

QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit プロトコールとトラブルシューティング

迅速かつ効率的な 1 ステップ RT-PCR 用

目次	ページ
プロトコール	
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit を用いたプロトコール	2
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit と Q-Solution を用いたプロトコール	5
トラブルシューティング	9



QIAGEN OneStep RT-PCR Kit を用いたプロトコール

このプロトコールは、1 ステップ RT-PCR のガイドラインとしてご利用ください。逆転写反応および PCR 反応は同一チューブ中で順次行なわれます。両方の反応に必要な全ての成分はセットアップ前に添加するので、一旦反応が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 から 2 µg のトータル RNA に最適です。PCR 増幅反応のインキュベーション時間および温度のような反応条件の至適化は、個別に変更、決定する必要があります。

実験前の注意事項

- HotStarTaq® DNA Polymerase (QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix に含有) は増幅反応を行なう前に **95°C で 15 分間インキュベートし、まず活性化**してください (本プロトコールのステップ 6 を参照)。このインキュベーションにより逆転写酵素は非活性化されます。逆転写酵素反応が終了するまで HotStarTaq DNA Polymerase を加熱して活性化しないでください。
- QIAGEN OneStep RT-PCR Kit は**遺伝子特異的なプライマー**の最終濃度が **0.6 µM** で使用するようにデザインされています。ランダムなオリゴマーや oligo-dT プライマーを使用すると非特異的な増幅産物が得られるためお勧めできません。
- 全ての反応セットアップは、氷上で行なってください。
- サンプルを入れる前にサーマルサイクラーが 50°C に予熱されていることを確認してください。
- 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer では、反応溶液での MgCl₂ の最終濃度をほとんどの場合に良い結果をもたらす 2.5 mM に調製してあります。
- RNA 分離および反応溶液のセットアップは RNase フリーの環境で行なってください。
- 反応ミックス溶液のセットアップは、RNA 調製あるいは PCR 産物の解析を行なう場所では行なわないでください。
- 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 ミックス、5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 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は使用前に十分に混合してください。

2. **マスターミックスを表 2 (3 ページ) に従って調製する。**

マスターミックスは、テンプレート RNA 以外の RT-PCR に必要な全ての成分を含んでいます。マスターミックスは、実験する反応サンプルの数に必要な量より 10% 増しに調製してください。全ての実験でネガティブコントロール (テンプレート RNA なし) は必ず行なってください (英語版 Handbook 34 ページ、Appendix J 参照)。

表 2. QIAGEN OneStep RT-PCR の反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
マスターミックス		
RNase フリー水 (付属品)	適量	-
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer*	10.0 µl	1x
dNTP Mix (各 dNTP 10 mM を含有)	2.0 µl	各 dNTP 400 µM
プライマー A	適量	0.6 µM[†]
プライマー B	適量	0.6 µM[†]
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2.0 µl	-
RNase 阻害剤 (オプション) [‡]	適量	5 ~ 10 ユニット／反応
テンプレート RNA		
テンプレート RNA、ステップ 4 で添加	適量	1 pg ~ 2 µg / 反応
トータル容量	50.0 µl	-

* 12.5 mM MgCl₂ 含有。

[†] ほとんどのプライマーテンプレートシステムにおいてプライマーの最終濃度は 0.6 µM が最適であるが、いくつかのケースでは異なるプライマー濃度 (例; 0.5 ~ 1.0 µM) で増幅が改善されることもある。

[‡] バッファー成分が RNase 阻害作用をもっているため、RNase 阻害剤はオプションで使用される。

3. マスターミックスを十分に混ぜ、PCR チューブに適量分注する。

マスターミックスをピペットで吸排出して静かに混和してください。

4. テンプレート RNA (≤2 µg / 反応) を各 PCR チューブに添加する。

QIAGEN 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. 加熱蓋付きサーマルサイクラーの場合は、ミネラルオイルは使用しないで直接ステップ 6 へ進む。それ以外はミネラルオイル約 50 µl を溶液の上に重層する。

