

Rotor-Gene™ SYBR® Green プロトコールとトラブルシューティング

Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit

Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit

SYBR Green I と Rotor-Gene サイ클ーを用いた
高速リアルタイム PCR、2 ステップ RT-PCR、
高速 1 ステップ RT-PCR

目次

ページ

プロトコール

リアルタイム PCR / 2 ステップ RT-PCR

2

1 ステップ・リアルタイム RT-PCR

8

トラブルシューティング

15



プロトコール：リアルタイムPCR／2ステップRT-PCR

本プロトコールはRotor-Gene Q、Rotor-Gene 3000、Rotor-Gene 6000を用いた実験に最適化されています。

実験を始める前の重要事項

- Rotor-Gene SYBR Green PCR Kitは、95℃の変性ステップと60℃のアニーリング／エクステンション・ステップを組み合わせた**2ステップサイクリング**プロトコールで使用するようデザインされています。本プロトコールは60℃未満の T_m 値を持つプライマーにも使用可能です。
- SYBR Green Iを用いた効率的なリアルタイムPCRには、PCR産物の長さは60～200 bpが最適です。
- HotStarTaq® Plus DNA Polymeraseを活性化するため、PCRで最初に必ず**95℃で5分間のインキュベーション**を行なってください。
- 最終容量を25 µlにすることを推奨します。
- 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mixに添加済みの Mg^{2+} 濃度で常に始めてください。
- QuantiTect® Primer Assayを使用する場合は、反応液の最終濃度を1xにします。表2のサイクリングプロトコールに従います。

操作手順

1. **2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix**、テンプレートDNAあるいはcDNA、プライマー、RNaseフリー水を解凍する。各溶液を混和する。
2. 表1（3ページ）に従って反応ミックスを調製する。

ホットスタートPCRであるため、反応のセットアップ中あるいはRotor-Gene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。

注：2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mixに添加済みの Mg^{2+} 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

表 1. 反応セットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix	12.5 µl	1x
プライマー A*	適量	1 µM
プライマー B*	適量	1 µM
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
RNase フリー水	適量	
トータル反応容量	25 µl	

* QuantiTect Primer Assay を使用する場合は、反応液の最終濃度を 1x にする。

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量を PCR チューブに分注する。
4. DNA あるいは cDNA テンプレート（反応あたり 100 ng 以下）を反応ミックスの入ったそれぞれの PCR チューブに添加する。
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）の量が最終 PCR 容量の 10% を超えないようにします。
5. Rotor-Gene サイ클ラーを表 2（4 ページ） および図 1 と図 2（5、6 ページ）に従ってプログラムする。
蛍光取り込みは、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中に行ないます。

表2. 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	5 分	95 ℃	HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase はこの加熱ステップで活性化さ れる
2ステップのサイクリング			
変性：	5 秒	95 ℃	
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	10 秒	60 ℃ *	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35 ～ 40		サイクル数はテンプレート DNA 量に依存

