

# PyroMark™ OneStep RT-PCR プロトコールとトラブルシューティング

パイロシークエンス (Pyrosequencing®) 解析用に  
至適化された感度と精度の高い 1 ステップ RT-PCR

目次	ページ
プロトコール	
PyroMark OneStep RT-PCR Master Mix を用いた 1 ステップ RT-PCR	2
PyroMark OneStep RT-PCR Master Mix および Q-Solution を用いた 1 ステップ RT-PCR	7
トラブルシューティング	12



# プロトコール：PyroMark OneStep RT-PCR Master Mix を用いた 1 ステップ RT-PCR

パイロシーケンス解析用テンプレート DNA を作製するための 1 ステップ RT-PCR のガイドラインとしてこのプロトコールを使用します。逆転写反応および PCR 反応は同一チューブ内で逐次的に行なわれます。両方の反応に必要な全ての成分はセットアップ中に添加するので、一旦反応を開始した後は何も添加する必要はありません。本プロトコールは 1 pg ~ 2 µg のトータル RNA に最適です。

## 実験を始める前の重要事項

- パイロシーケンス解析で使用する一本鎖 RT-PCR 産物を調製するために、プライマーペアの片方の 5' 末端がビオチン標識されていなければなりません。ビオチン標識プライマーの精製には HPLC あるいはこれに相当する操作を推奨します。
- プライマーのデザインには PyroMark Assay Design Software 2.0 を推奨します。
- パイロシーケンス解析に最適な RT-PCR 産物の長さは 80 ~ 200 bp ですが、最高 500 bp の産物でも良好な結果が得られることがあります。
- QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix に添付の HotStarTaq® DNA Polymerase は 95℃、15 分間の活性化が必要です (5 ページ、表 2)。このインキュベーションにより逆転写酵素は不活化されます。逆転写酵素反応が終了するまで HotStarTaq DNA Polymerase を加熱により活性化しないでください。
- 全ての PCR 反応液調製操作は、氷上で行なってください。
- サンプルをセットする前にサーマルサイクラーが 50℃に予熱されていることを確認してください。
- QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer では、最終反応ミックスの MgCl<sub>2</sub> 最終濃度は 2.5 mM です。ほとんどの場合、この濃度で満足できる結果が得られます。
- RNA 分離および反応溶液のセットアップは RNase フリーの状態で行なってください。
- RNA あるいは DNA の調製や PCR 産物の解析を行なう場所から離れたところで全ての反応液のセットアップを行ないます。
- クロスコンタミを最小限にするため疎水性フィルター付きの使い捨てチップを使用してください。

## 操作手順

1. テンプレート RNA、プライマー溶液、dNTP Mix、QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer、CoralLoad® Concentrate および RNase フリー水を解凍し、氷上に置く。

塩濃度が均一になるように各溶液を使用直前に十分に混和します。

2. 表 1 に従ってマスターミックスを調製する。

マスターミックスにはテンプレート RNA 以外の RT-PCR に必要な全ての成分が入っています。反応ミックスの容量は、実施する全反応数に必要な量の 10% 増で調製します。

注：他の反応容量を使用する場合は、各成分を適宜調節します。

表 1. PyroMark OneStep RT-PCR Master Mix の成分

成分	容量／反応	最終濃度
<b>反応ミックス</b>		
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer、5x*	5 µl	1x
dNTP Mix	1.0 µl	400 µM each
CoralLoad Concentrate、10x	2.5 µl	1x
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1.0 µl	-
プライマー A	適量	0.6 µM †
プライマー B	適量	0.6 µM †
RNase フリー水	適量	-
RNase Inhibitor ‡	適量	5 ~ 10 U／反応
<b>テンプレート RNA</b>		
テンプレート RNA、 ステップ 4 で添加	適量	1 pg ~ 2 µg／反応
<b>トータル容量</b>	<b>25 µl</b>	