6. サーマルサイクラーを次ページの表 3 (4 ページ) に従ってプログラムする。

表 3 には典型的なサーマルサイクラープログラムが掲載されています。このプログラムは逆転写反応と PCR の両方のステップを含んでいます。PCR 増幅は 95°C で 15 分間 HotStarTaq DNA Polymerase をまず活性化することにより始まります。最高の収量および特異性を得るためには、温度やサイクル時間をそれぞれ新しいターゲットとプライマーペアごとに至適化が必要です。しかしほとんどの場合、この条件で満足できる結果が得られます。

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℃ に達するまで待つ。サーマルサイクラーに PCR チューブを入れる。

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

表 3. サーマルサイクラー条件

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。しかし 50℃ で満足できる結果が得られない場合には、反応温度を 60℃ まで上げてよい。
PCR 初期活性化	15 分	95℃	HotStarTaq DNA Polymerase はこのヒーティングステップで活性化される。同時に Omniscript® および Sensiscript® Reverse Transcriptase は非活性化され、テンプレート cDNA は変性される。
3 ステップサイクリング			
変性：	0.5 ~ 1 分	94℃	
アニーリング：	0.5 ~ 1 分	50 ~ 68℃	プライマーの T_m より約 5℃ 低い温度
エクステンション：	1 分	72℃	1 ~ 2 kb の RT-PCR 産物ではエクステンション時間は 30 ~ 60 秒まで。2 kb 以上の RT-PCR 産物の場合には英語版 Handbook 31 ページ、Appendix F 参照。
サイクル数	25 ~ 40		サイクル数はテンプレート RNA の量およびターゲット転写物の量に依存する。英語版 Handbook 30 ページ、Appendix C 参照。
最終エクステンション	10 分	72℃	

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit および Q-Solution を用いた プロトコール

本プロトコールは、1 ステップ RT-PCR で Q-Solution™ を使用するためのものです。Q-Solution は核酸の変性環境を変え、スタンダード条件では良い結果が得られない RT-PCR を改善します。Q-Solution を特殊なプライマーテンプレートシステムに初めて使用する場合には、常に Q-Solution を使用、未使用の反応を同時に並行して行なってください。特定のプライマーテンプレートシステムで旧来の DMSO のような他の RT-PCR 添加物を使用していた場合にも同時に行ない比較することをお薦めします。

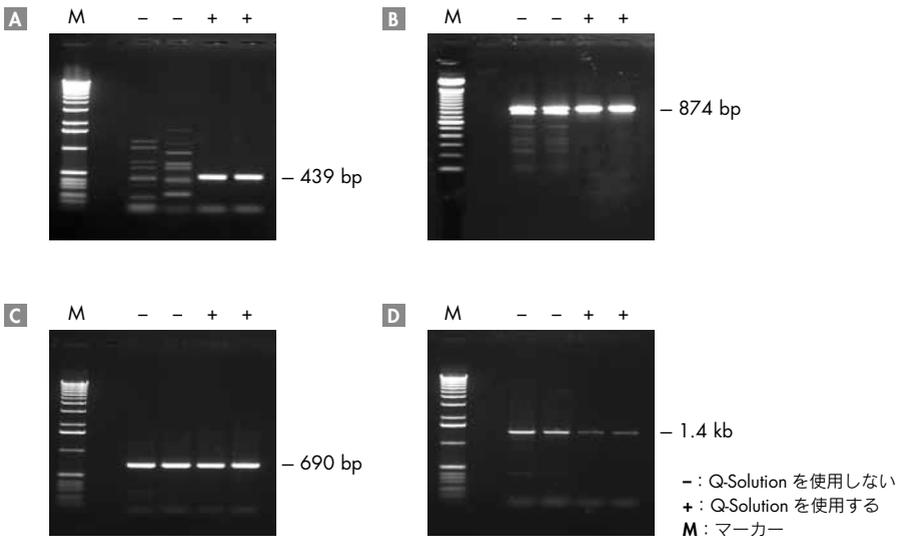
Q-Solution を使用した場合、それぞれの RT-PCR アッセイにより異なりますが、以下のような影響が観察されます。

