

## QuantiTect<sup>®</sup> Multiplex RT-PCR プロトコールとトラブルシューティング

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

QuantiTect Multiplex RT-PCR NR Kit — ROX passive reference dye を含まないマスターミックス添付

配列特異的プローブを用いた1ステップのマルチプレックス・リアルタイム定量RT-PCRによる遺伝子発現解析



# 目次

## プロトコール

1 : Applied Biosystems Cyclor用のDuplex RT-PCR	3
2 : Applied Biosystems Cyclor用のTriplexおよび4-plex RT-PCR	7
3 : LightCycler 2.0用のMultiplex RT-PCR	11
4 : その他のサイクラー用のDuplex RT-PCR	15
5 : その他のサイクラー用のTriplexおよび4-plex RT-PCR	19
トラブルシューティング	23

# プロトコール1：Applied Biosystems® Cycloer用の Duplex RT-PCR

本プロトコールは遺伝子発現解析用に至適化され、**QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit**とTaqMan®プローブをApplied Biosystemsのリアルタイム用サーマルサイクラーで使用する目的で作成されています。このプロトコールでは、ROX passive reference dyeの存在下でduplex RT-PCRを行ないます。

## 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、個々のアッセイでプライマー／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薦めします。
- 英語版 Handbook 14 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 RT-PCR アッセイを用いる場合には、その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。
- 逆転写反応後に、HotStarTaq® DNA Polymerase を活性化するため、PCR で最初に必ず **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。
- 2x QuantiTect Multiplex RT-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。しかしその際は熱感受性 UNG のみを使用してください。
- **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、すべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとの設定（ベースラインと threshold 値など）を各ランで再調整する必要があります。

## 実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、各ターゲット毎に特異的なプライマーとプローブの両方を含む 20x プライマー／プローブミックス溶液を調製することを推奨します。Duplex RT-PCR 用に推奨の 20x プライマー／プローブミックスは、TE バッファー中に 8 μM の forward primer、8 μM の reverse primer、4 μM のプローブの濃度になります。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 63 ページ、Appendix D をご覧ください。

## 操作手順

1. **2x QuantiTect Multiplex RT-PCR Master Mix**、RNAテンプレート、プライマーとプローブ溶液、RNaseフリー水を融解する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect Multiplex RT Mix**は使用直前に-20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに-20℃に戻す。

2. 表 16 (5 ページ) に従って反応ミックスを調製する。

注：反応ミックス調製中はサンプルを氷上で保冷します。

注：2x QuantiTect Multiplex RT-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。いくつかのターゲットでは  $Mg^{2+}$  最終濃度を 0.5 ~ 1 mM まで増加して反応が改良されることがあります。

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

注：チューブあるいはプレートを氷上に置きます。

4. RNA テンプレート ( $\leq 250$  ng/50  $\mu$ l 反応液) を個々の PCR チューブあるいはウェルに添加する。

注：リアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミングの間、チューブあるいはプレートを氷上で保冷します。

5. 表 17 (6 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。**UNG** 処理を行なう際は、氷上でサンプルを少なくとも 5 分間インキュベートする。

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；同一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ごと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レポーター色素ごとのキャリブレーション操作が必要になることがあります。

6. PCR チューブあるいはプレートを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) をプローブごとに選択します。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。

注：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。

表 16. 反応セットアップ

成分	容量 *	最終濃度
2x QuantiTect Multiplex RT-PCR Master Mix	25 $\mu$ l	1x
20x プライマー／プローブミックス 1 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M forward primer 1 <sup>†</sup> 0.4 $\mu$ M reverse primer 1 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 1 <sup>§</sup>
20x プライマー／プローブミックス 2 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M forward primer 2 <sup>†</sup> 0.4 $\mu$ M reverse primer 2 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 2 <sup>§</sup>
QuantiTect Multiplex RT Mix	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l/反応
RNase フリー水	適量	-
オプション：Uracil-N-glycosylase、熱感受性	適量	2 units / 反応 <sup>¶</sup>
RNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	$\leq$ 250 ng / 反応
<b>トータル反応容量</b>	<b>50 <math>\mu</math>l*</b>	-

\* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 50  $\mu$ l 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する。ABI PRISM® 7900 で 384 ウェルプレートを用いる場合には、20  $\mu$ l の反応量を使用。

<sup>†</sup> Duplex RT-PCR 用の 20x プライマー／プローブミックスの組成は、TE バッファー中に 8  $\mu$ M の forward primer、8  $\mu$ M の reverse primer、4  $\mu$ M のプローブ。

<sup>‡</sup> 最終プライマー濃度は 0.4  $\mu$ M が最適。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する。

<sup>§</sup> プローブの最終濃度は 0.2  $\mu$ M でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によるが、濃度は 0.1 ~ 0.4  $\mu$ M の間最適。

<sup>¶</sup> Uracil-N-glycosylase の活性はメーカーにより異なることがあるが、濃度は 1 ~ 3 units / 50  $\mu$ l 反応液が最適。

表 17. サイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	20分	50℃	RNAはcDNAに逆転写される
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
<b>2ステップサイクリング</b>			<b>重要：以下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</b>
変性：	45秒	94℃	
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中の蛍光取り込み
サイクル数	40～50		サイクル数はRNAテンプレートおよびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

## プロトコール2： Applied Biosystems Cyclor用の Triplex および 4-plex RT-PCR

本プロトコールは遺伝子発現解析用に至適化され、**QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit**と TaqMan プローブを Applied Biosystems のリアルタイム用サーマルサイクラーで使用する目的で作成されています。このプロトコールでは、ROX passive reference dye の存在下で triplex/4-plex RT-PCR を行ないます。

注：サイクラーの特性により、4-plex RT-PCR は Applied Biosystems 7500 でのみ可能です。

### 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やプライマー濃度は、duplex アッセイプロトコール（3 ページ）で記載されているものとは異なります。
- 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、個々のアッセイでプライマー/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 14 ページの “Guidelines for effective multiplex PCR” をお読みください。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 multiplex リアルタイム RT-PCR アッセイを用いる場合には、その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。
- 逆転写反応後に、HotStarTaq DNA Polymerase を活性化するため、PCR で最初に必ず **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。
- 2x QuantiTect Multiplex RT-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。しかしその際は熱感受性 UNG のみを使用してください。
- **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、すべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとの設定（ベースラインと threshold 値など）を各ランで再調整する必要があります。

### 実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、各ターゲット毎に特異的なプライマーとプローブの両方を含む 20x プライマー/プローブミックス溶液を調製することを推奨します。Triplex および 4-plex RT-PCR 用に推奨の 20x プライマー/プローブミックスは、TE バッファー中に 4 μM の forward primer、4 μM の reverse primer、4 μM のプローブの濃度になります。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 63 ページ、Appendix D をご覧ください。

## 操作手順

1. **2x QuantiTect Multiplex RT-PCR Master Mix**、RNAテンプレート、プライマーとプローブ溶液、RNaseフリー水を融解する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect Multiplex RT Mix**は使用直前に-20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに-20℃に戻す。

2. 表 18 (9 ページ) に従って反応ミックスを調製する。

注：反応ミックス調製中はサンプルを氷上で保冷します。

注：2x QuantiTect Multiplex RT-PCR Master Mixに添加されている至適化済みのMg<sup>2+</sup>濃度で実験を始めることを強くお勧めします。いくつかのターゲットではMg<sup>2+</sup>最終濃度を0.5～1 mMまで増加して反応が改良されることがあります。