* この温度は QuantiTect Primer Assay および T_m 値が 60 ℃ 未満の全てのプライマーセットにも使用できる。

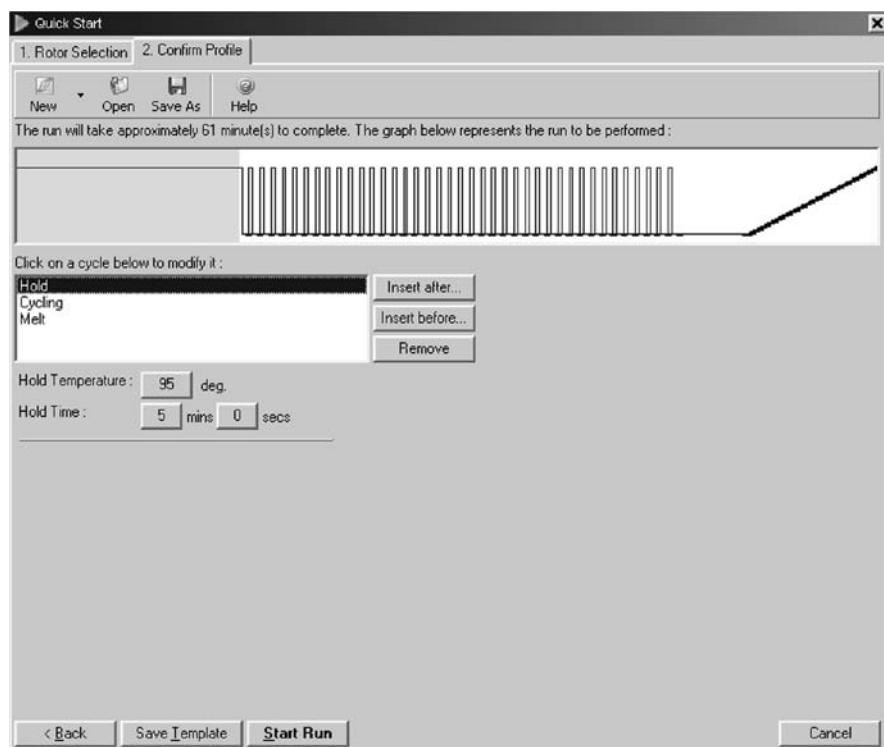


図 1. PCR 初期活性化

HotStarTaq *Plus* DNA Polymeraseを活性化するため、PCRで最初に必ず95℃で5分間のインキュベーションを行なう。

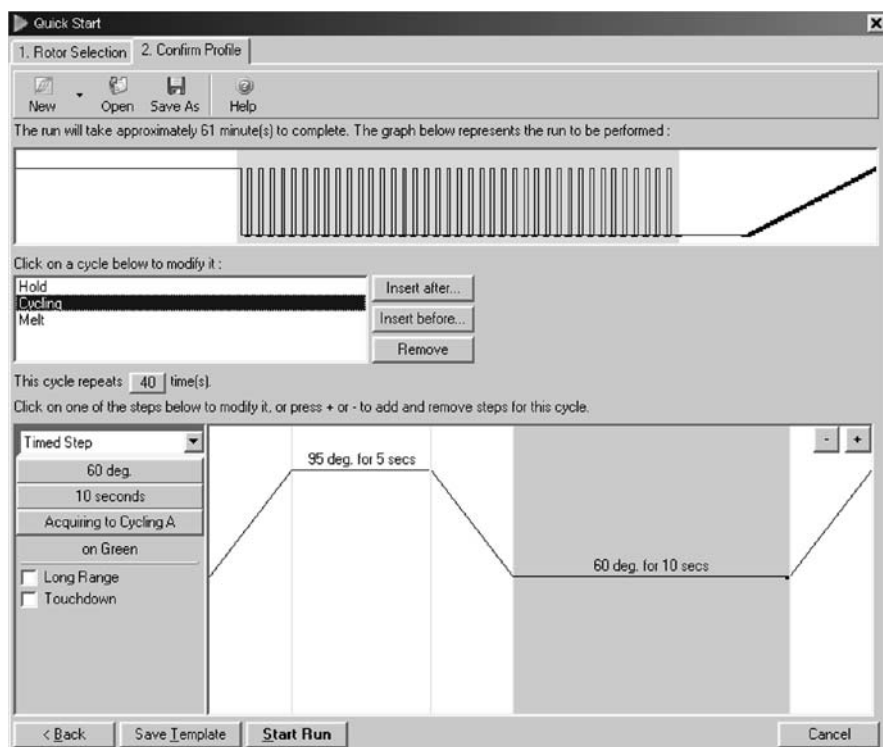


図 2. 2 ステップのサイクリング

PCR は 35 ~ 40 回のサイクル数が必要。各サイクルは 2 ステップの組み合わせ：95℃で 5 秒（変性ステップ）と 60℃で 10 秒（アニーリング/エクステンションステップ）。

6. **Rotor-Gene サイ클ー**内に PCR チューブを入れ、プログラムをスタートする。
7. オプション：PCR 産物を同定し特異性を確認するため、融解曲線解析を行なう（7 ページ、図 3 参照）。

溶解曲線解析は Rotor-Gene サイ클ーのソフトに組み込まれている解析ステップです。Rotor-Gene サイ클ーに添付のユーザーマニュアルに従ってください。

