

## **Rotor-Gene™ Multiplex** プロトコールとトラブルシューティング

Rotor-Gene Multiplex PCR Kit

Rotor-Gene Multiplex 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マルチプレックス・リアルタイム PCR、2 ステップ RT-PCR、1 ステップ RT-PCR



# 目次

## プロトコール

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| マルチプレックス・リアルタイム PCR／2 ステップ RT-PCR | 3  |
| マルチプレックス・リアルタイム 1 ステップ RT-PCR     | 8  |
| トラブルシューティング                       | 14 |

# プロトコール：マルチプレックス・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

- 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、singleplex 反応で個別にプライマー／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。
- 最初に英語版 Handbook 14 ページ、“Guidelines for effective multiplex assay” をご覧ください。選んだレポーター色素の組み合わせがご利用の Rotor-Gene サイクラーに適合していることをチェックしてください(英語版 Handbook 15 ページ、Table 1)。
- 既に確立されているマルチプレックス・リアルタイム 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。
- **正確な定量データのためには最適な設定が必須条件の一つです。**データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、解析条件(threshold 値とバックグラウンド補正など)を常に最適化する必要があります。詳細は Rotor-Gene サイクラーに添付のユーザーマニュアルをご覧ください。

## 実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、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。マルチプレックス 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 10  $\mu$ M の forward primer、10  $\mu$ M の reverse primer、4  $\mu$ M のプローブが入っています。

## 操作手順

1. 2x Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix、DNA テンプレートあるいは cDNA、プライマー／プローブ溶液、RNase フリー水を解凍する。それぞれの溶液を混和して氷上で保冷する。

## 2. 表 4 に従って反応ミックスを調製する。

注：2x Rotor-Gene Multiplex 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。

注：ホットスタート PCR であるため、反応のセットアップ中または Rotor-Gene サイ클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。

表 4. 反応セットアップ

| 成分   | 容量／反応                        | 最終濃度   |
|--|------------------------------|--|
| 2x Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix                     | 12.5 $\mu$ l                 | 1x   |
| 20x プライマー／プローブミックス 1*                                      | 1.25 $\mu$ l                 | 0.5 $\mu$ M forward primer 1 <sup>†</sup><br>0.5 $\mu$ M reverse primer 1 <sup>†</sup><br>0.2 $\mu$ M probe 1 <sup>‡</sup> |
| 20x プライマー／プローブミックス 2*                                      | 1.25 $\mu$ l                 | 0.5 $\mu$ M forward primer 2 <sup>†</sup><br>0.5 $\mu$ M reverse primer 2 <sup>†</sup><br>0.2 $\mu$ M probe 2 <sup>‡</sup> |
| <b>Triplex および 4-plex PCR のみ:</b><br>20x プライマー／プローブミックス 3* | 1.25 $\mu$ l                 | 0.5 $\mu$ M forward primer 3 <sup>†</sup><br>0.5 $\mu$ M reverse primer 3 <sup>†</sup><br>0.2 $\mu$ M probe 3 <sup>‡</sup> |
| <b>4-plex PCR のみ:</b><br>20x プライマー／プローブミックス 4*             | 1.25 $\mu$ l                 | 0.5 $\mu$ M forward primer 4 <sup>†</sup><br>0.5 $\mu$ M reverse primer 4 <sup>†</sup><br>0.2 $\mu$ M probe 4 <sup>‡</sup> |
| RNase フリー水   | 適量                           | –  |
| DNA テンプレートまたは cDNA (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>25 <math>\mu</math>l*</b> | –  |

\* マルチプレックス 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 10  $\mu$ M の forward primer、10  $\mu$ M の reverse primer、4  $\mu$ M のプローブ。

† プライマー最終濃度は 0.5  $\mu$ 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。

‡ 最終プローブ濃度は 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、最適濃度の範囲は 0.1~0.4  $\mu$ M。

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. それぞれの PCR チューブに DNA テンプレートあるいは cDNA ( $\leq 100$  ng/反応)を添加する。