3. マスターミックスを完全に攪拌混和し、PCRチューブあるいはPCRプレートのウェルに適切な量を分注する。

注：チューブあるいはプレートを氷上に置きます。

4. RNAテンプレート (≤250 ng/50 µl 反応液) を個々のPCRチューブあるいはウェルに添加する。

注：リアルタイムサイクラーのプログラミングの間、チューブあるいはプレートを氷上で保冷します。

5. 表 19 (10 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。**UNG** 処理を行なう際は、氷上でサンプルを少なくとも5分間インキュベートする。

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ごと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レポーター色素ごとのキャリブレーション操作が必要になることがあります。

6. PCRチューブあるいはプレートを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) をプローブごとに選択します。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。

注：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。

表 18. 反応セットアップ

成分	容量 *	最終濃度
2x QuantiTect Multiplex RT-PCR Master Mix	25 $\mu$ l	1x
20x プライマー／プローブミックス 1 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 1 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 1 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 1 <sup>§</sup>
20x プライマー／プローブミックス 2 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 2 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 2 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 2 <sup>§</sup>
20x プライマー／プローブミックス 3 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 3 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 3 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 3 <sup>§</sup>
<b>4-plex RT-PCRのみ：</b>		
20x プライマー／プローブミックス 4 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 4 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 4 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 4 <sup>§</sup>
QuantiTect Multiplex RT Mix	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l/反応
RNase フリー水	適量	-
オプション：Uracil-N-glycosylase、熱感受性	適量	2 units / 反応 <sup>¶</sup>
RNA テンプレート (ステップ 4 で添加)	適量	$\leq$ 250 ng / 反応
<b>トータル反応容量</b>	<b>50 <math>\mu</math>l*</b>	-

\* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 50  $\mu$ l 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する。ABI PRISM 7900 で 384 ウェルプレートを用いる場合には、20  $\mu$ l の反応量を使用する。

<sup>†</sup> Triplex および 4-plex RT-PCR 用の 20x プライマー／プローブミックスは、TE バッファー中の各濃度を 4  $\mu$ M forward primer、4  $\mu$ M reverse primer、4  $\mu$ M プローブに調製しておく。

<sup>‡</sup> プライマーの最終濃度は 0.2  $\mu$ M が最適。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する。0.1 ~ 0.3  $\mu$ M のプライマー濃度で結果が改善されることがある。

<sup>§</sup> プローブの最終濃度は 0.2  $\mu$ M でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によるが、濃度は 0.1 ~ 0.4  $\mu$ M の間が最適。

<sup>¶</sup> Uracil-N-glycosylase の活性はメーカーにより異なることがあるが、濃度は 1 ~ 3 units / 50  $\mu$ l 反応液が最適。

表 19. サイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	20分	50℃	RNAはcDNAに逆転写される
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
<b>2ステップサイクリング</b>			<b>重要：以下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</b>
変性：	45秒	94℃	
アニーリング/ エクステンション	75秒	60℃	アニーリング/エクステンションステップ中の蛍光取り込み
サイクル数	40～50		サイクル数はRNAテンプレートおよびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

## プロトコール3：LightCycler® 2.0用のMultiplex RT-PCR

本プロトコールは遺伝子発現解析用に至適化され、**QuantiTect Multiplex RT-PCR NR Kit**とTaqManプローブをLightCycler 2.0で使用する目的で作成されています。このプロトコールではROX passive reference dye非存在下でduplex、triplexあるいは4-plex RT-PCRを行ないます。

### 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、個々のアッセイでプライマー／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 14ページの“Guidelines for effective multiplex PCR”をお読みください。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multiplexリアルタイムRT-PCRアッセイを用いる場合には、その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。
- 逆転写反応後に、HotStarTaq DNA Polymeraseを活性化するため、PCRで最初に必ず95℃で15分間のインキュベーションを行なってください。
- 2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX 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。しかしその際は熱感受性UNGのみを使用してください。
- 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。データ解析に際しては、すべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに各ランでAutomated Methodにてチェックする必要があります。Automated Methodで最適な結果が得られない場合には、データ解析にfit points methodを用いてください。
- Color compensationファイルを作成します。詳細は[www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature)でQIAGEN Supplementary Protocol PCR81をダウンロードしてご覧ください。

