

QuantiTect[®] Probe PCR プロトコールとトラブルシューティング

配列特異的プローブを用いたリアルタイム定量PCR
および2ステップRT-PCR用

目次	ページ
プロトコール	
Applied Biosystems Cyclor およびその他のサイクラーでの リアルタイムPCR / 2ステップRT-PCR	2
LightCycler 1.x および 2.0 を用いたリアルタイムPCR / 2ステップRT-PCR	5
トラブルシューティング	9



プロトコール： Applied Biosystems® Cyclor およびその他のサイクラーでのリアルタイム PCR / 2ステップ RT-PCR

本プロトコールは、ダブル標識プローブ (TaqMan®など) を用いて Applied Biosystems、Bio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Corbett、Eppendorf®、Roche®、Stratagene®社など殆どのリアルタイム用サーマルサイクラーで使用可能です。LightCycler® 1.xまたはLightCycler 2.0を使用される場合は、5ページのプロトコールに従ってください。

反応容量

殆どのリアルタイム用サーマルサイクラーで 50 µl の反応容量を使用します。しかし、Applied Biosystems 7500 Fast System あるいは SmartCycler® system を使用した場合は 25 µl に、LightCycler 480 を使用する場合は 10 µl に減らします。

反応容量を減らす場合は、反応で使用するマスターミックスの量も減らします：2x QuantiTect Probe PCR Master Mix の容量は常に最終反応容量の半分にします。さらに、プライマー、プローブ、テンプレート、UNG の濃度は表 1 に記載しているものと同じにします。

実験を始める前の重要事項

- 既に確立されたプライマー・プローブシステムを用いる場合でも、このプロトコールで決められているサイクリング条件で実験を始めてください。
- 配列特異的なプローブを用いた効率的なリアルタイム PCR には、ターゲットの長さを 100 ~ 150 bp にするのが理想です。
- HotStarTaq® DNA Polymerase を活性化するため、PCR の最初に必ず 95 °C で 15 分間のインキュベーションを行なってください。
- 毎回ランの解析ごとに threshold 値を調整します。
- 本キットは 50 µl の最終容量で最適化されています。50 µl 以外の反応量を使用する場合には、その量に応じて 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix の量を調節してください。
- 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix は dUTP を含んでいるので、uracil-N-glycosylase (UNG) を使用する前処理が可能です。
- Applied Biosystems 7500 を使用する際は、初期設定値の threshold 値を低く調節します。スタートポイントとして 0.01 を使用します。

操作手順

1. 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix (-20 °C で保存の場合)、テンプレート DNA あるいは cDNA、プライマーおよびプローブ溶液、RNase フリー水を解凍する。各溶液を混和する。

2. 表1に従って反応ミックスを調製する。

ホットスタートPCRなので、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 QuantiTect Probe PCR Master Mix中に既に含有されている4 mM Mg²⁺溶液で実験を始めることを推奨します。いくつかのターゲットではMg²⁺濃度を6 mMまで増やすことで、反応が改良されることがあります。

表1. 反応セットアップ

成分	容量/反応	最終濃度
2x QuantiTect Probe PCR Master Mix*	25 µl [†]	1x
プライマーA	適量	0.4 µM [‡]
プライマーB	適量	0.4 µM [‡]
プローブ	適量	0.1 ~ 0.2 µM
テンプレートDNAまたはcDNA (ステップ4で添加)	適量	≤500 ng/反応
RNase フリー水	適量	
オプション：Uracil-N-glycosylase (UNG)	適量	0.5 unit/反応
トータル反応容量	50 µl	

* 最終濃度 4 mMのMgCl₂含有

[†] 50 µl以外の反応量を使用する場合には、この式を使って2x master mixの量を計算してください：2x master mix (µl) の容量 = 0.5 x [トータルの反応容量 (µl)]

[‡] 最終プライマー濃度0.4 µMは殆どどのアプリケーションにも最適です。しかし、各々に最適なプライマー濃度は、0.4 µMから1 µMのプライマー濃度で決定してください。

