

Rotor-Gene™ Probe

プロトコールとトラブルシューティング

Rotor-Gene Probe PCR Kit

Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit

配列特異的なプローブと Rotor-Gene サイ클ラーを用いた迅速なリアルタイム PCR、2 ステップ RT-PCR、1 ステップ RT-PCR

目次

ページ

プロトコール

TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR / 2 ステップ RT-PCR 2

TaqMan プローブを用いた 1 ステップリアルタイム RT-PCR 7

トラブルシューティング 13



プロトコール：TaqMan®プローブ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

- 既に検討済みのプライマー・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、PCR産物の長さは70～200 bpが理想的で、300 bp以上にならないようにします。
- HotStarTaq® Plus DNA Polymeraseを活性化するため、PCRで最初に必ず**95℃で3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。
- 常に2x Rotor-Gene Probe PCR Master Mixに添加済みのMg²⁺濃度で実験を始めてください。

操作手順

1. **2x Rotor-Gene Probe PCR Master Mix**、テンプレートDNAあるいはcDNA、プライマー／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（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 Probe PCR Master Mixに添加済みのMg²⁺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 Probe PCR Master Mix | 12.5 μ l | 1x |
| プライマーA | 適量 | 0.4 μ M |
| プライマーB | 適量 | 0.4 μ M |
| プローブ | 適量 | 0.2 μ M |
| テンプレートDNAまたはcDNA (ステップ4で添加) | 適量 | \leq 100 ng/反応 |
| RNase フリー水 | 適量 | |
| トータル反応容量 | 25 μl | |

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**サイクラーを表2（4ページ）および図1と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 | 3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： | 3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 |

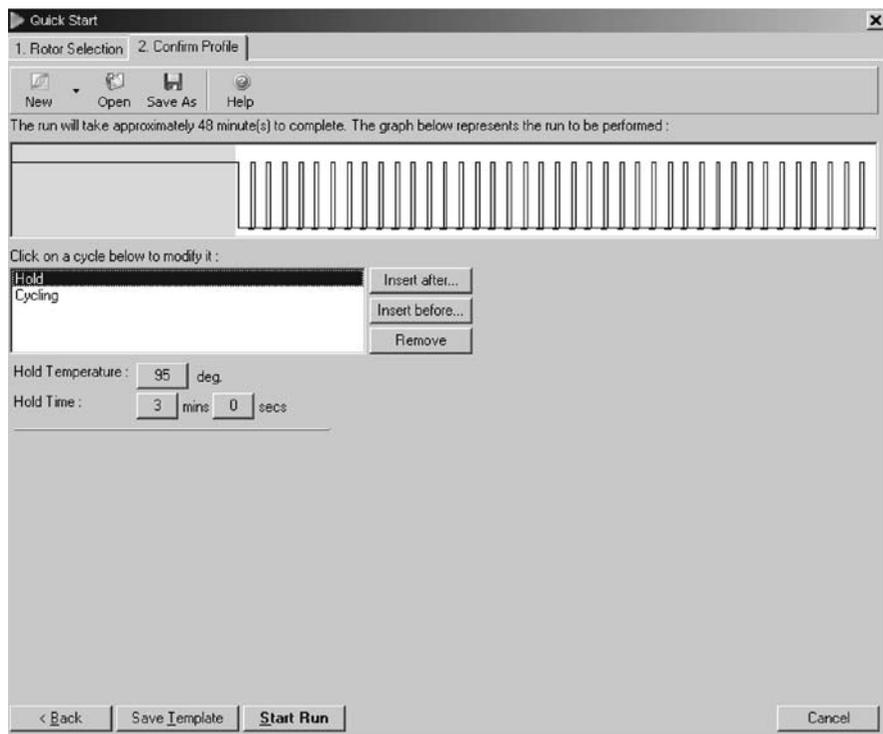


図 1. PCR 初期活性化

HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase を活性化するため、PCR で最初に必ず 95 °C で 3 分間のインキュベーションを行なう。