\* 12.5 mM MgCl<sub>2</sub> 含有

† 0.6 µM のプライマー最終濃度は、ほとんどのプライマー／テンプレート系で最適である。しかしその他のプライマー濃度（例；0.5 ~ 1.0 µM）で増幅が改善されることがある。

‡ バッファー成分が RNase 阻害能をもっているため、RNase 阻害剤はオプションで使用する。

3. 緩やかなピペティングでマスターミックスを完全に混和し、PCR チューブに適量を分注する。
4. 各 PCR チューブにテンプレート RNA ( $\leq 2 \mu\text{g}$  / 反応) を添加する。  
PyroMark OneStep RT-PCR Kit はトータル RNA、メッセンジャー RNA あるいはウイルス RNA のいずれにも使用可能です。
5. 加熱蓋がないサーマルサイクラーの場合、約 50  $\mu\text{l}$  のミネラルオイルを反応液に重層する。あるいはステップ 6 に進む。
6. サーマルサイクラーを表 2 (5 ページ) に従ってプログラムする。
7. PCR チューブはまだ氷上に置いたままで RT-PCR プログラムをスタートする。サーマルサイクラーが 50°C に達するまで待ってからサーマルサイクラーに PCR チューブをセットする。

注：増幅後サンプルは 2 ~ 8°C で一晩、-20°C で長期間保存できます。

表 2. サーマルサイクリングプログラム

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	30 分	50℃	逆転写反応は 50℃を推奨する。しかし 50℃で満足する結果が得られない場合、反応温度を 60℃まで上げてみる。
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。Omniscript® および Sensiscript® Reverse Transcriptase は不活化され、cDNA テンプレートは変性される。
<b>3 ステップサイクリング：</b>			
変性	30 秒	94℃	
アニーリング	30 秒	60℃	PyroMark Assay Design Software 2.0 でデザインしたプライマーを用いる際に推奨するアニーリング温度。使用するプライマーの $T_m$ 値より 5℃低い温度でアニーリングする。目的の RT-PCR 産物に特異性の高いアニーリング温度を使用する。
伸長	30 秒	72℃	
サイクル数	45		
最終伸長	10 分	72℃	

**8. パイロシークエンス解析には 25  $\mu$ l の PCR 産物のうち 5 ~ 20  $\mu$ l を使用する。**

PyroMark Q96 MD および PyroMark Q24 装置を使用する場合は 5 ~ 10  $\mu$ l、PyroMark Q96 ID 装置を使用する場合は 10 ~ 20  $\mu$ l の RT-PCR 産物で、ほとんどの場合に良好な解析結果が得られます。必要に応じて装置のユーザーマニュアル記載の方法に従って RT-PCR 産物量を調節します。

パイロシークエンス解析前に、QIAxcel™ による高速ゲル電気泳動解析あるいはアガロースゲル解析で PCR 産物の品質チェックを推奨します。CoralLoad Concentrate を用いた場合、RT-PCR 産物を直接アガロースゲルにロードできます。ローディング・バッファーおよびマーカー色素を RT-PCR 産物に添加する必要はありません。QIAxcel システムは、1 回の操作で最高 96 個までのサンプルのアプライと解析の完全自動化を実現します。

CoralLoad Concentrate にはゲルローディング試薬と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関係は表 3 を参照してください。括弧内の数値は TBE アガロースゲルを使用した場合に相当します。

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。

**表 3. CoralLoad 中の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 : PyroMark OneStep RT-PCR Master Mix および Q-Solution を用いた 1 ステップ RT-PCR

本プロトコールは Q-Solution を使用した 1 ステップ RT-PCR 用にデザインされています。Q-Solution は核酸変性の挙動を変え、標準的な条件では増幅されない RT-PCR システムに有用です。Q-Solution を特殊なプライマー/テンプレート系に初めて使用する場合は、Q-Solution を使用、未使用の反応を同時に常に並行して行なってください。特殊なプライマー/テンプレート系で、以前 DMSO のような他の RT-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 を使用した場合、それぞれの RT-PCR アッセイにおいて次のような影響が観察されることがあります (図 1)。