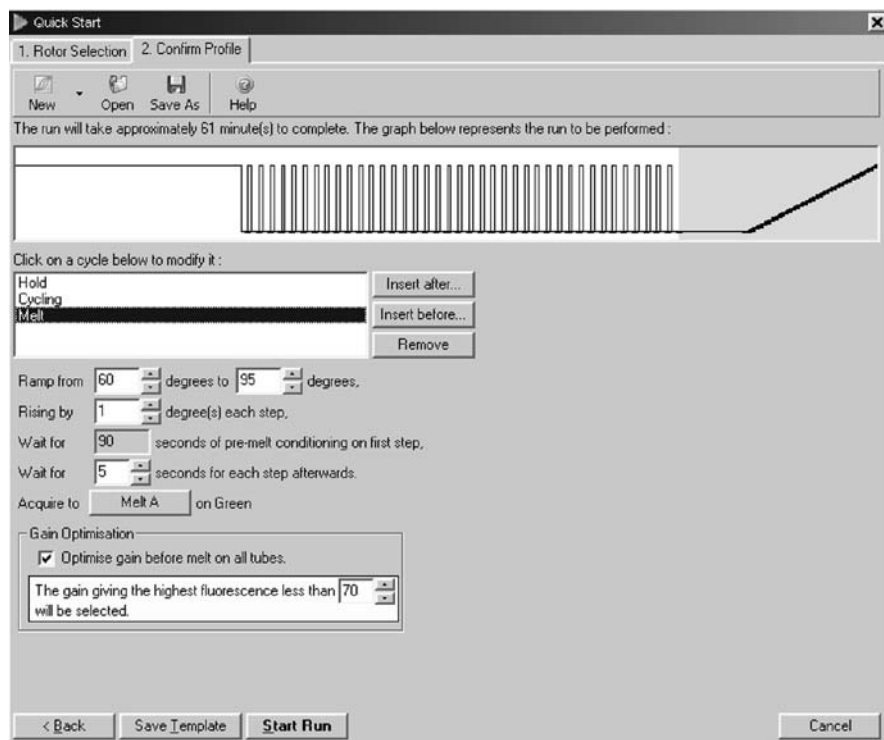


図3. 融解曲線解析

PCR 終了後、反応の特異性を調べるために融解曲線解析を行なう。

8. オプション：アガロースゲル電気泳動によって PCR 産物の特異性を調べる。

プロトコール：1ステップ・リアルタイムRT-PCR

本プロトコールはRotor-Gene Q、Rotor-Gene 3000、Rotor-Gene 6000を用いた実験に最適化されています。

実験を始める前の重要事項

- Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kitは、95℃の変性ステップと60℃のアニーリング/エクステンション・ステップを組み合わせた**2ステップサイクリング**プロトコールで使用するようデザインされています。本プロトコールは60℃未満の T_m 値を持つプライマーにも使用可能です。
- SYBR Green Iを用いた効率的なリアルタイムRT-PCRには、PCR産物の長さは60～200 bpが最適です。
- 逆転写反応の後、RT-PCRのPCRステップはまず、**95℃で5分のインキュベーション**を行ないHotStarTaq *Plus* DNA Polymeraseを活性化させます。
- 不完全なcDNA合成を回避するために、全ての反応液セットアップは氷上で行ないます。
- 最終容量を25 µlにすることを推奨します。
- 2x Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Master Mixに添加済みの Mg^{2+} 濃度で常に始めてください。
- QuantiTect Primer Assayを使用する場合は、反応液の最終濃度を1xにします。表4のサイクリングプロトコールに従います。

操作手順

1. **2x Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Master Mix**、テンプレートRNA、プライマー、RNaseフリー水を解凍する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**Rotor-Gene 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3（9ページ）に従って反応ミックスを調製する。

反応ミックス調製中はサンプルを氷上に置いておきます。

注：2x Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Master Mixに添加済みの Mg^{2+} 濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

表3. 反応セットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Master Mix	12.5 µl	1x
プライマー A*	適量	1 µM
プライマー B*	適量	1 µM
Rotor-Gene RT Mix	0.25 µl	
RNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	≤100 ng/反応
RNase フリー水	適量	
トータル反応容量	25 µl	

