

QuantiFast™ Probe Assay

プロトコールとトラブルシューティング

QuantiFast Kit と配列特異的な加水分解プローブを
組み合わせた高速リアルタイム RT-PCR

QuantiFast Probe Assays が入っているキット

QuantiFast Probe Assays は、実施する PCR のタイプに対応した様々な
QuantiFast Kit に同梱されています。

- 1 ステップ RT-PCR (singleplex 検出) : QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit
- 1 ステップ RT-PCR (duplex 検出) : QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit
- 2 ステップ RT-PCR (singleplex 検出) : QuantiFast Probe PCR +ROX Vial Kit
- 2 ステップ RT-PCR (duplex 検出) : QuantiFast Multiplex PCR +R Kit



目次

プロトコール

2 ステップ RT-PCR (Singleplex 検出) 3

2 ステップ RT-PCR (Duplex 検出) 6

1 ステップ RT-PCR (Singleplex あるいは Duplex 検出) 9

トラブルシューティング 13

プロトコール：2 ステップ RT-PCR (Singleplex 検出)

本プロトコールは、Quantifast Probe PCR +ROX Vial Kit と 1 種類の Quantifast Probe Assay を使用するためのものです。

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 **Quantifast Probe Assay 濃度**を必ず使用してください。
- **正確な定量データを得る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 Quantifast Probe Assay ごとに解析の設定（すなわちベースラインと threshold 値）を再調整する必要があります。
- Quantitect® Reverse Transcription Kit を用いて cDNA を合成することを推奨します。このキットは非常に効率的なゲノム DNA 除去を実現します。

実験開始前の準備事項

- 20x Quantifast Probe Assay を次のように調製します；容器をスピンドウンし、TE (キットに同梱) を添加し、ボルテックスで混和。Quantifast Probe Assay (80) には 110 µl、Quantifast Probe Assay (400) には 550 µl の TE を添加してください。

操作手順

1. **2x Quantifast Probe PCR Master Mix (w/o ROX)、テンプレート cDNA、RNase フリー水**を解凍する。各溶液を混和する。

Applied Biosystems® のサイクラーを使用する場合は ROX Dye Solution あるいは High-ROX Dye Solution を解凍します。どちらの ROX Dye Solution を使用するかは英語版 Handbook 10 ページをご覧ください。

2. 表 3 に従って反応ミックスを調製する。

表 3. 2 ステップ RT-PCR の反応セットアップ (Singleplex 検出)

成分	容量／反応 (96 ウェルプレート、 Rotor-Disc™ 72、 Rotor-Disc 100)	容量／反応 (384 ウェル プレート)	最終濃度
2x QuantiFast Probe PCR Master Mix (w/o ROX)	12.5 µl	5 µl	1x
20x QuantiFast Probe Assay	1.25 µl	0.5 µl	1x
オプション：ROX Dye Solution あるいは High-ROX Dye Solution*	0.5 µl	0.2 µl	
RNase フリー水	適量	適量	
テンプレート cDNA	適量	適量	≤100 ng ／反応
トータル反応容量	25 µl [†]	10 µl [†]	

* ROX Dye Solution あるいは High-ROX Dye Solution は ROX を必要とするリアルタイムサイクラーで使用。詳細は英語版 Handbook 10 ページを参照。

† 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 µl あるいは 10 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。

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量を PCR 容器あるいはプレートに分注する。

4. 表 4 に従ってリアルタイムサイクラーをプログラムする。

表 4. 2 ステップ RT-PCR のサイクリング条件 (Singleplex 検出)

ステップ	時間	温度	コメント
PCR 初期活性化	3 分	95℃	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	3 秒	95℃	
アニーリング／ エクステンション	30 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 ～ 45		サイクル数はテンプレート cDNA およびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

5. PCR チューブ、プレートあるいは Rotor-Disc 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。

6. 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）を各 QuantiFast Probe Assay ごとに選択します。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。

プロトコール：2 ステップ RT-PCR (Duplex 検出)

本プロトコールは、QuantiFast Multiplex PCR +R Kit と 2 種類の QuantiFast Probe Assay を使用するのためのものです。

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 **QuantiFast Probe Assay 濃度**を必ず使用してください。
- **正確な定量データを得る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、各レポーター色素チャンネルの解析ごとの設定（すなわちベースラインと threshold 値）を各ランで再調整する必要があります。
- QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて cDNA を合成することを推奨します。このキットは、非常に効率的なゲノム DNA 除去を実現します。

実験開始前の準備事項

- 20x QuantiFast Probe Assay を次のように調製します；容器をスピンドウンし、TE（キットに同梱）を添加し、ボルテックスで混和。QuantiFast Probe Assay (80) には 110 μ l、QuantiFast Probe Assay (400) には 550 μ l の TE を添加してください。

操作手順

1. **2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix (w/o ROX)、テンプレート cDNA、RNase フリー水**を解凍する。各溶液を混和する。