### 実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、各ターゲット毎に特異的なプライマーとプローブの両方を含む20xプライマー／プローブミックス溶液を調製することを推奨します。推奨の20xプライマー／プローブミックスは、TEバッファー中に4 μMのforward primer、4 μMのreverse primer、4 μMのプローブの濃度になります。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 63ページ、Appendix Dをご覧ください。

## 操作手順

1. **2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX Master Mix**、RNAテンプレート、プライマーとプローブ溶液、RNaseフリー水を融解する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect Multiplex RT Mix**は使用直前に $-20^{\circ}\text{C}$ から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに $-20^{\circ}\text{C}$ に戻す。

2. 表20 (13ページ) に従って反応ミックスを調製する。

注：反応ミックス調製中はサンプルを保冷してください。

注：2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX Master Mixに添加されている至適化済みの $\text{Mg}^{2+}$ 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。いくつかのターゲットでは $\text{Mg}^{2+}$ 最終濃度を $0.5\sim 1\text{ mM}$ まで増加して反応が改良されることがあります。

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。

注：キャピラリーは保冷してください。

4. 個々のPCRキャピラリーにRNAテンプレート ( $\leq 100\text{ ng}/20\text{ }\mu\text{l}$  反応液) を添加する。

注：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まで、キャピラリーを保冷します。

5. 表21 (14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。**UNG**処理を行なう際は、氷上でサンプルを少なくとも5分間インキュベートする。

注：LightCycler 2.0を使用する際は“Programs”の“Seek Temperature”を $50^{\circ}\text{C}$ に調節します。

6. PCRキャピラリーを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。

Automated Methodによりすべてのプローブで最適な結果が得られているかチェックします。Automated Methodにより最適な結果が得られない場合には、データ解析にfit points methodを用いてください。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。

表 20. 反応セットアップ

成分	容量 *	最終濃度
2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX Master Mix	10 $\mu$ l	1x
20x プライマー／プローブ ミックス 1 <sup>†</sup>	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 1 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 1 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 1 <sup>§</sup>
20x プライマー／プローブ ミックス 2 <sup>†</sup>	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 2 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 2 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 2 <sup>§</sup>
<b>Triplex および 4-plex RT-PCR のみ :</b>		
20x プライマー／プローブ ミックス 3 <sup>†</sup>	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 3 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 3 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 3 <sup>§</sup>
<b>4-plex RT-PCR のみ :</b>		
20x プライマー／プローブ ミックス 4 <sup>†</sup>	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 4 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 4 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 4 <sup>§</sup>
QuantiTect Multiplex RT Mix	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l/反応
RNase フリー水	適量	-
オプション : Uracil-N-glycosylase、 熱感受性	適量	0.8 units/反応 <sup>¶</sup>
<b>RNA テンプレート</b> (ステップ 4 で添加)	適量	$\leq$ 100 ng/反応
<b>トータル反応容量</b>	<b>20 <math>\mu</math>l*</b>	-

\* 100  $\mu$ l の反応量を使用する際は、各反応成分量を 5 倍に増やす。

<sup>†</sup> 20x プライマー／プローブミックスの組成は、TE バッファー中に 4  $\mu$ M の forward primer、4  $\mu$ M の reverse primer、4  $\mu$ M のプローブ。

<sup>‡</sup> プライマーの最終濃度は 0.2  $\mu$ M が最適。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する。0.1  $\mu$ M ~ 0.3  $\mu$ M のプライマー濃度で結果が改善されることがある。

<sup>§</sup> プローブの最終濃度は 0.2  $\mu$ M でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によるが、濃度は 0.1 ~ 0.4  $\mu$ M の間が最適。

<sup>¶</sup> Uracil-N-glycosylase の活性はメーカーにより異なることがあるが、濃度は 0.4 ~ 1.2 units / 20  $\mu$ l 反応液が最適。