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。

4. DNAあるいはcDNAテンプレート（反応あたり500 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。

2ステップRT-PCRには、テンプレートとして加えるcDNA（未希釈の逆転写反応液から）の量が最終PCR容量の10%を超えないようにします。

5. 表2に記載したプログラムのアウトラインに従って、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。

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てサイクリングプログラムをスタートする。

表2. リアルタイム用サーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度	コメント
オプション: UNG (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 産物の来雑を UNG が除去
PCR 初期活性化	15分	95℃	HotStarTaq DNA Polymerase はこの加熱ステップにより活性化
2ステップサイクリング			
変性*:	15秒	94℃	
アニーリング/ エクステンション:	60秒	60℃	蛍光データの収集を行なう
サイクル数:	35~45		サイクル数はテンプレート DNA 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。

プロトコール： LightCycler 1.xおよび 2.0を用いたリアルタイムPCR／2ステップRT-PCR

本プロトコールは、LightCycler 1.xおよびLightCycler 2.0のみを用いた実験に使用し、FRETプローブやダブル標識プローブ（TaqManなど）に最適です。その他のサイクラーに関しては、2ページのプロトコールに従って行ってください。

実験を始める前の重要事項

- 既に確立されたプライマー・プローブシステムを用いる場合でも、このプロトコールで決められているサイクリング条件で実験を始めてください。
- 配列特異的なプローブを用いた効率的なリアルタイムPCRには、ターゲットの長さを **100～150 bp** にするのが理想です。
- HotStarTaq DNA Polymeraseを活性化するため、PCRの最初に必ず **95℃で15分間のインキュベーション**を行なってください。
- データ解析には“second derivative maximum”法を推奨します。
- 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。
- 2x QuantiTect Probe PCR Master MixはdUTPを含んでいるので、uracil-N-glycosylase（UNG）を使用する前処理が可能です。

操作手順

1. **2x QuantiTect Probe PCR Master Mix**（-20℃で保存の場合）、**テンプレートDNA**あるいは**cDNA**、**プライマー**および**プローブ溶液**、**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なので、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 QuantiTect Probe PCR Master Mix中に既に含有されている4 mM Mg²⁺溶液で実験を始めることを推奨します。いくつかのターゲットではMg²⁺濃度を6 mMまで増やすことで、反応が改良されることがあります。

表3. 反応セットアップ

成分	容量/反応	最終濃度
2x QuantiTect Probe PCR Master Mix*	10 µl	1x
プライマー A	適量	0.5 µM†
プライマー B	適量	0.5 µM†
プローブ	適量	0.1 ~ 0.2 µM
テンプレート DNA または cDNA (ステップ 4 で添加)	適量	≤ 1 µg / 反応
RNase フリー水	適量	
オプション: Uracil-N-glycosylase (UNG)	適量	0.5 unit / 反応
トータル反応容量	20 µl	

* 最終濃度 4 mM の MgCl₂ 含有

† 最終プライマー濃度 0.5 µM は殆どどのアプリケーションにも最適です。しかし、各々に最適なプライマー濃度は、0.5 µM から 1 µM のプライマー濃度で決定してください。

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。
4. DNA あるいは cDNA テンプレート (反応あたり 1 µg 以下) を反応ミックスの入ったそれぞれの PCR キャピラリーに添加する。
2 ステップ RT-PCR には、テンプレートとして加える cDNA (未希釈の逆転写反応液から) の量が最終 PCR 容量の 10% を超えないようにします。
5. 表 4 (FRET プローブ) か表 5 (TaqMan その他のダブル標識プローブ) に記載したプログラムのアウトラインに従って、LightCycler のプログラミングを行なう。表 6 に従ってチャンネルをセットする。
6. PCR キャピラリーを LightCycler にセットして、サイクリングプログラムをスタートする。

表4. FRETプローブを用いたリアルタイム用サーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
オプション: UNG (キャリアオーバー防止)	2分	50℃	20℃/秒	キャリアオーバーしたdUMPを含むPCR産物の来雑をUNGが除去
PCR初期活性化	15分	95℃	20℃/秒	HotStarTaq DNA Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
3ステップサイクリング				
変性:	0秒	95℃	20℃/秒	
アニーリング:	30秒	50~60℃	20℃/秒	プライマーの T_m より約5~8℃低い温度。蛍光データの収集を行なう
エクステンション:	30秒	72℃	2℃/秒	
サイクル数:	35~55			サイクル数はテンプレートDNA量に依存