**ケース A :** Q-Solution により、以前成功しなかった増幅反応が可能になる。

**ケース B :** Q-Solution により、ある種のプライマー/テンプレート DNA 系で RT-PCR の特異性が増大する。

**ケース C :** Q-Solution が RT-PCR の結果に影響しない。

**ケース D :** Q-Solution によりこれまで成功した増幅反応が失敗、あるいは増幅効率低下する。この場合のように Q-Solution の添加がプライマー/テンプレート DNA のアニーリングを妨害することもある。そのため Q-Solution を特定のプライマーとテンプレート DNA の組み合わせで初めて使用する際は、Q-Solution 添加の反応と未添加の反応を常に並行して行なう。

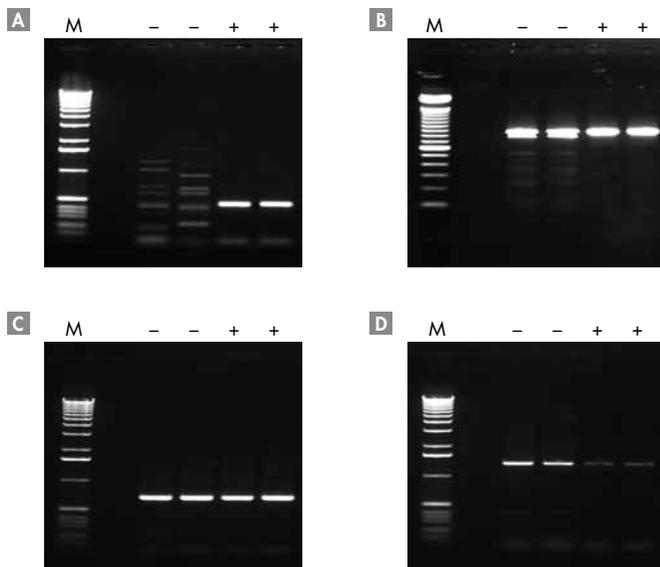


図 1. Q-Solution を用いた効果

M : markers ; - : without Q-Solution ; + : with Q-Solution.

## 実験を始める前の重要事項

- 初めてのプライマー／テンプレート系に Q-Solution を使用する場合には、必ず Q-Solution を添加および未添加の増幅反応を並行して行ないます。
- パイロシーケンス解析で使用する一本鎖 RT-PCR 産物を調製するために、プライマーペアの片方の 5' 末端がビオチン標識されていなければなりません。ビオチン標識プライマーの精製には HPLC あるいはこれに相当する操作を推奨します。
- プライマーのデザインには PyroMark Assay Design Software 2.0 を推奨します。
- パイロシーケンス解析に最適な RT-PCR 産物の長さは 80 ~ 200 bp ですが、最高 500 bp の産物でも良好な結果が得られることがあります。
- QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix に添付の HotStarTaq DNA Polymerase は 95℃、15 分間の活性化が必要です (9 ページ、表 4)。このインキュベーションにより逆転写酵素は不活性化されます。逆転写酵素反応が終了するまで HotStarTaq DNA Polymerase を加熱により活性化しないでください。
- 全ての PCR 反応液調製操作は、氷上で行なってください。
- サンプルをセットする前にサーマルサイクラーが 50℃ に予熱されていることを確認してください。
- QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer では、最終反応ミックスの MgCl<sub>2</sub> 最終濃度は 2.5 mM です。ほとんどの場合、この濃度で満足できる結果が得られます。
- RNA 分離および反応溶液のセットアップは RNase フリーの状態で行ってください。
- RNA あるいは DNA の調製や PCR 産物の解析を行なう場所から離れたところで全ての反応液のセットアップを行ないます。
- クロスコンタミを最小限にするため疎水性フィルター付きの使い捨てチップを使用してください。