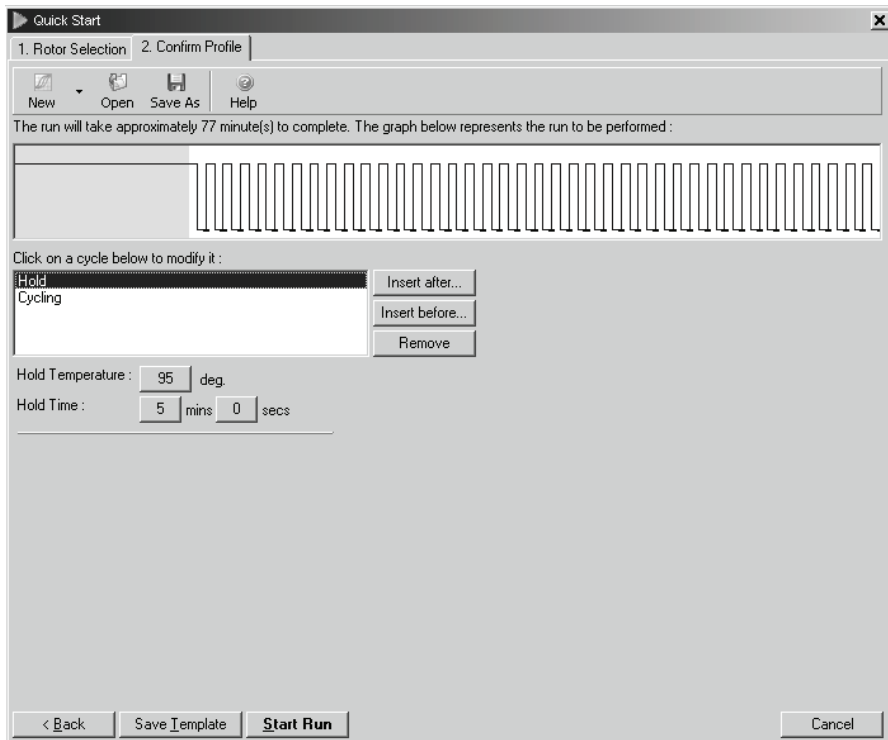
注：2 ステップ RT-PCR では、テンプレートとして添加する cDNA 量(未希釈の逆転写反応液)が最終 PCR 溶液量の 10%を超えないようにします。

5. Rotor-Gene サイ클ラーを表 5 および図 2 と図 3 (6、7 ページ)に従ってプログラムする。

注：Rotor-Gene サイ클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設定を正しく行なってください(例：同じチューブに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チャンネルを選択してください。