ケース A： Q-Solution は目的の増幅産物が得られなかった RT-PCR を改善します。

ケース B： Q-Solution はプライマーテンプレートシステムで RT-PCR の特異性を高めます。

ケース C： Q-Solution の RT-PCR への影響はありません。

ケース D： Q-Solution の添加により最適であったプライマーテンプレートのアニーリングが妨害された場合、以前は成功した増幅反応が失敗したり、効率が低下することがあります。このため、特殊なプライマーテンプレートシステムに初めて Q-Solution を使用する場合には、Q-Solution を使用、未使用の場合の反応を常に同時並行して行なってください。



実験前の注意事項

- HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix に含有) は増幅反応を行なう前に **95°C** で **15 分間** インキュベートし、**まず活性化** してください (本プロトコールのステップ 6 を参照)。このインキュベーションにより逆転写酵素は非活性化されます。逆転写酵素反応が終了するまで HotStarTaq DNA Polymerase を加熱して活性化しないでください。
- Q-Solution は核酸の変性環境を変え、スタンダード条件では良い結果が得られないプライマーテンプレートに使用できます。Q-Solution を特殊なプライマーテンプレートシステムに初めて使用する場合には、常に Q-Solution を使用、未使用の反応を同時に並行して行なってください。
- QIAGEN OneStep RT-PCR Kit は遺伝子特異的な**プライマー**の最終濃度が **0.6 μM** で使用するようデザインされています。ランダムなオリゴマーや oligo-dT プライマーを使用すると非特異的な増幅産物が得られるためお薦めできません。
- 全ての反応セットアップは、氷上で行なってください。
- サンプルを入れる前にサーマルサイクラーが 50°C に予熱されていることを確認してください。
- 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer では、反応溶液での MgCl_2 の最終濃度を、ほとんどの場合に良い結果をもたらす 2.5 mM に調製してあります。
- 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。
- マスターミックス溶液のセットアップは、RNA 調製あるいは PCR 産物の解析を行なう場所では行なわないでください。
- 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 ミックス、5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer、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は使用前に十分に混合してください。
2. **マスターミックスを表 4 に従って調製する。**
マスターミックスは、テンプレート RNA 以外の RT-PCR に必要な全ての成分を含んでいます。マスターミックスは、実験する反応サンプルの数に必要な量より 10% 増しに調製してください。全ての実験でネガティブコントロール (テンプレート RNA なし) は必ず行なってください (英語版 Handbook 34 ページ、Appendix J 参照)。
Q-Solution を特殊なプライマーテンプレートシステムに初めて使用する場合には、常に Q-Solution を使用、未使用の反応を同時に並行して行なってください。
3. **マスターミックスを十分に混ぜ、PCR チューブに適量分注する。**
マスターミックスをピペットで吸排出して静かに混和してください。

表 4. Q-Solution を用いた 1 ステップ RT-PCR 用反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
マスターミックス		
RNase フリー水 (付属品)	適量	-
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer*	10.0 µl	1x
dNTP Mix (各 dNTP 10 mM を含有)	2.0 µl	各 dNTP 400 µM
5x Q-Solution	10.0 µl	1x
プライマー A	適量	0.6 µM†
プライマー B	適量	0.6 µM†
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2.0 µl	-
RNase 阻害剤 (オプション)‡	適量	5 ~ 10 ユニット／反応
テンプレート RNA	適量	1 pg ~ 2 µg / 反応
テンプレート RNA、ステップ 4 で添加		
トータル容量	50.0 µl	-

* 12.5 mM MgCl₂ 含有。

† ほとんどのプライマーテンプレートシステムにおいてプライマーの最終濃度は 0.6 µM が最適であるが、いくつかのケースでは異なるプライマー濃度 (例; 0.5 ~ 1.0 µM) で増幅が改善されることもある。