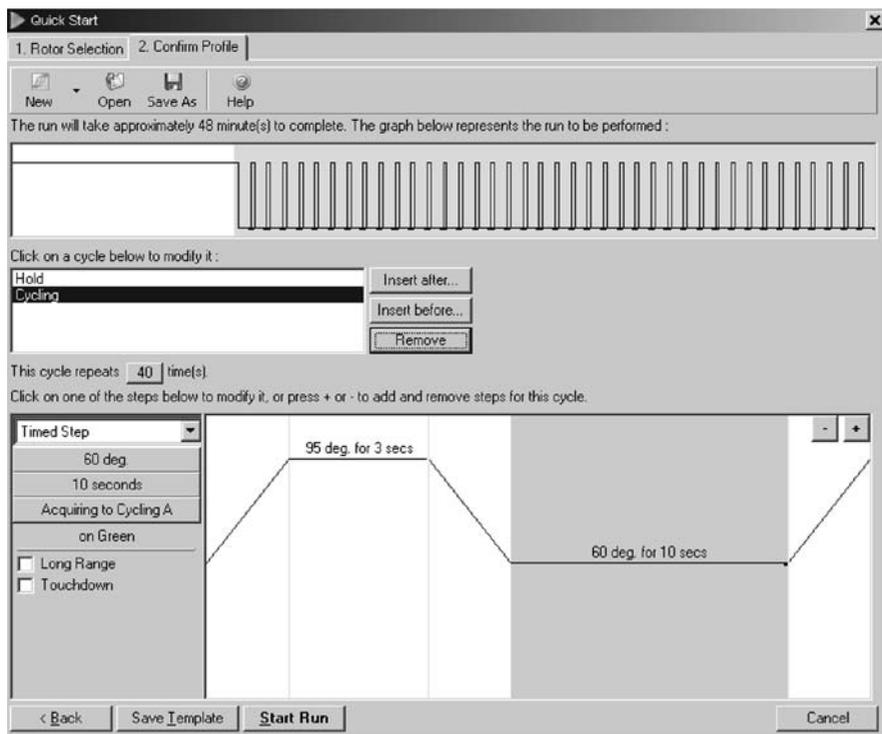


図 2. 2ステップのサイクリング

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3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。

プロトコール：TaqMan プローブを用いた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

- 既に検討済みのプライマー・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RT-PCRには、増幅ターゲットの長さは70～200 bpが理想的で、300 bp以上にならないようにします。
- 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。
- 常に2x Rotor-Gene Probe RT-PCR Master Mixに添加済みのMg²⁺濃度で実験を始めてください。

操作手順

1. **2x Rotor-Gene Probe RT-PCR Master Mix**、テンプレートRNA、プライマー/プローブ溶液、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、使用後は速やかに-20℃に戻す。
2. 表3 (8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 Probe RT-PCR Master Mixに添加済みのMg²⁺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 Probe RT-PCR Master Mix | 12.5 μ l | 1x |
| プライマーA | 適量 | 0.8 μ M |
| プライマーB | 適量 | 0.8 μ M |
| プローブ | 適量 | 0.2 μ M |
| Rotor-Gene RT Mix | 0.25 μ l | |
| RNAテンプレート (ステップ4で添加) | 適量 | \leq 100 ng/反応 |
| RNase フリー水 | 適量 | |
| トータル反応容量 | 25 μl | |

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（9ページ）と図3～5（10～12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いません。

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 | 50℃ | |
| 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 RNA 量に依存 |

