 秒ずつ増加する。

表 5. シークエンサーで増幅産物を解析する際に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
50 ~ 200	20 ~ 24
10 ~ 50	24 ~ 28
0.1 ~ 10	28 ~ 32

7. キャピラリー・シークエンサーを用いて増幅産物を解析する。

注：キャピラリー・シークエンサーにアプライする前に、PCR 増幅したサンプルを 1：10 から 1：50 に希釈（ほとんどの場合 10 倍希釈でよい）します。サンプルは脱イオンホルムアミドあるいは水を用いて希釈します。希釈していないサンプルは反応あたり最高 1 μ l まで添加できません。

注：解析前に各サンプルに蛍光標識したマーカを必ず添加します。市販されている適切な蛍光標識マーカを使用できます。マーカの量および取り扱いに関しては、メーカーの説明書に従ってください。サンプルおよびマーカは水で溶解するより、脱イオンホルムアミドで溶解した方が安定です。

8. シークエンサーにサンプルを注入する前に、95℃で 5 分間変性ステップを行なう。

プロトコール：Q-Solution を用いたマイクロサテライト遺伝子座増幅のためのマルチプレックス PCR（増幅後シーケンシング装置で解析）

本プロトコールは 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 を使用した際、個々の PCR アッセイに依存して、次のような影響が観察されることがあります。

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る。

ケース B：Q-Solution によりある種のプライマーテンプレートシステムで PCR の特異性が増大する。

ケース C：Q-Solution が PCR パフォーマンスに影響しない。

ケース D：Q-Solution によってこれまで成功した増幅反応が失敗したり、増幅効率が低下する。このように Q-Solution の添加が適切なプライマーテンプレートアニーリングを妨害することもある。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で初めて使用する際には、Q-Solution を使用と未使用の反応を常に同時に行なってください。

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始めます。
- 本プロトコールはキャピラリー・シーケンサー上でマイクロサテライトを検出するためにデザインされています。その他の検出装置を用いる場合は、英語版 Handbook 35 ページ、Appendix A に従ってください。
- マイクロサテライト PCR アッセイに初めて Q-Solution を使用する場合には、増幅反応を Q-Solution 使用／未使用（最終濃度は 0.5x）で並行して実施することが重要です。
- 既に確立されているマイクロサテライト・マルチプレックス PCR アッセイ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にします（0.2 μM ）。
- 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 B をご覧ください。
- 5 ページの表 2 に従って 10x プライマーミックスを調製します。

- PCR は最初に 95℃、5 分の活性化ステップで HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化し、開始します（本プロトコールのステップ 6 を参照）。

操作手順

1. **2x Type-it 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**、**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合する。

注：塩濃度が均一になるように使用前に各溶液を完全に混和することが重要です。

2. 表 6 に従って反応ミックスを調製する。

注：反応ミックスには、マイクロサテライト遺伝子座のマルチプレックス PCR に必要なすべての成分（テンプレート DNA 以外）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 25 μ l 以下の場合、表 6 に記載されているように、Type-it Multiplex PCR Master Mix 量とプライマーミックスおよびテンプレート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 Type-it 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. Q-Solution および 2x Type-it Multiplex PCR Master Mix を用いる場合の反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
反応ミックス		
2x Type-it Multiplex PCR Master Mix*	12.5 μ l	1x
10x プライマーミックス、各プライマーは 2 μ M（表 2 参照）	2.5 μ l	0.2 μ M [†]
オプション：Q-Solution、5x	2.5 μ l	0.5x
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 200 ng DNA ; 10 ng の DNA で開始
トータル容量	25 μ l [‡]	

* $MgCl_2$ 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）でも増幅が改善されることがある。

[‡] 25 μ l 以下の容量では、2x Type-it Multiplex PCR Master Mix 量とプライマーおよびテンプレート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、PCR チューブあるいはプレートに適切な量を分注する。

注：例えば反応ミックスを数回、上下にピペッティングして、静かに混和します。ホットスタート PCR なので、反応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 チューブあるいはウェルにテンプレート DNA（反応あたり 200 ng 以下）を添加する。実際の量は表 8 を参照する。
5. 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。
6. PCR チューブあるいはプレート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。

注：各 PCR プログラムは 95℃、5 分間の初期活性化ステップにより HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化し、開始します。

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。

表 7. Q-Solution を用いたマイクロサテライトのマルチプレックス PCR 増幅用に最適化済みのサイクリングプロトコール (増幅後にシークエンサーで解析)*