表21. サイクリング条件

ステップ	時間	温度	ランプ	コメント
逆転写反応	20分	50℃	20℃/秒	RNAはcDNAに逆転写される
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
<b>2ステップ サイクリング</b>				<b>重要：以下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</b>
変性：	45秒	94℃	20℃/秒	
アニーリング/ エクステンション				
Duplex RT-PCR：	45秒	60℃	20℃/秒	アニーリング/エクステンションステップ中の
Triplex RT-PCR：	75秒	60℃	20℃/秒	蛍光取り込み
4-plex RT-PCR：	75秒	60℃	20℃/秒	
サイクル数	40～50			サイクル数はRNAテンプレートおよびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

## プロトコール4：その他のサイクラー用のDuplex RT-PCR

本プロトコールは、Bio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Corbett/QIAGEN、Eppendorf®、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**QuantiTect Multiplex RT-PCR NR Kit**の使用に至適化されています。このプロトコールではROX passive reference dye非存在下でduplex RT-PCRを行ないます。

### 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、個々のアッセイでプライマー／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 14ページの“Guidelines for effective multiplex PCR”をお読みください。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 RT-PCR アッセイを用いる場合には、その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。
- 逆転写反応後に、HotStarTaq DNA Polymeraseを活性化するため、PCRで最初**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。
- 2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX 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。しかしその際は熱感受性UNGのみを使用してください。
- **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、すべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとの設定（ベースラインとthreshold値など）を各ランで再調整する必要があります。
- **LightCycler 480**を使用する際は、color compensation ファイルを作成します。詳細はウェブサイト [www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature) で QIAGEN Supplementary Protocol PCR82 をダウンロードしてご覧ください。

### 実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、各ターゲット毎に特異的なプライマーとプローブの両方を含む20xプライマー／プローブミックス溶液を調製することを推奨します。Duplex RT-PCR用に推奨の20xプライマー／プローブミックスは、TEバッファー中に8 µMのforward primer、8 µMのreverse primer、4 µMのプローブの濃度になります。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 63ページ、Appendix Dをご覧ください。

## 操作手順

1. **2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX Master Mix**、RNAテンプレート、プライマーとプローブ溶液、RNaseフリー水を融解する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect Multiplex RT Mix**は使用直前に-20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに-20℃に戻す。

2. 表22 (17ページ) に従って反応ミックスを調製する。

注：反応ミックス調製中はサンプルを氷上で保冷します。

注：2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX Master Mixに添加されている至適化済みのMg<sup>2+</sup>濃度で実験を始めることを強くお勧めします。いくつかのターゲットではMg<sup>2+</sup>最終濃度を0.5～1 mMまで増加して反応が改良されることがあります。

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

注：チューブあるいはプレートを氷上に置きます。

4. RNAテンプレート (≤250 ng/50 µl 反応液) を個々のPCRチューブあるいはウェルに添加する。

注：リアルタイムサイクラーのプログラミングの間、チューブあるいはプレートを氷上で保冷します。

5. 表23 (18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。UNG処理を行なう際は、氷上でサンプルを少なくとも5分間インキュベートする。

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；同一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ごと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レポーター色素ごとのキャリブレーション操作が必要になることがあります。

6. PCRチューブあるいはプレートを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) をプローブごとに選択します。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。

表22. 反応セットアップ

成分	容量*	最終濃度
2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX Master Mix	25 µl	1x
20x プライマー／プローブ ミックス 1 <sup>†</sup>	2.5 µl	0.4 µM forward primer 1 <sup>†</sup> 0.4 µM reverse primer 1 <sup>†</sup> 0.2 µM probe 1 <sup>§</sup>
20x プライマー／プローブ ミックス 2 <sup>†</sup>	2.5 µl	0.4 µM forward primer 2 <sup>†</sup> 0.4 µM reverse primer 2 <sup>†</sup> 0.2 µM probe 2 <sup>§</sup>
QuantiTect Multiplex RT Mix	0.5 µl	0.5 µl/反応
RNase フリー水	適量	-
オプション：Uracil-N-glycosylase、 熱感受性	適量	2 units / 反応 <sup>¶</sup>
<b>RNA テンプレート</b> (ステップ4で添加)	適量	≤250 ng / 反応
<b>トータル反応容量</b>	<b>50 µl*</b>	-

\* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが50 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する。LightCycler 480で384ウェルプレートを用いる場合には、10 µlの反応量を使用する。

<sup>†</sup> Duplex RT-PCR用の20x プライマー／プローブミックスの組成は、TEバッファー中に8 µMのforward primer、8 µMのreverse primer、4 µMのプローブ。

<sup>‡</sup> プライマーの最終濃度は0.4 µMが最適。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する。

<sup>§</sup> プローブの最終濃度は0.2 µMでほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によるが、最適濃度は0.1～0.4 µMの間。

<sup>¶</sup> Uracil-N-glycosylaseの活性はメーカーにより異なることがあるが、濃度は1～3 units / 50 µl反応液が最適。

表 23. サイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	20分	50℃	RNAはcDNAに逆転写される
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
<b>2ステップサイクリング</b>			<b>重要：以下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</b>
変性：	45秒	94℃	
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中の蛍光取り込み
サイクル数	40～50		サイクル数はRNAテンプレートおよびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

## プロトコール5：その他のサイクラー用のTriplexおよび4-plex RT-PCR

本プロトコールは、Bio-Rad/MJ Research、Cepheid、Corbett/QIAGEN、Eppendorf、Stratageneのリアルタイム用サーマルサイクラー上でTaqManプローブと**QuantiTect Multiplex RT-PCR NR Kit**を使用するために至適化されています。このプロトコールでは、ROX passive reference dye非存在下でtriplexまたは4-plex RT-PCRを行ないます。

### 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やプライマー濃度は、duplexアッセイプロトコール（15ページ）に記載されているものとは異なります。
- 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、個々のアッセイでプライマー/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 14ページの“Guidelines for effective multiplex PCR”をお読みください。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multiplexリアルタイムRT-PCRアッセイを用いる場合には、その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。
- 逆転写反応後に、HotStarTaq DNA Polymeraseを活性化するため、PCRで最初に必ず95℃で15分間のインキュベーションを行なってください。
- 2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX 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。しかしその際は熱感受性UNGのみを使用してください。
- 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、すべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとの設定（ベースラインとthreshold値など）を各ランで再調整する必要があります。
- **LightCycler 480**を使用する際は、color compensation ファイルを作成します。詳細は弊社ウェブサイト [www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature) で QIAGEN Supplementary Protocol PCR82 をダウンロードしてご覧ください。

### 実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、各ターゲット毎に特異的なプライマーとプローブの両方を含む20xプライマー/プローブミックス溶液を調製することを推奨します。Triplexおよび4-plex RT-PCR用に推奨の20xプライマー/プローブミックスの組成は、TEバッファー中に4 μMのforward primer、4 μMのreverse primer、4 μMのプローブになります。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 63ページ、Appendix Dをご覧ください。

## 操作手順

1. **2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX Master Mix**、RNAテンプレート、プライマーとプローブ溶液、RNaseフリー水を融解する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect Multiplex RT Mix**は使用直前に-20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに-20℃に戻す。

2. 表24 (21ページ) に従って反応ミックスを調製する。

注：反応ミックス調製中はサンプルを氷上で保冷します。

注：2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX Master Mixに添加されている至適化済みのMg<sup>2+</sup>濃度で実験を始めることを強くお勧めします。いくつかのターゲットではMg<sup>2+</sup>最終濃度を0.5～1 mMまで増加して反応が改良されることがあります。