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

4. テンプレート RNA (≤2 µg / 反応) を各 PCR チューブに添加する。

QIAGEN 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. 加熱蓋付きサーマルサイクラーの場合は、ミネラルオイルは使用しないで直接ステップ 6 へ進む。それ以外は、ミネラルオイル約 50 µl を溶液の上に重層する。

6. サーマルサイクラーをの表 5 (8 ページ) に従ってプログラムする。

表 5 には典型的なサーマルサイクラープログラムが掲載されています。このプログラムは逆転写反応と PCR の両方のステップを含んでいます。PCR 増幅は 95°C で 15 分間 HotStarTaq DNA Polymerase をまず活性化することにより始まります。最高の収量および特異性を得るためには、温度やサイクル時間をそれぞれ新しいターゲットとプライマーペアごとに最適化が必要です。

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℃ に達するまで待つ。サーマルサイクラーに PCR チューブを入れる。

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

表 5. サーマルサイクラー条件

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。しかし 50℃ で満足できる結果が得られない場合には、反応温度を 60℃ まで上げてよい。
PCR 初期活性化	15 分	95℃	HotStarTaq DNA Polymerase はこのヒーティングステップで活性化される。同時に Omniscript および Sensiscript Reverse Transcriptase は非活性化され、テンプレート cDNA は変性される。
3 ステップサイクリング			
変性：	0.5 ~ 1 分	94℃	
アニーリング：	0.5 ~ 1 分	50 ~ 68℃	プライマーの T_m より約 5℃ 低い温度
エクステンション：	1 分	72℃	1 ~ 2 kb の RT-PCR 産物ではエクステンション時間は 30 ~ 60 秒まで。2 kb 以上の RT-PCR 産物の場合には英語版 Handbook 31 ページ、Appendix F 参照。
サイクル数	25 ~ 40		サイクル数はテンプレート RNA の量およびターゲット転写物の量に依存する。英語版 Handbook 30 ページ、Appendix C 参照。
最終エクステンション	10 分	72℃	

トラブルシューティング

コメント

産物が少ない、または皆無である

- | | |
|--|--|
| 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 ミックス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ールのステップ 6 に記述されている HotStarTaq DNA Polymerase 活性化ステップ (95°C、15 分間) が含まれているかどうかを確認する (3、7 ページ)。 |
| 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する。HotStarTaq DNA Polymerase を活性化 (95°C、15 分間) する前に逆転写反応が完了していること (50°C、30 分間) 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 で満足できる結果が得られない場合には反応温度を 45 ~ 60°C に変更してみる。 |
| e) プライマー濃度が適切
でないかプライマーが
分解 | プライマー濃度は 0.6 μM を強く推奨する。しかし、この濃度で良い結果が得られない場合には、プライマー濃度を 0.5 ~ 1.0 μM の間で 0.1 μM 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 を行なうときは、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 条件が最適では
ない | 同じサイクリング条件下で Q-Solution を用いて RT-PCR を繰り返す。5 ページのプロトコールに従って行なう。 |
| g) ヌクレオチド濃度が
適切ではない | 各 dNTP とも 0.4 mM で使用する。異なったヌクレオチド濃度により 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
が問題 | スタートテンプレート RNA の濃度、分解されていないこと、純度および保存条件をチェックする (英語版 Handbook 24 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的に希釈する。新しい希釈液を用い RT-PCR を繰り返す。 |