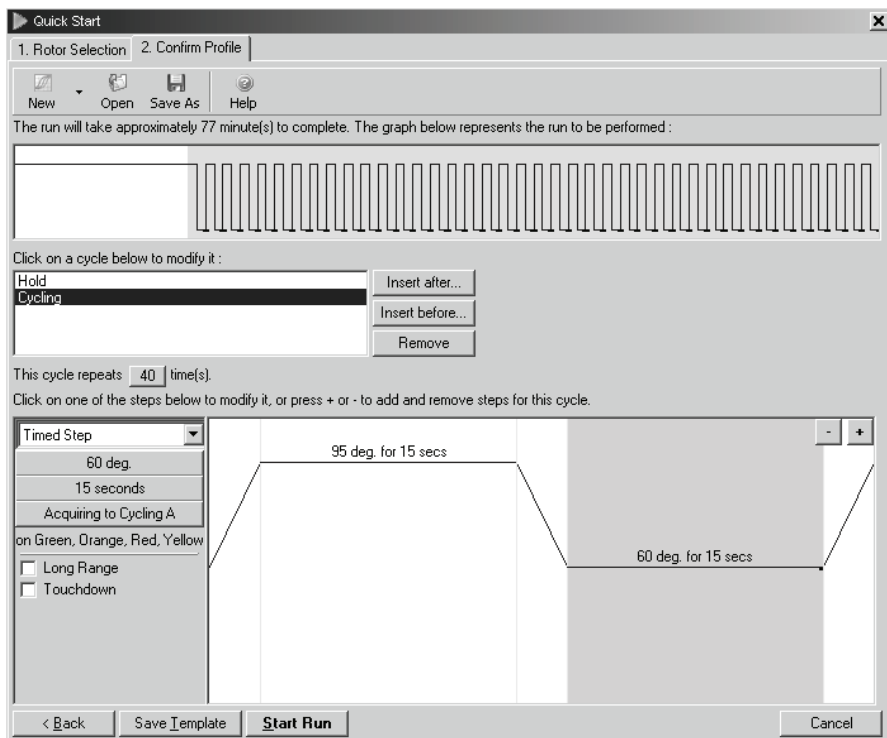
表 5. サイクリング条件

| ステップ                 | 時間    | 温度   | コメント   |
|----------------------|-------|------|--|
| PCR 初期活性化            | 5 分   | 95°C | HotStarTaq® Plus DNA Polymerase はこの加熱ステップで活性化される |
| <b>2 ステップのサイクリング</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                   | 15 秒  | 95°C |  |
| アニーリング／エクステンション      | 15 秒  | 60°C | 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                | 40~45 |      | サイクル数はテンプレート DNA あるいは cDNA の量とターゲット遺伝子の発現量に依存    |



## 図 2. 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 5 分間のインキュベーションを行なう。



**図 3. 2 ステップのサイクリング**

PCRは40~45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°Cで15秒(変性ステップ)と60°Cで15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. データ解析を行なう。

解析設定 (threshold 値など) はチャンネルまたはページごとに行ないます。

# プロトコール：マルチプレックス・リアルタイム 1 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

- 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を開始してください。
- 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、singleplex 反応で個別にプライマー／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。
- 最初に英語版 Handbook 14 ページ、“Guidelines for effective multiplex assay”をご覧ください。選んだレポーター色素の組み合わせがご利用の Rotor-Gene サイクラーに適合していることをチェックしてください(英語版 Handbook 15 ページ、Table 1)。
- 既に確立されているマルチプレックス・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。
- 正確な定量データのためには最適な設定が必須条件の一つです。データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとに、解析条件(threshold 値とバックグラウンド補正など)を常に最適化する必要があります。詳細は Rotor-Gene サイクラーに添付のユーザーマニュアルをご覧ください。

## 実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、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。マルチプレックス 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  $\mu\text{M}$  の forward primer、8  $\mu\text{M}$  の reverse primer、4  $\mu\text{M}$  のプローブが入っています。

## 操作手順

1. 2x Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Master Mix、RNA テンプレート、プライマー／プローブ溶液、RNase フリー水を解凍する。それぞれの溶液を混和して氷上で保冷する。Rotor-Gene 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 6 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で保冷します。

注：2x Rotor-Gene 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。

表 6. 反応セットアップ

| 成分  | 容量／反応                        | 最終濃度   |
|---|------------------------------|--|
| 2x Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Master Mix                     | 12.5 $\mu$ l                 | 1x   |
| 20x プライマー／プローブミックス 1*   | 1.25 $\mu$ l                 | 0.4 $\mu$ M forward primer 1 <sup>†</sup><br>0.4 $\mu$ M reverse primer 1 <sup>†</sup><br>0.2 $\mu$ M probe 1 <sup>†</sup> |
| 20x プライマー／プローブミックス 2*   | 1.25 $\mu$ l                 | 0.4 $\mu$ M forward primer 2 <sup>†</sup><br>0.4 $\mu$ M reverse primer 2 <sup>†</sup><br>0.2 $\mu$ M probe 2 <sup>†</sup> |
| <b>Triplex および 4-plex RT-PCR のみ:</b><br>20x プライマー／プローブミックス 3* | 1.25 $\mu$ l                 | 0.4 $\mu$ M forward primer 3 <sup>†</sup><br>0.4 $\mu$ M reverse primer 3 <sup>†</sup><br>0.2 $\mu$ M probe 3 <sup>†</sup> |
| <b>4-plex RT-PCR のみ:</b><br>20x プライマー／プローブミックス 4*             | 1.25 $\mu$ l                 | 0.4 $\mu$ M forward primer 4 <sup>†</sup><br>0.4 $\mu$ M reverse primer 4 <sup>†</sup><br>0.2 $\mu$ M probe 4 <sup>†</sup> |
| Rotor-Gene RT Mix   | 0.25 $\mu$ l                 | –  |
| RNase フリー水  | 適量                           | –  |
| <b>RNA テンプレート</b><br>(ステップ 4 で添加)                             | 適量                           | ≤100 ng/反応   |
| <b>トータル反応容量</b>   | <b>25 <math>\mu</math>l*</b> | –  |