## 操作手順

1. テンプレート RNA、プライマー溶液、dNTP Mix、QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer、CoralLoad Concentrate、Q-Solution および RNase フリー水を解凍し、氷上に置く。塩濃度が均一になるように各溶液を使用直前に十分に混和します。
2. 表 4 に従ってマスターミックスを調製する。  
マスターミックスにはテンプレート RNA 以外の RT-PCR に必要な全ての成分が含まれています。反応ミックスの容量は、実施する全反応数に必要な量の 10%増で調製します。  
注：他の反応容量を使用する場合は、各成分を適宜調節します。

表 4. PyroMark OneStep RT-PCR Master Mix および Q-Solution の成分

成分	容量／反応	最終濃度
<b>マスターミックス</b>		
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer、5x*	5 µl	1x
dNTP Mix	1.0 µl	400 µM each
Q-Solution、5x	5.0 µl	1x
CoralLoad Concentrate、10x	2.5 µl	1x
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1.0 µl	-
プライマー A	適量	0.6 µM †
プライマー B	適量	0.6 µM †
RNase フリー水	適量	-
RNase Inhibitor (オプション) ‡	適量	5 ~ 10 U / 反応
<b>テンプレート RNA</b>		
テンプレート RNA、 ステップ 4 で添加	適量	1 pg ~ 2 µg / 反応
<b>トータル容量</b>	<b>25 µl</b>	

\* 12.5 mM MgCl<sub>2</sub> 含有

† 0.6 µM のプライマー最終濃度は、ほとんどのプライマー／テンプレート系で最適である。しかしその他のプライマー濃度（例；0.5 ~ 1.0 µM）で増幅が改善されることがある。

‡ バッファー成分が RNase 阻害能をもっているため、RNase 阻害剤はオプションで使用する。

3. 緩やかなピペティングでマスターミックスを完全に混和し、PCR チューブに適量を分注する。
4. 各 PCR チューブにテンプレート RNA (≤2 µg / 反応) を添加する。  
PyroMark OneStep RT-PCR Kit はトータル RNA、メッセンジャー RNA あるいはウイルス RNA のいずれにも使用可能です。
5. 加熱蓋がないサーマルサイクラーの場合、約 50 µl のミネラルオイルを反応液に重層する。あるいはステップ 6 に進む。
6. サーマルサイクラーを表 5 (10 ページ) に従ってプログラムする。

7. 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。サーマルサイクラーが 50℃に達するまで待ってからサーマルサイクラーに PCR チューブをセットする。

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。

表 5. サーマルサイクリングプログラム

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	30 分	50℃	逆転写反応は 50℃を推奨する。しかし 50℃で満足する結果が得られない場合、反応温度を 60℃まで上げてみる。
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。Omniscript および Sensiscript Reverse Transcriptase は不活化され、cDNA テンプレートは変性される。
<b>3 ステップサイクリング：</b>			
変性	30 秒	94℃	
アニーリング	30 秒	60℃	PyroMark Assay Design Software 2.0 でデザインしたプライマーを用いる際に推奨するアニーリング温度。使用するプライマーの $T_m$ 値より 5℃低い温度でアニーリングする。目的の RT-PCR 産物に特異性の高いアニーリング温度を使用する。
伸長	30 秒	72℃	
サイクル数	45		
最終伸長	10 分	72℃	

**8. パイロシークエンス解析には 25 µl の PCR 産物のうち 5 ~ 20 µl を使用する。**

PyroMark Q96 MD および PyroMark Q24 装置を使用する場合は 5 ~ 10 µl、PyroMark Q96 ID 装置を使用する場合は 10 ~ 20 µl の RT-PCR 産物で、ほとんどの場合に良好な解析結果が得られます。必要に応じて装置のユーザーマニュアル記載の方法に従って RT-PCR 産物量を調節します。