ステップ	時間	温度	コメント
酵素活性化ステップ	5 分	95°C	HotStarTaq Plus DNA Polymerase はこの加熱ステップで活性化される。
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	ほとんどの PCR システムでアニーリング温度は 60°C が適している。一番低いプライマーの T_m † が 60°C 以下の場合には、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	0.5 kb までのターゲットに最適‡
サイクル数	28		ほとんどの場合、28 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、検出に必要な感度に依存する。追加情報は表 8 を参照。
最終エクステンション	30 分	60°C	

* 本プロトコールは増幅後にシークエンサーで解析するために最適化される；その他の検出システムを使用する場合には、英語版 Handbook 37 ページ、Table 13 のサイクリングプロトコールを参照。

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

‡ 0.5 kb 以上のターゲットではエクステンション時間を 0.5 kb あたり 30 秒ずつ増加する。

表 8. シークエンサーで増幅産物を解析する際に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
50 ~ 200	20 ~ 24
10 ~ 50	24 ~ 28
0.1 ~ 10	28 ~ 32

7. キャピラリー・シークエンサーを用いて増幅産物を解析する。

注：キャピラリー・シークエンサーに注入する前に、PCR 増幅したサンプルを 1：10 から 1：50 に希釈（ほとんどの場合 10 倍希釈でよい）します。PCR 産物は脱イオンホルムアミドあるいは水を用いて希釈します。希釈していないサンプルは反応あたり最高 1 μ l まで添加できます。

注：解析前に各サンプルに蛍光標識したマーカートを必ず添加します。市販されている適切な蛍光標識マーカートを可以使用します。マーカートの量および取り扱いに関しては、メーカーの説明書に従ってください。サンプルおよびマーカートは水で溶解するより、脱イオンホルムアミドで溶解した方が安定です。

8. シークエンサーにサンプルを注入する前に、95°C で 5 分間変性ステップを行なう。

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皆無である

- 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 6 に記述されている HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase 活性化ステップ (95°C、5 分間) が含まれていることを確認する (9、14 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
各プライマー濃度は 0.2 μM を使用する。多数のターゲット (10 種類以上) の同時増幅では、プライマーにより弱いシグナルを生じる場合のみ、1 ~ 2 μM のプライマー濃度と 3 分のエクステンション時間により結果が改善されることがある。QIAXcel 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。プライマー濃度の計算は 5 ページの表 2 を参照。
- d) サイクル数が不十分
PCR サイクル数を増やす。10 ページの表 5 あるいは 15 ページの表 8 を参照する。
- 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 (10 ページの表 4 および 15 ページの表 7 を参照)。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 44 ページ、Appendix F を参照)。

コメント

- f) PCR サイクリング条件が最適ではない Singleplex 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。キャピラリーシークエ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。必要に応じて、プライマーストック溶液から新しいプライマーミックスを希釈調製し、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) アニーリング温度が高い 英語版 Handbook 38 ページ、Appendix B に記載されている推奨事項に従い、使用のプライマーに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 3℃ ずつ下げる。90 秒のアニーリング時間を使用したかを確認する。必要に応じて、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 44 ページ、Appendix F 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 をやり直す。12 ページのプロトコールに従う。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 プライマーをデザインし直す。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 B を参照する。
- j) スタートテンプレート量が不十分 アガロースゲルあるいは QIAxcel システムを利用する検出では反応液 25 µl あたり最高 300 ng まで、シークエンサーを利用する検出では反応液 25 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 などて精製した高品質な 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、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。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 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 41 ページ、Appendix D 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 をやり直す。
- m) PCR 産物が長すぎる 至適化されたプロトコールでは最高 0.5 kb までのターゲットの増幅が可能。1.5 ~ 2 kb の長さのターゲットではエクステンション時間を 2 分にする。0.5 kb ごとにエクステンション時間を 30 秒間ずつ延長する。
- n) 感度が十分に高くない 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 の感度はさらに増加する。
- o) 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（10 ページの表 4 および 15 ページの表 7 を参照）。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。アガロースゲル、QIAxcel システム、Agilent 2100 Bioanalyzer のいずれかで PCR 産物の検出をする際には、10 種類以上の PCR 産物あるいは 1.5 kb 以上の PCR 産物には 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。

全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 Singleplex 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。必要に応じて、プライマーストック溶液から新しいプライマーミックスを希釈調製し、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。