* QuantiTect Primer Assayを使用する場合は、反応液の最終濃度を1xにします。

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量をPCRチューブに分注する。
氷上でPCRチューブを保冷します。
4. 反応ミックスを含んだ個々のPCRチューブにテンプレートRNA（反応あたり100 ng以下）を添加する。
5. **Rotor-Gene**サイクラーを表4（10ページ）と図4～6（11～13ページ）に従ってプログラムする。
蛍光取り込みは、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中に行ないます。

表 4. 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	10 分	55 °C	
PCR 初期活性化	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 ステップのサイクリング			
変性：	5 秒	95 °C	
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	10 秒	60 °C *	蛍光取り込みを行なう
サイクル数	35 ～ 40		サイクル数はテンプレート RNA 量に依存

* この温度は QuantiTect Primer Assay および T_m 値が 60 °C 未満の全てのプライマーセットにも使用できる。

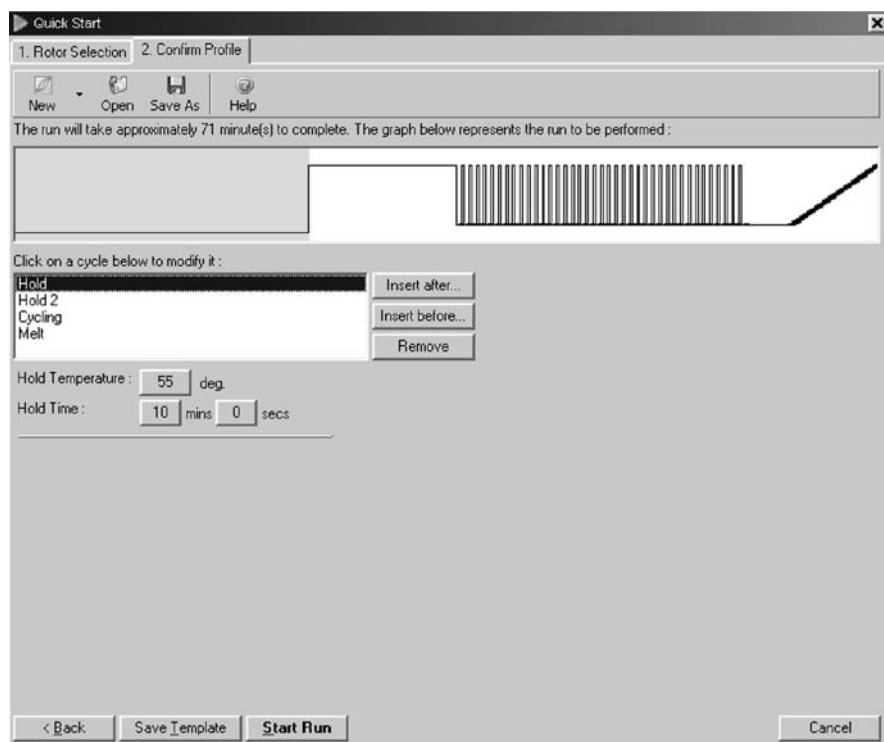


図4. 逆転写反応

PCRを開始する前に、逆転写反応を行なう。55℃で10分間、反応液をインキュベートする。

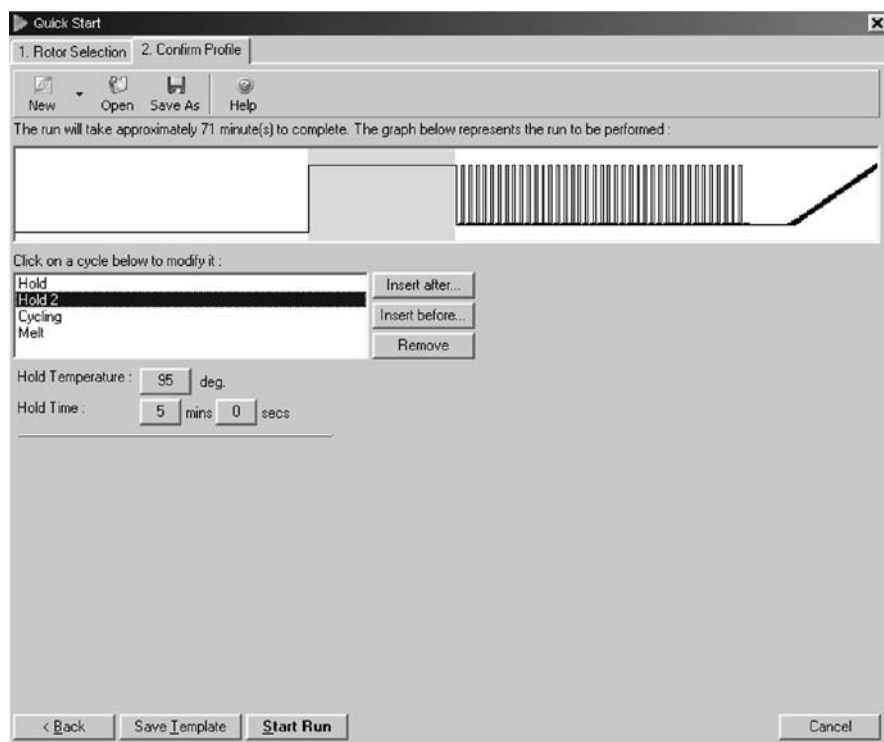


図5. PCR初期活性化

逆転写反応の終了後、PCRを開始する。PCRは95℃で5分間の初期活性化が必要。

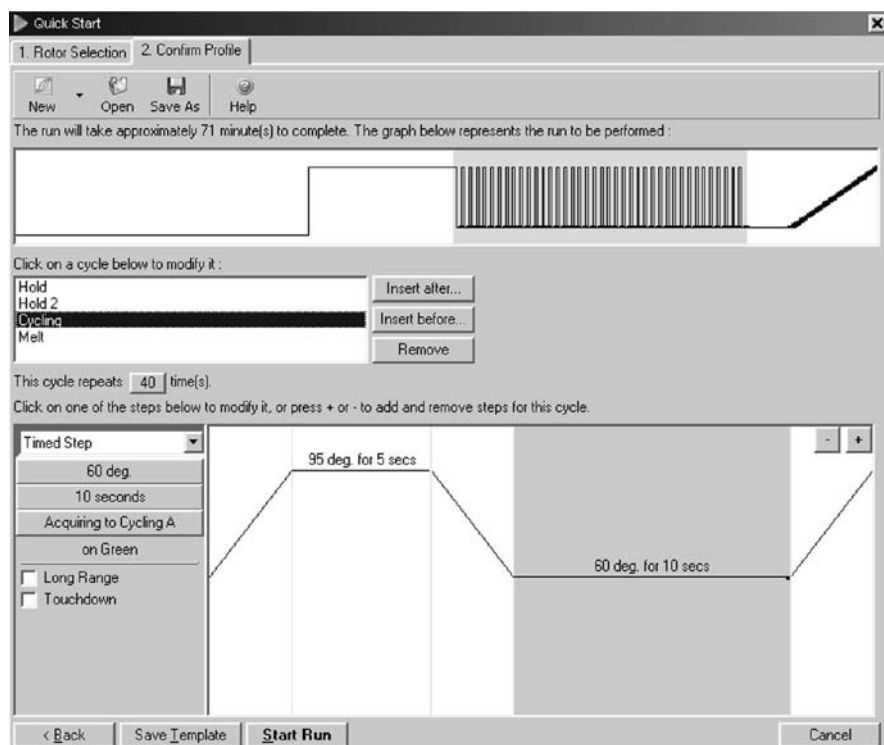


図 6. 2ステップのサイクリング

PCRのサイクル数は35～40回必要。各サイクルは2ステップの組み合わせ：95℃で5秒（変性ステップ）と60℃で10秒（アニーリング／エクステンションステップ）。

6. **Rotor-Geneサイクラー内にPCRチューブを入れ、プログラムをスタートする。**

7. オプション：RT-PCR産物を同定し特異性を確認するため、融解曲線解析を行なう（14ページ、図7参照）。

溶解曲線解析はRotor-Geneサイクラーのソフトに組み込まれている解析ステップです。Rotor-Geneサイクラーに添付のユーザーマニュアルに従ってください。