\* マルチプレックス 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。

† プライマー最終濃度は 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。

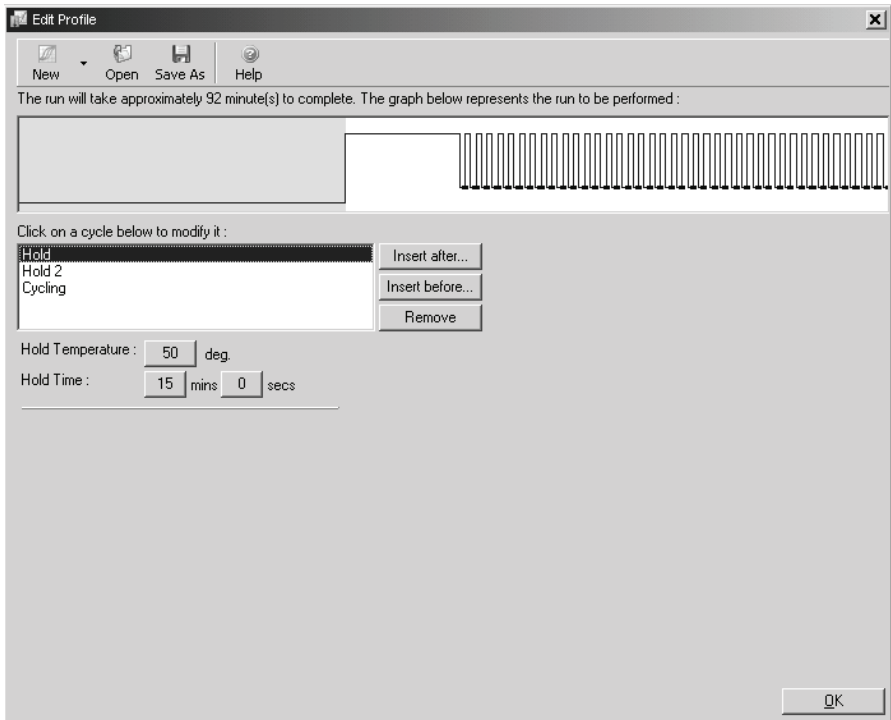
‡ 最終プローブ濃度は 0.2  $\mu$ M でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブ合成の際の品質や使用した精製方法によるが、最適濃度の範囲は 0.1~0.4  $\mu$ M。

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. それぞれの PCR チューブに RNA テンプレート(≤100 ng)を添加する。
5. Rotor-Gene サイ클ラーを表 7 および図 4~6 (11~13 ページ) に従ってプログラムする。

注：Rotor-Gene サイ클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設定を正しく行ってください(例; 同じチューブに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チャンネルを選択してください。