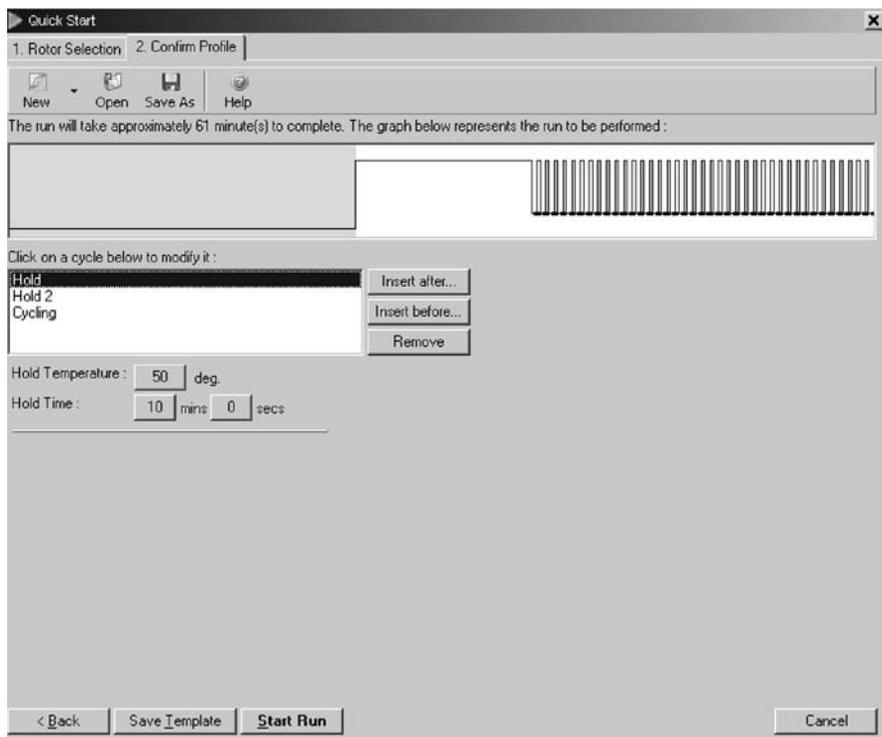


図3. 逆転写反応

PCRを開始する前に、逆転写反応を行なう。50℃で10分間、反応液をインキュベートする。

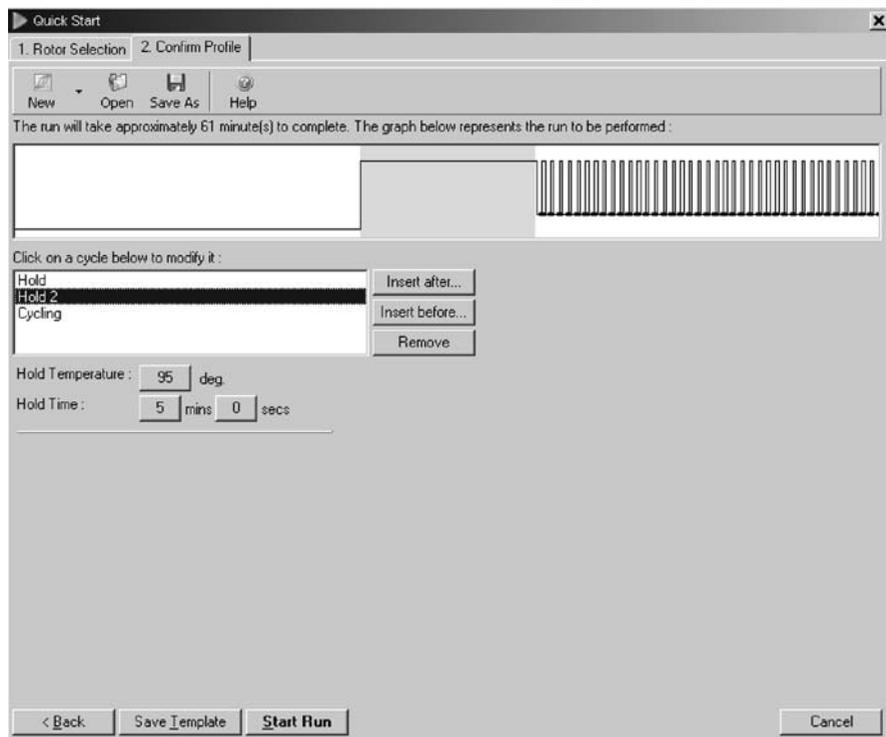


図4. PCR初期活性化

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。

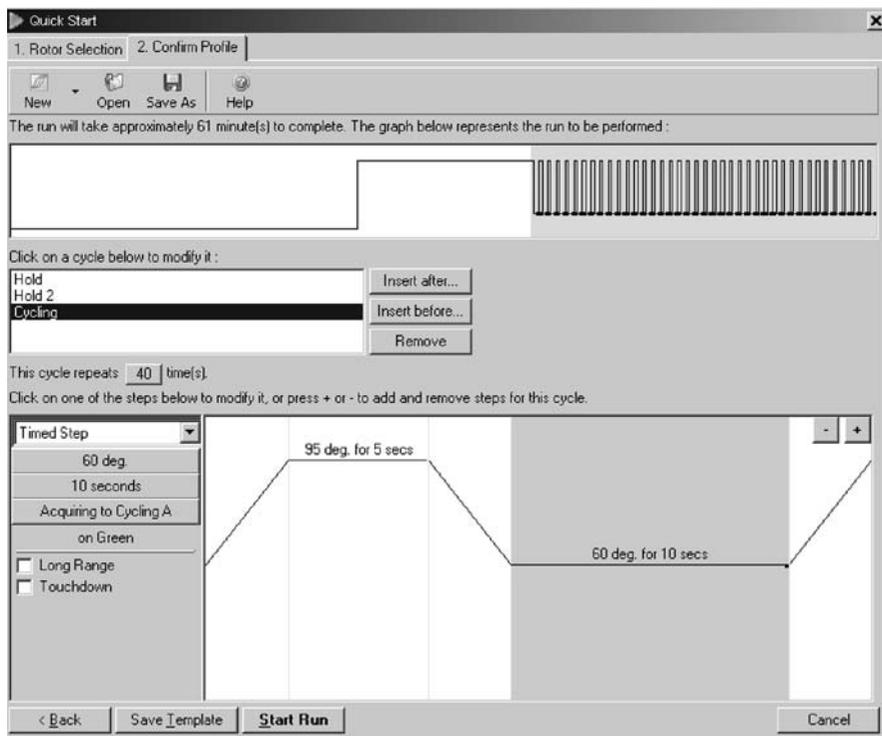


図 5. 2 ステップのサイクリング

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。

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) サイクル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 Plus DNA Polymerase 活性化ステップ (95℃、3あるいは5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。1ステップ RT-PCR を行なう場合は、逆転写反応ステップ (50℃、10分) を行なってから HotStarTaq Plus DNA Polymerase 活性化ステップを行なう。
- b) HotStarTaq Plus 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 Plus DNA Polymerase 活性化ステップ (95℃、3あるいは5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、試薬の濃度と保存条件をチェックする*。PCRを再度行なう。
- d) 蛍光読み取り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。
- 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。TaqMan プローブに関しては、各プライマー濃度を 0.4 μM (PCR および 2ステップ RT-PCR) あるいは 0.8 μM (1ステップ RT-PCR) にする。
- 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。
- 分光光度計でプライマーおよびプローブ濃度をチェックする*。
- 市販のプローブアッセイを使用する場合は (例; TaqMan Gene Expression Assays)、メーカーが推奨するように反応液中の最終濃度を 1x にする。

* 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” を参照してください。

コメント

- | | | |
|----|------------------|---|
| f) | 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、品質をチェックする*。 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。 |
| g) | 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。 |
| h) | サイクル数が少ない | サイクル数を増やす。 |
| i) | 反応量が多すぎた | 最終容量を 25 µl にすることを推奨。 |
| j) | PCR産物が長すぎる | PCR産物は 100 ~ 150 bp の長さにするると最適な結果が得られる。PCR産物の長さが 70 ~ 300 bp を外れないようにする。 |
| k) | プライマーデザインが適切でない | 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* を参照し、デザインを再考する。 |