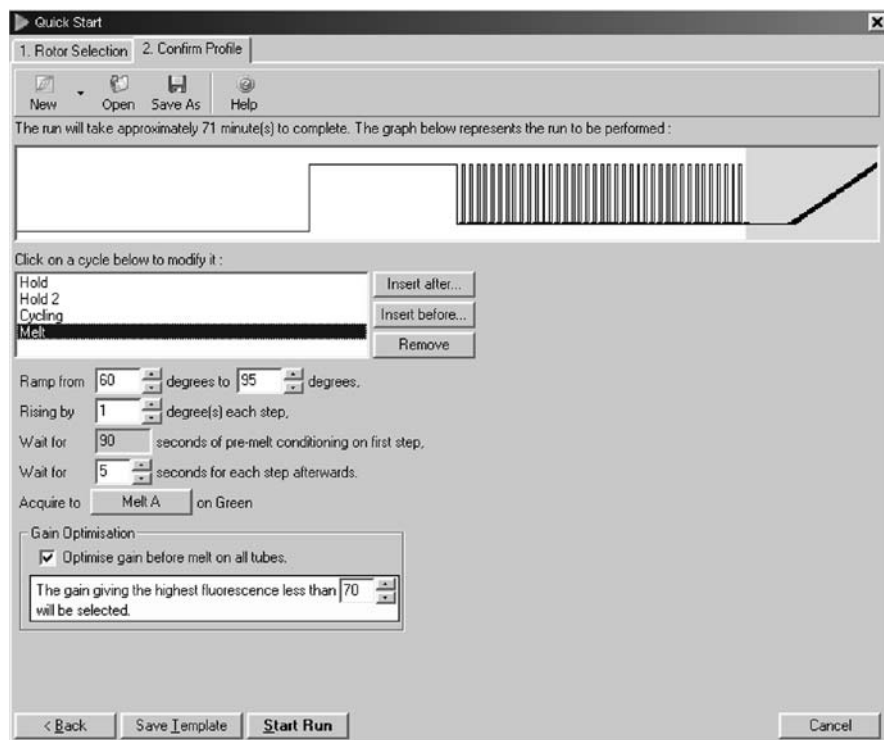


図7. 融解曲線解析

PCR 終了後、反応の特異性を調べるために融解曲線解析を行なう。

8. オプション：アガロースゲル電気泳動によって RT-PCR 産物の特異性を調べる。

トラブルシューティングガイド

コメント

PCR 産物がない、PCR 産物の検出が遅れる、プライマーダイマーのみを検出

- | | |
|--|---|
| a) PCR アニーリング／
エクステンション時間
が短すぎる | 推奨されているアニーリング／エクステンション時間
(10 秒) で行なう。 |
| b) Mg^{2+} 濃度を変更した | 2x Rotor-Gene SYBR Green Master Mix に添加済みの
Mg^{2+} 濃度を変更しない。 |
| c) HotStarTaq <i>Plus</i> 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 <i>Plus</i> 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。 |
| d) ピペッティングエラー、
あるいは試薬の入れ
忘れ | プライマーや核酸テンプレート、試薬の濃度や保存
条件をチェックする*。PCR を再度行なう。 |
| e) 蛍光取り込みのステッ
プが間違っている、
あるいはない | 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。 |
| f) プライマー濃度が
最適でない | プロトコールに記載されているように、各プライマー
濃度 1 μM を使用する。10x QuantiTect Primer Assay を
使用する場合は、反応液の最終濃度を 1x にする。
分光光度計でプライマー濃度をチェックする*。 |
| g) 反応量が多すぎた | 最終容量を 25 μl にすることを推奨。 |
| h) 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。 |
| i) 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。 |

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

コメント

- | | |
|---|---|
| j) サイクル数が少ない | サイクル数を5ステップずつ増加する。 |
| k) PCR産物が長すぎる | 最適な結果には、PCR産物は60～200 bpの長さにする。PCR産物の長さは300 bp以上にならないようにする。 |
| l) プライマーデザインが適切でない | 融解曲線解析*やゲル電気泳動でPCR産物をチェックする。特異的PCR産物が検出されない場合は、primer design guideline*を参照し、再考するか、リアルタイム RT-PCR用のデザイン済みプライマーセット、QuantiTect Primer Assayを使用する（英語版Handbook 28ページ、ordering information参照）。 |
| m) 蛍光取り込みの設定がない | サイクリングプログラムで蛍光取り込みが設定されているかをチェックする。 |
| n) 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。 |
| o) 2ステップ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、添加する未希釈の逆転写反応液量は、最終PCR量の10%を超えてはならない。 |
| p) 1ステップRT-PCRのみ ：RTステップを行っていない | 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RTステップ（55℃、10分）が含まれていることを確認する。 |
| q) 間違った色素チャンネルを選択した | SYBR Green Iに適切な色素チャンネルを設定したことを確認する。 |