Applied Biosystems のサイクラーを使用する場合は ROX Dye Solution あるいは High-ROX Dye Solution を解凍します。どちらの ROX Dye Solution を使用するかは英語版 Handbook 10 ページをご覧ください。

2. 表 5 に従って反応ミックスを調製する。

表 5. 2 ステップ RT-PCR の反応セットアップ (Duplex 検出)

成分	容量／反応 (96 ウェルプレート、 Rotor-Disc™ 72、 Rotor-Disc 100)	容量／反応 (384 ウェル プレート)	最終濃度
2x QuantiFast Multiplex PCR Master Mix (w/o ROX)	12.5 µl	5 µl	1x
20x QuantiFast Probe Assay (FAM)	1.25 µl	0.5 µl	1x
20x QuantiFast Probe Assay (MAX)	1.25 µl	0.5 µl	1x
オプション：ROX Dye Solution あるいは High-ROX Dye Solution*	0.5 µl	0.2 µl	
RNase フリー水	適量	適量	
テンプレート cDNA	適量	適量	≤100 ng ／反応
トータル反応容量	25 µl [†]	10 µl [†]	

* ROX Dye Solution あるいは High-ROX Dye Solution は ROX を必要とするリアルタイムサイクラーで使用する。詳細は英語版 Handbook 10 ページを参照。

† 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 µl あるいは 10 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。

3. 反応ミックスを完全に混和し、適切な量を PCR 容器あるいはプレートに分注する。

4. 表 6 に従ってリアルタイムサイクラーをプログラムする。

表 6. 2 ステップ RT-PCR のサイクリング条件 (Duplex 検出)

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	30 秒	95℃	
アニーリング／ エクステンション	30 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 ～ 45		サイクル数はテンプレート cDNA およびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

5. PCR チューブ、プレートあるいは **Rotor-Disc** 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。

6. 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）を各 QuantiFast Probe Assay ごとに選択します。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。

プロトコール：1 ステップ RT-PCR (Singleplex あるいは Duplex 検出)

本プロトコールは、QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit と 1 種類 (Singleplex 検出) あるいは 2 種類 (Duplex 検出) の QuantiFast Probe Assay を使用するためのものです。

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 **QuantiFast Probe Assay** 濃度を必ず使用してください。
- 正確な定量データを得る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、各レポーター色素チャンネルの解析ごとの設定 (すなわちベースラインと threshold 値) 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

- 20x QuantiFast Probe Assay を次のように調製します；容器をスピンドウンし、TE (キットに同梱) を添加し、ボルテックスで混和。QuantiFast Probe Assay (80) には 110 μ l、QuantiFast Probe Assay (400) には 550 μ l の TE を添加します。

操作手順

1. **2x QuantiFast Mix 1、2x QuantiFast Mix 2 (Probe)、テンプレート RNA、QuantiFast Probe Assay、RNase フリー水**を解凍する。各溶液を混和する。

Applied Biosystems のサイクラーを使用する場合は ROX Dye Solution あるいは High-ROX Dye Solution を解凍します。どちらの ROX Dye Solution を使用するかは英語版 Handbook 10 ページをご覧ください。

QuantiFast RT Mix は使用直前に -20°C から取り出し、常に氷上で保冷し、使用後はすぐに -20°C に戻します。

2. 表 7 に従ってゲノム DNA 除去用反応ミックスを調製する。

表 7. ゲノム DNA 除去に必要な反応ミックス

成分	容量／反応 (96 ウェルプレート、 Rotor-Disc 72、 Rotor-Disc 100)	容量／反応 (384 ウェル プレート)	最終濃度
2x QuantiFast Master Mix 1	6.25 μ l	2.5 μ l	1x
テンプレート RNA (ステップ 4 で添加)	適量	適量	≤ 100 ng ／反応
RNase フリー水	適量	適量	
トータル反応容量	13 μ l*	5 μ l†	

* これをステップ 6 の QuantiFast reaction mix 12 μ l に添加し、最終反応容量を 25 μ l にする。使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 μ 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。

† これをステップ 6 の QuantiFast reaction mix 5 μ l に添加し、最終反応容量を 10 μ l にする。使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 10 μ 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。

3. ゲノム DNA 除去用反応ミックスを完全に混和し、適切な量を PCR 容器あるいはプレートに分注する。

注：PCR 容器あるいはプレートを氷上で保冷しないでください。

4. それぞれの PCR 容器あるいはプレートにテンプレート RNA (≤ 100 ng) を添加し、室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。

注：インキュベーション時間は 15 分まで延長できます。

5. 表 8 に従って RT-PCR 反応ミックスを調製する。

表 8. 1 ステップ RT-PCR の反応セットアップ (Singleplex あるいは Duplex 検出)