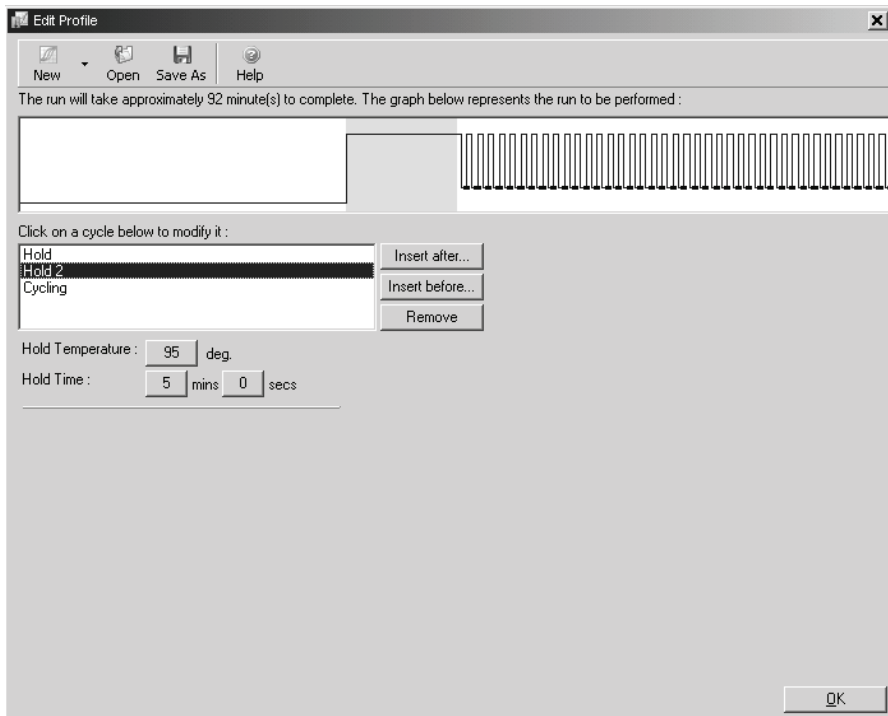
表 7. サイクリング条件

| ステップ            | 時間    | 温度   | コメント  |
|-----------------|-------|------|---|
| 逆転写反応           | 15 分  | 50°C |   |
| PCR 初期活性化       | 5 分   | 95°C | HotStarTaq Plus 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   |       |      | 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               |
| 変性              | 15 秒  | 95°C |   |
| アニーリング／エクステンション | 15 秒  | 60°C | 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           | 40~45 |      | 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           |



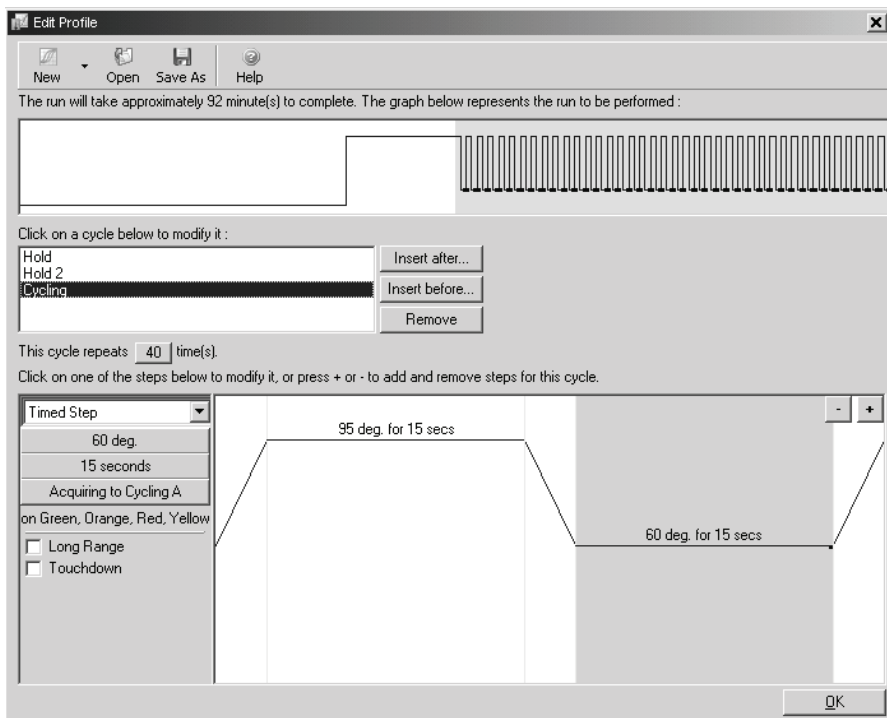
#### 図 4. 逆転写反応

PCRを開始する前に、逆転写反応を行なう。50°Cで15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。HotStarTaq Plus DNA Polymeraseを活性化するため、PCRで最初に必ず95°Cで5分間のインキュベーションを行なう。