パイロシークエンス解析前に、QIAxcel による高速ゲル電気泳動解析あるいはアガロースゲル解析で PCR 産物の品質チェックを推奨します。CoralLoad Concentrate を用いた場合、RT-PCR 産物を直接アガロースゲルにロードできます。ローディング・バッファーおよびマーカー色素を RT-PCR 産物に添加する必要はありません。QIAxcel システムは、1 回の操作で最高 96 個までのサンプルのアプライと解析の完全自動化を実現します。

CoralLoad Concentrate にはゲルローディング試薬と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。括弧内の数値は TBE アガロースゲルを使用した場合に相当します。

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。

**表 6. CoralLoad 中の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

## コメント

### RT-PCR 産物がないか、ほとんどない

- |    |                                      |   |
|----|--------------------------------------|---|
| a) | ピペッティングエラー、あるいは試薬の入れ忘れ               | プライマーや dNTP Mix を含む試薬の濃度および保存条件をチェックする。RT-PCR をやり直す。  |
| b) | HotStarTaq 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ルの表 2 あるいは表 5 (5、10 ページ) に記述されている HotStarTaq DNA Polymerase 活性化ステップ (95°C、15 分) が含まれているかどうか確認する。  |
| c) | HotStarTaq DNA Polymerase 活性化が早すぎる   | サイクリングプログラムをチェック。HotStarTaq DNA Polymerase を活性化 (95°C、15 分) する前に逆転写反応が完了していること (50°C、30 分) を確認する。   |
| d) | 逆転写反応の温度が適切でない                       | 逆転写反応は 50°C を推奨する。しかし 50°C で満足する結果が得られない場合、反応温度を 45 ~ 60°C に変更してみる。   |
| e) | プライマー濃度が適切でない、あるいはプライマーが分解           | 必ず 0.6 $\mu\text{M}$ のプライマー濃度を用いることを推奨。しかしこの濃度で良い結果が得られない場合、プライマー濃度を 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{M}$ の間で 0.1 $\mu\text{M}$ 間隔の異なる濃度に変えて RT-PCR を繰り返す。特に高感度の RT-PCR を行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲル * でプライマーの分解の可能性をチェックする。 |
| f) | RT-PCR 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 RT-PCR を繰り返す。7 ページのプロトコルに従う。  |
| g) | ヌクレオチド濃度が適切でない                       | 各 dNTP とも 0.4 mM で使用する。ヌクレオチド濃度が異なると RT-PCR 産物量が減少することがある。  |
| h) | スタートテンプレートに問題                        | スタートテンプレート RNA の濃度、完全性、純度および保存条件をチェックする (英語版 Handbook 29 ページ、Appendix A 参照)。必要な場合には、テンプレート RNA のストック溶液を新しく段階希釈する。新しい希釈液を用いて RT-PCR を繰り返す。   |

\* 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

---

- i) 酵素の濃度が低すぎる 25  $\mu$ l 反応液あたり 1  $\mu$ l の QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix を使用したことを確認する。
- j) PCR アニーリング温度あるいは時間が不適切 アニーリング温度を 2℃ 間隔で下げる。アニーリング時間を 30 秒にする。複雑な RT-PCR 系の中にはアニーリング時間を 60 秒に延ばすと改善されることがある。最適なアニーリング温度の決定は困難であるが、アニーリング温度のグラジエント PCR を行なうことで多くの場合解決できる。
- k) 変性温度あるいは時間が不適切 変性は 94℃ で 30 秒間行なう。複雑な RT-PCR 系の中にはアニーリング時間を 60 秒に延ばすと改善されることがある。サイクリングプログラムにプロトコルの表 2 あるいは表 5 (5、10 ページ) に記述されている HotStarTaq DNA Polymerase 活性化ステップ (95℃、15 分) が含まれているかどうか確認する。
- l) スタートテンプレート量が不十分 テンプレート量を増加する。不可能であれば nested-PCR を使用して 2 回目の PCR を行なう。
- m) 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 31 ページ、Appendix B 参照)。遺伝子特異的プライマーのみを使用する。ランダムオリゴマーあるいは oligo-dT プライマーを使用しない。プライマーデザインには、PyroMark Assay Design Software 2.0 を使用することを強く推奨する。
- n) 加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用した際に、ミネラルオイルを反応溶液の上に重層した 加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用する際は、RT-PCR 産物の収量が減少するのでミネラルオイルを反応液に重層しない。
- o) サーマルサイクラーの問題 サーマルサイクラーが稼動しているか、正しくプログラムされているかチェックする。