成分	容量／反応 (96 ウェルプレート、 Rotor-Disc 72、 Rotor-Disc 100)	容量／反応 (384 ウェル プレート)	最終濃度
2x QuantiFast Master Mix 2 (Probe)	6.25 µl	2.5 µl	1x
20x QuantiFast Probe Assay (FAM) *	1.25 µl	0.5 µl	1x
20x QuantiFast Probe Assay (MAX) *	1.25 µl	0.5 µl	1x
オプション：ROX Dye Solution あるいは High-ROX Dye Solution †	0.5 µl	0.2 µl	
QuantiFast RT Mix	0.25 µl	0.1 µl	
RNase フリー水	適量	適量	
トータル反応容量	12 µl ‡	5 µl ‡	

* 2 種類の QuantiFast Probe Assay は duplex 検出に、1 種類の QuantiFast Probe Assay は singleplex 検出に使用。

† ROX Dye Solution あるいは High-ROX Dye Solution は ROX を必要とするリアルタイムサイクラーで使用する。詳細は英語版 Handbook 10 ページを参照。

‡ 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 µl あるいは 10 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。

6. RT-PCR 反応ミックスを完全に混和し、適量を、ステップ 4 からのゲノム DNA 除去用反応ミックスが入った PCR 容器あるいはプレートに分注する。

注：リアルタイム用サーマルサイクラーへのセットが 5 分を越える場合には、プレートを氷上で保冷してください。

7. 表 9 に従ってリアルタイムサイクラーをプログラムする。

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。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します。

表 9.1 ステップ RT-PCR のサイクリング条件 (singleplex あるいは duplex 検出)

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	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℃	
アニーリング／ エクステンション	30 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 ～ 45		サイクル数はテンプレート cDNA およびターゲット遺伝子の発現レベルに依存

8. PCR チューブ、プレートあるいは Rotor-Disc 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。
9. 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）を各 QuantiFast Probe Assay ごとに選択します。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。

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。HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase 活性化ステップ (95℃、3 あるいは 5 分、プロトコールにより異なる) 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サイクリング条件に組み込まれていることを確認する。 |
| b) 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℃、3 あるいは 5 分、プロトコールにより異なる) 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 | テンプレート核酸および試薬の濃度や保存条件をチェックする。RT-PCR を再度行なう。 |
| 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 | 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) Mg^{2+} 濃度が最適でない | QuantiFast Mix 中の Mg^{2+} 濃度は至適化済みである。 Mg^{2+} 濃度を 0.5 ~ 1.0 mM 増やすと結果が改善されることがある。 |
| 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、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。

核酸テンプレート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。 |

コメント

- | | | |
|----|------------------------|---|
| g) | 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。 |
| h) | サイクル数が不十分 | サイクル数を増やす。 |
| i) | 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ごと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合しているかチェックする。 |

Duplex RT-PCR の結果と相当する singleplex RT-PCR の結果で、 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。HotStarTaq Plus DNA Polymerase 活性化ステップ (95℃、3 あるいは 5 分、プロトコールにより異なる) と、変性およびアニリング／エクステンションの時間設定がサイクリング条件に組み込まれ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。レポーター色素ごとに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分離が不明確 | Duplex 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、duplex 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 duplex 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、
適宜解析設定を調節する。
- 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” コントロールで蛍光強度が高い、あるいは C_T 値が検出される

- a) 試薬のコンタミ Duplex アッセイに使用した試薬（例；マスターミックス、アッセイ）を全て廃棄する。新しい試薬でも
う一度 duplex アッセイを行なう。
- b) わずかなプローブ分解 増幅プロットをチェックし、threshold 値を調節する。
により蛍光強度が増加

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

- a) ゲノム DNA 除去が
不完全 C_T 値で 40 未満の増幅が稀にある。
RNA 添加後のインキュベーションステップ（1 ステップ RT-PCR 用プロトコルのステップ 4）を 5 分から
15 分まで延長する。
ステップ 4 でインキュベーションに使用した試薬を
氷上で保冷していないことを確認する。
2 ステップ RT-PCR の cDNA 合成に、QuantiTect Reverse
Transcription Kit を用いることを推奨。本キットはゲ
ノム DNA 除去ステップを組み込んでいる。
- b) 配列による影響 RNA 添加後のインキュベーションステップ（ステッ
プ 4）を最高 15 分間に延長しても C_T 値が 40 未満の
増幅が稀にある。

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の
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
サイクラーの再キャリブレーションを行なう。 |
| 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（変更可能なリアルタイム
用サーマルサイクラーの場合）か、テンプレート量
を減らす。 |
| d) | ABI PRISM 7000 :
曲線が滑らかでない、
あるいは標準偏差値が
高い | 反応液量を 25 μ l 以上にする。必ず optical adhesive
cover でプレートをシールする。反応液量を 50 μ l に
増加すると、結果が改善されることがある。 |

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, QuantiFast™, QuantiTect® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); LightCycler® (Roche Group); Rotor-Disc™ (Corbett Research).

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。

© 2010–2011 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