プライマー・ダイマーおよび／あるいは非特異的PCR産物

- | | |
|-----------------------------|---|
| a) Mg ²⁺ 濃度を変更した | 2x Rotor-Gene SYBR Green Master Mixに添加済みのMg ²⁺ 濃度を変更しない。 |
| b) プライマーデザインが適切でない | 融解曲線解析*やゲル電気泳動でPCR産物をチェックする。特異的PCR産物が検出されない場合は、primer design guideline*を参照し、再考するか、リアルタイム RT-PCR用のデザイン済みプライマーセット、QuantiTect Primer Assayを使用する（英語版Handbook 28ページ、ordering information参照）。 |

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

コメント

- | | |
|------------------------|---|
| c) PCR産物が長すぎる | PCR産物は60～200 bpの長さにする最適の結果が得られる。PCR産物の長さは300 bp以上にならないようにする。 |
| d) 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。 |
| e) ゲノムDNAがRNAサンプルにコンタミ | <p>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をデザインする。あるいは、可能な限りゲノムDNAの増幅を回避するようにデザインされたプライマーセット、QuantiTect Primer Assayを使用する（英語版 Handbook 28ページ、ordering information 参照）。</p> <p>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。2ステップ・リアルタイムRT-PCRを行なう場合、ゲノムDNA除去とcDNA合成を行なうQuantiTect Reverse Transcription Kitを使用して逆転写反応を行なう。</p> |

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTag®, QuantiTect® (QIAGEN Group); Rotor-Gene™ (Corbett Research); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

The purchase price of this product (Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit and Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit) includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patents Nos. 5,994,056 and 6,171,785 and corresponding patent claims outside the United States, owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd (Roche), to use only this amount of the product for dsDNA-binding dye processes covered by said patents solely for the purchaser's own internal research. This product is also a Licensed dsDNA Dye Binding Kit for use with service sublicenses available from Applied Biosystems. 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 use this product for any other purpose or for 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

The purchase price of this product (Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit) includes a limited, non-transferable license under U.S. Patents Nos. 5,407,800, 5,322,770, 5,310,652 and corresponding patent claims outside the United States, owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd (Roche), to use only this amount of product solely for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claims (such as apparatus or system claims) and no right to use this product for any other purpose or for 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.

The purchase of this product (Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit and Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit) includes a limited, non-transferable license under U.S. Patent No. 5,871,908 and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics applications with authorized reagents with regard to Melting Curve Analysis. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, under any other patent or patent claims owned by Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party.

QuantiTect Primer Assays are compatible for use in the 5' nuclease process or the dsDNA-binding dye processes covered by patents owned by Roche or owned by or licensed to Applied Corporation. No license under these patents to practice the 5' nuclease process or the dsDNA-binding dye processes are conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product.

The QIAGEN silver logo is exclusively licensed to Corbett Research.

The purchase of this product (Rotor-Gene, Rotor-Disc) includes a limited, non-transferable license to certain patents (see details below) surrounding rapid polymerase chain reaction (PCR) methods and instrumentation, the use of SYBR® Green I in PCR reactions, melting curve analysis, analysis methods of DNA melting data, specifically high resolution melting (HRM) and others.

The purchase of this product (Rotor-Gene, Rotor-Disc) includes a limited, non-transferable license to one or more of US Patents Nos 6,787,338; 7,238,321; 7,081,226; 6,174,670; 6,245,514; 6,569,627; 6,303,305; 6,503,720; 5,871,908; 6,691,041; 7,387,887; and U.S. Patent Applications Nos. 2003-0224434 and 2006-0019253 and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., and/or Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics applications. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, for any reagent or kit, or under any other patent or patent claims owned by the University of Utah Research Foundation, Idaho Technology, Inc., and/or Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party. For information on purchasing licenses for in-vitro diagnostics applications or reagents, contact Roche Molecular Systems, 4300 Hacienda Drive, Pleasanton, CA 94588, USA.

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 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