* 化学薬品を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。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。シークエンサーを利用し検出を行なう多数のターゲット（10 種類以上）の同時増幅では、プライマーにより弱いシグナルを生じる場合のみ、1 ~ 2 μM のプライマー濃度と 3 分のエクステンション時間により結果が改善されることがある。QIAxcel 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 の精度に影響するので、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 C 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（10 ページの表 4 および 15 ページの表 7 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 44 ページ、Appendix F 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（10 ページの表 4 および 15 ページの表 7 を参照）。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。アガロースゲル、QIAxcel システム、Agilent 2100 Bioanalyzer のいずれかで PCR 産物の検出をする際には、10 種類以上の PCR 産物あるいは 1.5 kb 以上の PCR 産物には 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（10 ページの表 4 および 15 ページの表 7 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 44 ページ、Appendix F を参照）。 |
| 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 | Q-Solution を用いて、同じサイクリング条件でマルチプレックス PCR をやり直す。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。12 ページのプロトコルを参照する。 |

コメント

- g) 感度が十分に高くない 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の感度はさらに増加する。

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(10ページの表4および15ページの表7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 44ページ、Appendix F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サイクルずつ増やし、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 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℃ずつ上げる。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 44ページ、Appendix Fを参照)。
- d) Mg^{2+} 濃度が最適でない Type-it 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。
- 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。シークエンサーを利用し検出を行なう多数のターゲット(10種類以上)の同時増幅では、プライマーにより弱いシグナルを生じる場合のみ、1~2 μM のプライマー濃度と3分のエクステンション時間により結果が改善されることがある。QIAxcel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の精度に影響するので、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。プライマー濃度の計算は英語版 Handbook 39ページ、Appendix Cを参照。

コメント

-
- | | | |
|----|------------------------------------|---|
| f) | プライマーデザインが最適でない | プライマーをデザインしなおす。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 B を参照する。 |
| g) | いくつかのプライマーが種類の PCR 産物だけでなく副産物を生成する | 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は近い距離でテンプレートに結合しているが、外側に結合しているプライマーとペアになり、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 | Singleplex 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。必要に応じて、プライマーストック溶液から新しいプライマーミックスを希釈調製し、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。 |
| i) | 偽遺伝子の増幅 | プライマーが偽遺伝子シーケ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 B を参照する。 |
| 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 | Q-Solution を用いて、同じサイクリング条件でマルチプレックス PCR をやり直す。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。 |

* 化学薬品を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。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。

キャピラリーシークエンサーによる解析における 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 上では相対的ユニットが 10,000 未満）。
- b) ピークが弱い (“stutter peaks”) マイクロサテライト DNA 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。この影響を削減するためにはサイクル数を減らすことを推奨する。弱いピークの高さが 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。水より脱イオンホルムアミドを使用する。
- 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（10 ページの表 4 および 15 ページの表 7 を参照）。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 同等の 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説明書に従って、マルチプレックス PCR 用の蛍光色素を組み合わせることを推奨する。

マルチプレックス実験でいくつかの増幅産物が検出されない

- 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記載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

シーケンシング装置上でマルチプレックス PCR 産物を解析する際、増幅産物の収量が均一ではない

- a) ロードした PCR 産物が多すぎる シーケ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。90 秒の代わりに 3 分のアニーリング時間により、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 種類までの増幅産物では 1 μM 、10 種類以上の増幅残物では 2 μM までの増加を推奨する。
- b) 種々のターゲットが不均一に増幅 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 38 ページ、Appendix B に記載のガイドラインに従ってプライマーをデザインしたかをチェックする。あるいはプライマーをデザインし直す。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。他の改善法として、シグナルの弱いプライマーの最終濃度を 0.2 μM ではなく 1 μM まで増加する。

幅広いピーク；解析の終わり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 シーケ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。

- 1 種類のマイクロサテライト・マーカーで 3 種類あるいはそれ以上のピークが出現**
DNA がコンタミしているか DNA 混合物を解析 使用した DNA の純度あるいはコンタミをチェックする。

コメント

弱いピーク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確認する。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 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下でなければならない。

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）*

いくつかの PCR 産物でスメア状のバンド、あるいは非特異的な増幅副産物が検出される

- 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 42 ページ、Appendix D の Table 16 を参照）。少量の DNA（例えば 25 μl 反応液あたり 200 ng 未満）でマルチプレックス PCR をやり直す。
- 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（10 ページの表 4 および 15 ページの表 7 を参照）。未変性条件下でマルチプレックス PCR 産物の検出をする際には、10 種類以上の PCR 産物あるいは 1.5 kb 以上の PCR 産物には 68°C、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 種類以上の PCR 産物、あるいは 1.5 kb 以上の 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ように電圧を下げる。

* 化学薬品を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。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。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAxcel™, DNeasy®, HotStarTaq®, REPLI-g®, Type-it™, Q-Solution™ (QIAGEN Group); ABI™, ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); CEQ™ (Beckman Coulter, Inc.); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH).

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。

© 2009–2010 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