| l) | 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のなら（これはPCR産物のゲル電気泳動解析によりチェック可能）、プローブに問題のある可能性がある。Probe design guideline* を参照。 |
| m) | 間違った色素チャンネルを選択した | レポーター色素に適切な色素チャンネルを設定したことを確認する。 |
| n) | PCRアニーリング温度が高すぎる | アニーリング温度を 2℃ ずつ下げる。 |
| o) | PCRアニーリング温度が低すぎる | アニーリング温度を 2℃ ずつ上げる。 |
| p) | 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。 |
| q) | プローブ合成が最適でない | DNase I とインキュベーションして、TaqMan プローブ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。 |

* 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

- 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) **2ステップRT-PCRのみ**：添加した逆転写反応液が多すぎると、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。
- t) **1ステップRT-PCR**：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（50℃、10分）が含まれていることを確認する。

テンプレート量対数値と C_T 値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) テンプレートの量が少すぎる 可能な場合にはテンプレートの量を増やす。
- c) **2ステップRT-PCRのみ**：添加した逆転写反応液が多すぎると、増幅効率が低下する。一般に、未希釈の逆転写反応液量はPCR最終反応量の10%を超えないようにする。テンプレートとして大量の逆転写反応液を使用する場合は、使用するアッセイで最高容量を決定する。

No Template Control (NTC；テンプレート無添加のコントロール) で蛍光強度が増加、あるいは C_T 値が小さい

- a) 試薬の汚染 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）を全て廃棄する。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汚染 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。
- 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高い

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。

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。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, QuantiTect® (QIAGEN Group); TaqMan® (Roche Group); Rotor-Gene™ (Corbett Research).

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 (Rotor-Gene Probe PCR Kit and Rotor-Gene Probe RT-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

The purchase price of this product (Rotor-Gene Probe 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 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