## コメント

### 複数の増幅産物が得られる

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| a) 室温 (15 ~ 25°C) で反応セットアップした | 不完全な cDNA 合成を避けるため RT-PCR セットアップは必ず氷上で行なう。   |
| b) 逆転写反応のスタート条件が不適切           | サンプルをサーマルサイクラーに入れる前にサイクラーが 50°C に予熱されていることを確認する。   |
| c) 逆転写反応の温度が低すぎる              | 逆転写反応は 50°C を推奨する。しかし 50°C で満足する結果が得られなかった場合、反応温度を 2°C ずつ 60°C まで上げてみる。  |
| d) RT-PCR 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 RT-PCR を繰り返す。7 ページのプロトコールに従う。  |
| e) PCR アニーリング温度が低すぎる          | アニーリング温度を 2°C 間隔で上げる。最適なアニーリング温度の決定は困難であるが、アニーリング温度のグラジエント PCR を行なうことで多くの場合解決できる。  |
| f) プライマー濃度が適切でない、あるいはプライマーが分解 | 必ず 0.6 $\mu\text{M}$ のプライマー濃度を用いることを推奨。しかしこの濃度で良い結果が得られない場合、プライマー濃度を 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{M}$ の間で 0.1 $\mu\text{M}$ 間隔の異なる濃度に変えて RT-PCR を繰り返す。特に高感度の RT-PCR を行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲル* でプライマーの分解の可能性をチェックする。 |
| g) 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 31 ページ、Appendix B 参照)。遺伝子特異的プライマーのみを使用する。ランダムオリゴマーあるいは oligo-dT プライマーを使用しない。プライマーデザインには、PyroMark Assay Design Software 2.0 を使用することを強く推奨する。                                |
| h) ゲノム DNA のコンタミ              | スタートテンプレート RNA を DNase I で処理する。あるいはゲノム DNA からの増幅を避けるためにターゲット mRNA のプライス部位に位置するプライマーを使用する。  |

\* 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

---

### スミアな増幅産物が得られる

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| a) スタートテンプレート量が多すぎる           | スタートテンプレート RNA の濃度をチェックする (英語版 Handbook 29 ページ、Appendix A 参照)。必要な場合には、テンプレート RNA のストック溶液を新しく段階希釈する。新しい希釈液を用いて RT-PCR を繰り返す。   |
| b) キャリーオーバーによるコンタミ            | ネガティブコントロール (テンプレート RNA を含まない) が RT-PCR 産物あるいはスミアを示す場合には全ての試薬を交換する。クロスコンタミを最小限にするため疎水性フィルター付きの使い捨てピペットチップを使用する。RNA あるいは DNA の調製や PCR 産物の解析を行なう場所から離れたところで全ての反応液のセットアップを行なう。           |
| c) 室温 (15 ~ 25°C) で反応セットアップした | 不完全な cDNA 合成を避けるため RT-PCR セットアップは必ず氷上で行なう。  |
| d) 逆転写反応のスタート条件が適切でない         | サンプルをサーマルサイクラーにセットする前にサイクラーが 50°C に予熱されていることを確認する。  |
| e) RT-PCR 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 RT-PCR を繰り返す。7 ページのプロトコールに従う。   |
| f) 酵素の濃度が高すぎる                 | 25 $\mu$ l 反応液あたり 1 $\mu$ l の QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix を使用したことを確認する。  |
| g) サイクル数が多すぎる                 | サイクル数を 3 サイクルずつ減らす。   |
| h) 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 31 ページ、Appendix B 参照)。遺伝子特異的プライマーのみを使用する。ランダムオリゴマーあるいは oligo-dT プライマーを使用しない。プライマーデザインには、PyroMark Assay Design Software 2.0 を使用することを強く推奨する。               |
| i) プライマー濃度が適切でない、あるいはプライマーが分解 | 必ず 0.6 $\mu$ M のプライマー濃度を用いることを推奨。しかしこの濃度で良い結果が得られない場合、プライマー濃度を 0.5 ~ 1.0 $\mu$ M の間で 0.1 $\mu$ M 間隔の異なる濃度に変えて RT-PCR を繰り返す。特に高感度の RT-PCR を行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲル * でプライマーの分解の可能性をチェックする。 |