表5. TaqManおよびその他のダブル標識プローブ用リアルタイム用サーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
オプション: UNG (キャリアオーバー防止)	2分	50℃	20℃/秒	キャリアオーバーしたdUMPを含むPCR産物の来雑をUNGが除去
PCR初期活性化	15分	95℃	20℃/秒	HotStarTaq DNA Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
2ステップサイクリング				
変性:	0秒	95℃	20℃/秒	
アニーリング/ エクステンション:	60秒	60℃	20℃/秒	蛍光データの収集を行なう
サイクル数:	35~55			サイクル数はテンプレートDNA量に依存

表6. ラン (ディスプレイモード) 中およびデータ解析用のチャンネルセッティング

	検出 チャンネル	ディスプレイ モード	データ解析用 チャンネル
ダブル標識プローブ (FAM®)	F1	F1/1	F1/F2
ハイブリダイゼーションプローブ (LC-Red 640)	F2	F2/1	F2/F1
ハイブリダイゼーションプローブ (LC-Red 705)	F3	F3/1	F3/F1

トラブルシューティングガイド

コメント

PCRで産物がない、あるいは遅れて検出される

- | | | |
|----|--|---|
| a) | アニーリングステップ (FRETプローブおよび Molecular Beacons) あるいはアニーリング/エクステンションステップ (ダブル標識プローブ) が短すぎる | プロトコールで明記されているアニーリング時間あるいはアニーリング/エクステンション時間を常に用いる。いくつかのケース、特にLightCycler 1.xおよび2.0では、アニーリング時間を10秒間隔で増加させると、増幅が改善されることがある。 |
| b) | エクステンション時間が短すぎる (FRETプローブおよび Molecular Beacon) | 常にプロトコールに明記されたエクステンション時間を用いる。いくつかのケース、特にLightCycler 1.xおよび2.0では、時間を10秒間隔で増加させると、増幅が改善されることがある。 |
| c) | 検出ステップが間違っている | FRETプローブおよびMolecular Beaconを用いた場合にはアニーリングステップで、ダブル標識プローブを用いている場合にはアニーリング/エクステンションを組み合わせたステップで、蛍光検出が行なわれていることを確認する。 |
| d) | ピペット操作ミス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*。PCRをもう一度行なう。 |
| e) | HotStarTaq 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 DNA Polymerase活性化ステップ (95℃、15分) が含まれていることを確認する。 |
| f) | PCR産物が長すぎる | 最適な結果には、PCR産物は100～150 bpの長さにする。PCR産物の長さが60～300 bpを外れないようにする。 |
| g) | プライマー・デザインが最適でない | PCR産物をゲル電気泳動によりチェックする。特異的PCR産物が検出されない場合は、primer design guidelineを再考する*。 |

* 詳細は www.qiagen.com/resources/info の“リアルタイムPCRのガイドライン”を参照してください。

コメント

-
- | | | |
|----|----------------------------|---|
| h) | プライマー濃度が最適でない | 適切なプライマー濃度を用いる。
LightCycler 1.x および 2.0 : 各プライマーの濃度は 0.5 μM 。
その他のサイクラー : 各プライマーの濃度は 0.4 μM 。
いくつかのケースでは、プライマー濃度を最高 1 μM まで増やすと、結果が改良されることがある。
分光光度計でプライマー濃度をチェックする*。 |
| i) | Mg^{2+} 濃度が最適ではない | 常に 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix に添加されている Mg^{2+} 濃度 (最終濃度 4 mM) で始める。あるターゲットでは、 Mg^{2+} 濃度を最高 6 mM まで増やすと、改善される場合がある。0.5 mM 間隔の異なる濃度でテストする。 |
| j) | スタートテンプレートに問題 | スタートのテンプレートの濃度、保存条件、品質についてチェックする*。
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。これを用いて PCR を再度行なう。 |
| k) | スタートテンプレート量が不十分 | 可能な場合は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。 |
| l) | サイクル数が足りない | サイクル数を増やす。 |
| m) | プローブデザインが適正でない | 増幅反応しているのなら、プローブに問題のある可能性がある。probe design guideline を参照*。
Molecular Beacons を使用する場合は、プローブデザインに関する詳細は www.molecular-beacons.org を参照にする。 |
| n) | アニーリング温度が高い | アニーリング温度を 2°C ずつ下げる。 |
| o) | アニーリング温度が低すぎる | アニーリング温度を 2°C ずつ上げる。 |
| p) | 検出が活性化されていない | サイクリングプログラムで蛍光検出が有効かをチェックする。 |