3. マスターミックスを完全に攪拌混和し、PCRチューブあるいはPCRプレートのウェルに適切な量を分注する。

注：チューブあるいはプレートを氷上に置きます。

4. RNAテンプレート (≤250 ng/50 µl 反応液) を個々のPCRチューブあるいはウェルに添加する。

注：リアルタイムサイクラーのプログラミングの間、チューブあるいはプレートを氷上で保冷します。

5. 表25 (22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。UNG処理を行なう際は、氷上でサンプルを少なくとも5分間インキュベートする。

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；同一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レポーター色素ごとのキャリブレーション操作が必要になることがあります。

6. PCRチューブあるいはプレートを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) をプローブごとに選択します。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。

表 24. 反応セットアップ

成分	容量 *	最終濃度
2x QuantiTect Multiplex RT-PCR NoROX Master Mix	25 $\mu$ l	1x
20x プライマー／プローブ ミックス 1 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 1 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 1 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 1 <sup>§</sup>
20x プライマー／プローブ ミックス 2 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 2 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 2 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 2 <sup>§</sup>
20x プライマー／プローブ ミックス 3 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 3 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 3 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 3 <sup>§</sup>
<b>4-plex RT-PCRのみ :</b>		
20x プライマー／プローブ ミックス 4 <sup>†</sup>	2.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M forward primer 4 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M reverse primer 4 <sup>†</sup> 0.2 $\mu$ M probe 4 <sup>§</sup>
QuantiTect Multiplex RT Mix	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l/反応
RNase フリー水	適量	-
オプション : Uracil-N-glycosylase、 熱感受性	適量	2 units / 反応 <sup>¶</sup>
<b>RNA テンプレート</b> (ステップ 4 で添加)	適量	$\leq$ 250 ng / 反応
<b>トータル反応容量</b>	<b>50 <math>\mu</math>l*</b>	-

\* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 50  $\mu$ l 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する。LightCycler 480 で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10  $\mu$ l の反応量を使用する。

<sup>†</sup> Triplex および 4-plex RT-PCR 用の 20x プライマー／プローブミックスの組成は、TE バッファー中に 4  $\mu$ M の forward primer、4  $\mu$ M の reverse primer、4  $\mu$ M のプローブ。

<sup>‡</sup> 最終プライマー濃度は 0.2  $\mu$ M が最適。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する。0.1 ~ 0.3  $\mu$ M のプライマー濃度で結果が改善されることがある。

<sup>§</sup> プローブの最終濃度は 0.2  $\mu$ M でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によるが、濃度は 0.1 ~ 0.4  $\mu$ M の間が最適。

<sup>¶</sup> Uracil-N-glycosylase の活性はメーカーにより異なることがあるが、濃度は 1 ~ 3 units / 50  $\mu$ l 反応液が最適。

表 25. サイクリング条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応	20分	50℃	RNAはcDNAに逆転写される
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
<b>2ステップサイクリング</b>			<b>重要：以下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</b>
変性：	45秒	94℃	
アニーリング/ エクステンション	75秒	60℃	アニーリング/エクステンションステップ中の蛍光取り込み
サイクル数	40～50		サイクル数はRNAテンプレートおよびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

# 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、あるいはひとつ以上のサンプルのシグナルが遅れて検出される

- a) サイクリング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 DNA Polymerase活性化ステップ (95℃、15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 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。
- 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 57ページ、Appendix Aを参照する。RT-PCRをやり直す。
- d) 蛍光取り込みの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取り込み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  
適切なプライマー濃度を用いる。全てのリアルタイムブロックサイクラーで実施するduplex RT-PCRの各プライマー濃度は0.4 μMを使用する。全てのリアルタイムブロックサイクラー上で実施するtriplexあるいは4-plex RT-PCRの各プライマー濃度は0.2 μMで使用する。TaqMan プローブを用いてLightCycler 2.0システムで行なうマルチプレックス・アッセイの各プライマー濃度は0.2 μMを使用する。
- 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 57ページ、Appendix Aを参照)。