\* 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

---

### パイロシーケンス解析でピークが低い／ない

- |  |  |
|--|--|
| a) プライマーが十分でない、あるいはピオチン標識されていない            | RT-PCR プライマーの品質が高いことを確認する (HPLC 精製済みのピオチン標識 プライマーを使用)。パイロシーケンス解析用の一本鎖テンプレートを調製する際ストレプトアビジンでコーティングされたビーズに固定化するので、PCR プライマーペアの片方がピオチン標識されていないと確認する。                        |
| b) シークエンシング用プライマーがピオチン標識したテンプレート鎖にマッチしていない | シークエンシング用プライマーがピオチン標識したテンプレート鎖に結合することを確認する。  |
| c) パイロシーケンス解析用テンプレートの品質が低い                 | ほとんどの場合、推奨した RT-PCR 条件で高品質のパイロシーケンス解析用テンプレートが得られる。必要ならば RT-PCR を至適化する。しかし、アガロースゲル解析あるいは QIAxcel による高速ゲル電気泳動解析で RT-PCR 産物を確認することを推奨。パイロシーケンス解析に十分量のシングルバンドのテンプレートを使用すること。 |
| d) アッセイデザインが最適でない                          | プライマーのデザインや方向性を正しく設計するため、RT-PCR およびシークエンシング用プライマーのデザインに PyroMark Assay Design Software 2.0 の使用を強く推奨する。   |
| e) サンプル調製およびパイロシーケンス解析のワークフローに関連するエラー      | 使用している PyroMark 装置のユーザーマニュアルを参照する。   |

### パイロシーケンス解析結果が良好でない、あるいは失敗

- a) RT-PCR からのコンタミがバックグラウンドにある

QIAxcel あるいはアガロースゲルで RT-PCR 産物をチェックして、特異的な RT-PCR 産物が 1 種類しかないことを確認する。非特異的なシーケンス・シグナルは次のような様々な事柄が原因になり得る：

- シークエンシング用プライマーおよび／あるいはピオチン標識プライマーがダイマーを形成
- ピオチン標識プライマーのヘアピン構造形成および／あるいはパイロシーケンス用テンプレートでループ構造形成
- シークエンシング用プライマーとピオチン標識 PCR プライマー間でのアニーリング
- シークエンシング用プライマーがパイロシーケンス解析用テンプレートに非特異的にアニーリング

初めてアッセイを行なう場合は次のコントロール実験を必ず行なう：

- RNA 未添加の RT-PCR
- シークエンシング用プライマーのみ
- シークエンシング用プライマー未添加のテンプレート

詳細は PyroMark 装置に添付のユーザーマニュアルを参照する。

パイロシーケンス解析のための RT-PCR およびシークエンシング用プライマーのデザインには PyroMark Assay Design Software 2.0 を使用することを推奨。



— Memo —

---

Trademarks: QIAGEN®, QIAxcel™, Coralload®, HotStarTaq®, Omniscript®, PyroMark™, Pyrosequencing®, Q-Solution™, Sensiscript® (QIAGEN Group); 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。

© 2010 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.co.jp](http://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](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