* 詳細は www.qiagen.com/resources/info の "リアルタイムPCRのガイドライン" を参照にしてください。

コメント

- q) プローブ合成が適正でない DNase Iでインキュベートし、ダブル標識プローブあるいはMolecular Beaconの品質をチェックする。蛍光色素およびクエンチャーを含んだプローブが正しく合成されている場合には、DNase Iインキュベーション後に顕著な蛍光強度の増加が見られる。
- r) 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。
- s) **RT-PCRのみ**：添加した逆転写反応液量が多すぎる PCRに添加した逆転写反応液の量が多すぎると、増幅効率と反応の直線性は低下する。通常添加する逆転写反応液量（未希釈）は、最終PCR量の10%を超えてはならない。
- t) **RT-PCRのみ**：転写物が発現していない RT-PCR産物が存在しないのは増幅や検出に問題があるためではないことを確認するために、RT-PCRを繰り返して行ない、ポジティブコントロールも含める*。

LightCycler 1.x および 2.0 以外のリアルタイム用サーマルサイクラー：

- u) 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活性化されているか、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。

LightCycler 1.x および 2.0 のみ：

- v) 間違った検出チャンネルを選択した 正しい検出チャンネルが選択されていることを確認する（例；F1はFAM標識TaqManプローブ、あるいはMolecular Beacons用、F2はLC-Red 640標識FRETプローブ用、F3はLC-Red 705標識FRETプローブ用）。

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 推奨されたテンプレートの最大量を超えない。
LightCycler 1.x および 2.0：1 µg 以上のテンプレートを使用しない。
その他のサイクラー：500 ng 以上のテンプレートを使用しない。
- b) テンプレート量が少なすぎる 可能な場合にはテンプレートの量を増やす。
- c) **RT-PCRのみ**：添加した逆転写反応液量が多すぎる PCRに加える逆転写反応液の量が多いと、増幅効率が低下する。一般に、逆転写反応液量（未希釈）はPCR最終反応量の10%を超えないようにする。

* 詳細は www.qiagen.com/resources/info/ の“リアルタイムPCRのガイドライン”を参照してください。

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 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。新しい試薬でアッセイをもう一度繰り返す。
- b) 反応セットアップ中にコンタミネーション フィルター付チップを使用するなど、反応セットアップ中に適切な安全対策を講じる。
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。

“No Reverse Transcription” コントロールで高い蛍光強度（RT-PCRのみ）

ゲノムDNAがRNA
サンプルにコンタミ

cDNA ターゲットのみを増幅・検出するために、エキソン/エキソン境界にかかるプライマーおよび/あるいはプローブをデザインする。

ゲノムDNAの除去とcDNA合成を一緒に行なえる QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて逆転写反応を行なう。あるいはコンタミしているゲノムDNAを分解するためにRNAサンプルをDNase処理する。

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が較正されていない 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。

すべてのサイクラーシステム：

- c) 高濃度のテンプレートで波状のカーブ Analysis Setting 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。

ABI PRISM® 7000のみ：

- d) 曲線が滑らかでない、あるいは標準偏差値が高い 反応液量は 25 µl 以上にする。プレートの蓋に optical adhesive cover を必ず使用する。反応液量を 50 µl に増加すると、結果が改良されることがある。
ハロゲンランプが古い。3ヶ月ごと（あるいは2,000時間使用後）に変換する。

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
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) 検出チャンネルを
間違えている 正しいチャンネルを選択したことを確認する。

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

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 (QuantiTect Probe PCR 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.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE.

This product (QuantiTect Probe PCR Kit) 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.

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。

© 2002–2009 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