## コメント

- f)  $Mg^{2+}$ 濃度が最適でない 2x QuantiTect Multiplex RT-PCR Master Mix/NoROX Master Mix中の $Mg^{2+}$ 濃度は至適化済みで、マルチプレックスRT-PCRの $Mg^{2+}$ 最終濃度は5.5 mMになる。プライマー／プローブデザインによっては、 $Mg^{2+}$ 濃度を0.5～1 mM増やすと結果が改善される場合がある。
- g) スタートテンプレートに問題 スタート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、核酸テンプレート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RT-PCRを繰り返す。
- h) 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。
- i) サイクル数が不十分 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場合は、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 57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設定されているかどうか、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しているかチェックする。

### Multiplex RT-PCR アッセイと相当する singleplex RT-PCR アッセイとで $C_T$ 値あるいはPCR効率の違いがある

- a) サイクリング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 DNA Polymerase 活性化ステップ（95℃、15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) 解析の設定値（ベースラインとthreshold値など）が最適でない 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。

## コメント

- c) レポーター色素のスペクトル分離が不明確
- マルチプレックス RT-PCR 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、multiplex 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** : spectral compensation を用いた解析と用いない解析の両方を行なう。

**LightCycler 2.0** : Color compensation アルゴリズムのために、singleplex 反応と multiplex 反応の増幅プロットの形が異なることがある。

### テンプレート量の対数値と $C_T$ 値 / Crossing point 間の相関関係に直線性がない

- a) テンプレートの量が多すぎる
- 推奨されたテンプレートの最大量を超えない。
- 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。

### “No Template” コントロール (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アッセイを繰り返す。
- b) 反応セットアップ中にコンタミ
- 反応セットアップ中に適切な安全対策を講じる (例 ; フィルター付チップを使用)。また、測定済み反応液からのキャリーオーバーを防ぐために、UNG を用いる。
- c) 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。

### “No Reverse Transcription” コントロールで蛍光強度が増加した

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。

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。

## コメント

### 蛍光強度がばらつく

- 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ずれている  
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) 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減らす（リアルタイム用サーマルサイクラーが変更可能な場合）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  
25  $\mu$ l未満の反応液量を用いない。プレートの蓋に optical adhesive cover を必ず使用する。反応液量を 50  $\mu$ l に増加すると、結果が改善されることがある。

### Applied Biosystems 7500のみ：

- e) threshold の初期設定値 0.2 を用いて増幅シグナルがない  
初期設定値の threshold 値を低く調節する。スタートポイントとして 0.01 を使用する。

### LightCycler 2.0のみ：

- f) 1つ以上の検出チャンネルで予想外の蛍光シグナル  
検出チャンネル間のクロストークを抑えるために、color compensation ファイルを使用する。詳細は弊社ウェブサイト [www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature) で QIAGEN Supplementary Protocol PCR81 をダウンロードして参照する。
- g) 装置がサンプルを認識していない  
サンプルが入ったキャピラリーを装置が認識するためには、検出可能な蛍光シグナルをサンプルが持つことが必要。最大発光波長が >600 nm を持つレポーター色素を持つプローブのみを含むサンプルを検出するために channels 3～6 を使用する際（例；コントロールの singleplex 反応を行なう場合など）は、認識するための蛍光強度が十分でないことがある。サンプルを認識させるために、10 nM の fluorescein dye あるいは 6-FAM dye で標識した無関係のプローブ（0.2  $\mu$ M）を各サンプルに添加する。

### LightCycler 480のみ：

- h) 1つ以上の検出チャンネルで予想外の蛍光シグナル
- 検出チャンネル間のクロストークを抑えるために、color compensation ファイルを使用する。詳細は弊社ウェブサイト [www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature) で QIAGEN Supplementary Protocol PCR82 をダウンロードして参照する。

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

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。

© 2005-2009 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