**図 6. 2 ステップのサイクリング**

PCRは40～45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°Cで15秒(変性ステップ)と60°Cで15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. データ解析を行なう。

解析設定 (threshold 値など) はチャンネルまたはページごとに行ないます。

# トラブルシューティング

## 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。サイクリング条件で HotStarTaq Plus DNA Polymerase 活性化ステップ (95°C、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°C、15 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°C、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                    | 反応セットアップに使用したピペットをチェックする。各試薬は解凍後によく混ぜ、氷上で保冷する。反応をやり直す。   |
| 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®プローブを用いたアニーリング/エクステンション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。   |

## コメント

- e) プライマーあるいはプローブ濃度が適切でない
- ほとんどの場合、プライマー濃度は  $0.5 \mu\text{M}$  (PCR、2 ステップ RT-PCR) あるいは  $0.4 \mu\text{M}$  (1 ステップ RT-PCR) で満足できる結果が得られる。リアルタイム PCR アッセイによっては、プライマー濃度を  $0.3 \sim 0.6 \mu\text{M}$  に調節することで結果が改善されることがある。
- ほとんどの場合、プローブ濃度は  $0.2 \mu\text{M}$  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、プローブ濃度を  $0.1 \sim 0.4 \mu\text{M}$  に調節することで結果が改善されることがある。特に隣り合ったチャンネルを使用する場合は、プローブ濃度を  $0.1 \mu\text{M}$  に減らしてクロストークを抑える。
- 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 36 ページ、Appendix を参照)。
- 市販のプローブを利用した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。
- f)  $\text{Mg}^{2+}$  濃度が最適でない
- 2x Rotor-Gene Multiplex Master Mix 中の  $\text{Mg}^{2+}$  濃度は既に最適化されているが、 $\text{Mg}^{2+}$  の最終濃度を  $0.5 \sim 1.0 \text{ mM}$  まで増やすと結果が改善されることがある。
- g) スタートテンプレートに問題
- スタート核酸の濃度、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。新しい希釈液を用いてアッセイを再度行なう。
- テンプレート核酸の分離および希釈に使用した試薬、バッファー、溶液のすべてがヌクレアーゼ・フリーであることを確認する。
- h) スタートテンプレート量が不十分
- 可能なら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) サイクル数が少ない
- サイクル数を増やす。

## コメント

- 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。プローブ・デザインのガイドラインを参照する(英語版 Handbook 36 ページ、Appendix 参照)。
- k) 間違った色素チャンネルを選択した  
正しい色素チャンネルが選択されていることを確認する。選択したレポーター色素の組み合わせが色素チャンネルに適合しているかチェックする。
- l) 蛍光のクロストーク  
アッセイに使用したレポーター色素が Rotor-Gene サイ클ラーでのマルチプレックス解析に適切であることをチェックする。クロストーク効果の可能性を検証するために適切なコントロールを用いてテストする。

### マルチプレックス・アッセイと相当する singleplex 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°C、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°C、15 分)を行なってから HotStarTaq Plus DNA Polymerase 活性化ステップを行なう。
- b) 解析の設定値(threshold 値など)が最適でない  
レポーター色素ごとに解析設定を最適化する。各レポーター色素で最適な設定を用いて再度解析する。
- c) レポーター色素のスペクトルが部分的にオーバーラップ  
Multiplex 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、Rotor-Gene サイ클ラーで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、マルチプレックス・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。プローブ濃度を 0.1  $\mu\text{M}$  に減らすと結果が改善することがある。



## コメント

---

### テンプレート量の対数値と $C_T$ 値の相関関係に直線性がない

- a) テンプレート量が  
多すぎる                      シグナルの増幅が非常に早く  $C_T$  値が小さい場合は、適宜バックグラウンド補正機能を選択する。
- b) テンプレート量が  
少なすぎる                      可能ならテンプレート量を増やす。非常にコピー数の少ないサンプルの検出は標準曲線の直線性のある範囲に入らないことがある。

### “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) 試薬がコンタミ                      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繰り返す。
- b) 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。





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

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使用することはできません。

© 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