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、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) 酵素濃度が低すぎる | QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix を一反応あたり 2 μ l 使用したか確認する。 |
| j) サイクル数が不十分 | サイクル数を 5 サイクルずつ増加する（英語版 Handbook 30 ページ、Appendix C 参照）。 |
| k) PCR アニーリング温度
あるいは時間が不適確 | アニーリング温度を 2°C 間隔で下げる。アニーリング時間は 30 秒から 60 秒の間にする。最適なアニーリング温度の決定は難しいが、タッチダウン PCR によって多くの場合には解決できる（英語版 Handbook 31 ページ、Appendix E 参照）。 |
| l) 変性温度あるいは
時間が不適確 | 変性は 94°C で 30 ~ 60 秒行なう。サイクリングプログラムがプロトコールのステップ 6 に記述されている HotStarTaq DNA Polymerase 活性化ステップ (95°C、15 分間) を含んでいるか確認する（3、7 ページ）。 |
| m) スタートテンプレートの
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（英語版 Handbook 31 ページ、Appendix D 参照）。 |
| n) プライマーデザインが
最適ではない | プライマーデザインを再考する（英語版 Handbook 25 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。 |
| o) 長いフラグメントの
RT-PCR | テンプレート RNA の濃度を増加する。増幅産物が 2 kb 以上の場合、英語版 Handbook 31 ページ、Appendix F に記述されている改良された反応条件を用いる。 |
| p) 加熱蓋付きサーマル
サイクラーを使用し
ミネラルオイルを反応
溶液の上に重層した | スイッチがオンになっている加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用するときは、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の上に重層しない。 |
| q) サーマルサイクラーの
問題 | サーマルサイクラーのスイッチがオンになっているか、正しくプログラムされているかチェックする。 |

コメント

多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 | 短い 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確 | サンプルを入れる前にサーマルサイクラーが 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 で満足できる結果が得られなかった場合には、反応温度を 2°C ずつ 60°C まで上げる。 |
| d) RT-PCR サイクリング条件が最適ではない | 同じサイクリング条件下で Q-Solution を用いて RT-PCR を繰り返す。5 ページのプロトコールに従って行なう。 |
| 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 ずつ上げる。最適なアニーリング温度の決定は難しいが、タッチダウン PCR を行なって多くの場合には解決できる (英語版 Handbook 31 ページ、Appendix E 参照)。 |
| f) プライマー濃度が適切でないか
プライマーが分解 | プライマー濃度は 0.6 μM を強く推奨する。しかし、この濃度で良い結果が得られない場合には、プライマー濃度を 0.5 ~ 1.0 μM の間で 0.1 μM 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 を行なうときは、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最適ではない | プライマーデザインを再考する (英語版 Handbook 25 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。 |
| h) ゲノム DNA のコンタミ | スタートテンプレート RNA を DNase I で前処理する。または、ゲノム DNA からの増幅を避けるためにターゲット mRNA の splice junction に位置しているプライマーを使用する (英語版 Handbook 34 ページ、Appendix J 参照)。 |

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、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

多数の増幅産物が得られる

- a) スタートテンプレートが過剰 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 24 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的に希釈する。新しい希釈液を用いて RT-PCR を繰り返す。
- b) コンタミの存在 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 産物あるいはスメアー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。全ての反応溶液のセットアップは、RNA 調製または PCR 産物の解析を行なう場所で行なわない。
- c) 室温 (15 ~ 25°C) で反応セットアップ 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不適確 サンプルをサーマルサイクラーに入れる前に 50°C に予熱されていることを確認する。
- e) RT-PCR サイクリング条件が最適ではない 同じサイクリング条件下で Q-Solution を用いて RT-PCR を繰り返す。5 ページのプロトコールに従って行なう。
- f) 酵素濃度が高すぎる QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix を一反応あたり 2 μ l 使用したか確認する。
- 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) プライマー濃度が最適でないか
プライマーが分解 プライマー濃度は 0.6 μ M を強く推奨する。しかし、この濃度で良い結果が得られない場合には、プライマー濃度を 0.5 ~ 1.0 μ M の間で 0.1 μ M 間隔の異なる濃度で RT-PCR を繰り返す。特に高感度の RT-PCR を行なうときは、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。
- i) プライマーデザインが最適ではない プライマーデザインを再考する (英語版 Handbook 25 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。

* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、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。

— Memo —

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, Omniscript®, Q-Solution™, Sensiscript® (QIAGEN Group).

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。

© 2007–2010 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

