

QuantiFast™ Probe RT-PCR Plus プロトコールとトラブルシューティング

ゲノム DNA 除去を組み込んだ、プローブ法による
リアルタイム定量 1 ステップ RT-PCR 用

目次	ページ
プロトコール	
Duplex RT-PCR (ほとんどの Applied Biosystems Cyclers に対応)	2
Duplex RT-PCR (Rotor-Gene、Applied Biosystems 7500 および その他のサイクラーに対応)	7
トラブルシューティング	12



プロトコール：Duplex RT-PCR（ほとんどの Applied Biosystems Cycler に対応）

本プロトコールは、**Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System** を除く Applied Biosystems のリアルタイム用サーマルサイクラーでの、**QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit** と **TaqMan®** プローブを用いた実験用に最適化されています。詳細は英語版 Handbook 12 ページ、“Passive reference dye” を参照ください。

注：本プロトコールは、1 種類のプライマー・プローブミックスを用いた singleplex RT-PCR にも適合できます。

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。
- Duplex 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。
- 英語版 Handbook 16 ページの “Guidelines for effective duplex assays” をお読みください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム用サーマルサイクラーと適合していることをチェックしてください。
- 既に確立されている duplex 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、各ランにおいて、レポーター色素チャンネルごとに解析の設定（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。

実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、各ターゲット毎に、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。Duplex RT-PCR 用の 20x プライマー・プローブミックスは、TE バッファー中に 8 μ M の forward primer、8 μ M の reverse primer、4 μ M のプローブが入っています。また、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。
- QuantiFast Probe Assay をご使用になる場合は、プロダクトシートの説明に従って TE バッファーで調製してください。調製後、QuantiFast Probe Assays (20x) を以下のプロトコールでご使用いただけます。

操作手順

1. **2x QuantiFast Mix 1**、**2x QuantiFast Mix 2 (Probe)**、**High ROX Dye Solution**、**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。各溶液を混和する。**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 に戻す。
2. 表 15 に従ってゲノム DNA 除去に必要な反応ミックスを準備する。

表 15. ゲノム DNA 除去に必要な反応ミックス

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiFast Mix 1	6.25 μl	1x
テンプレート RNA (ステップ 4 で添加)	適量	$\leq 100 \text{ ng}$ ／反応
RNase フリー水	適量	
トータル容量	13 μl *	

* QuantiFast リアルタイム PCR において最終量 25 μl で反応を行なう場合。

3. 反応ミックスを完全に混和し、PCR チューブあるいは PCR プレーットのウェルに適切な量を分注する。
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 チューブあるいはウェルにテンプレート RNA ($\leq 100 \text{ ng}$) を添加し、室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) 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 16 (4 ページ) に従って **QuantiFast 反応ミックス**を調製する。**QuantiFast Probe Assay** を使用する場合は、表 17 (5 ページ) に従って **QuantiFast 反応ミックス**を調製する。

表 16. QuantiFast 反応ミックスのセットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiFast Mix 2 (Probe)	6.25 μ l	1x
20x プライマー・プローブ ミックス 1 [†]	1.25 μ l	0.4 μ M forward primer 1 [†] 0.4 μ M reverse primer 1 [†] 0.2 μ M probe 1 [§]
20x プライマー・プローブ ミックス 2 [†]	1.25 μ l	0.4 μ M forward primer 2 [†] 0.4 μ M reverse primer 2 [†] 0.2 μ M probe 2 [§]
High-ROX Dye Solution	0.5 μ l	
QuantiFast RT Mix	0.25 μ l	
RNase フリー水	2.5 μ l	
トータル反応容量	12 μl*	

* 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。Applied Biosystems 7900HT で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10 μ l の反応量を使用する。

† Duplex RT-PCR 用の 20x プライマー・プローブミックスは、TE バッファー中に 8 μ M の forward primer、8 μ M の reverse primer、4 μ M のプローブが入っている。

‡ プライマー最終濃度は 0.4 μ M が最適。プライマー濃度を調節する前に使用中のプライマー溶液の濃度を確認する。

§ 0.2 μ M のプローブ最終濃度でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブの品質や使用した精製方法により、最適濃度は 0.1 ~ 0.4 μ M の間である。

表 17. QuantiFast Probe Assay を用いた QuantiFast 反応ミックスのセットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiFast Mix 2 (Probe)	6.25 µl	1x
20x QuantiFast Probe Assay (FAM)	1.25 µl	1x
20x QuantiFast Probe Assay (MAX)	1.25 µl	1x
High-ROX Dye Solution	0.5 µl	
QuantiFast RT Mix	0.25 µl	
RNase フリー水	2.5 µl	
トータル反応容量	12 µl*	

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 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。Applied Biosystems 7900HT で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10 µl の反応量を使用する。

6. QuantiFast 反応ミックスを完全に混和し、適切な量をゲノム DNA 除去用反応ミックスの入った 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 18 (6 ページ) に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミングを行なう。

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。機器によっては、初めて使用するレポーター色素ごとにキャリブレーション操作が必要になることがあります。

8. 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）を各プローブごとに選択します。正確な定量データのためには最適な解析設定が必須条件の一つです。

表 18. 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	20 分	50℃	RNA は cDNA に逆転写される
PCR 初期活性化	5 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	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 RNA およびターゲット遺伝子の発現 レベルに依存

プロトコール：Duplex RT-PCR（Rotor-Gene™、Applied Biosystems 7500 およびその他のサイクラーに対応）

本プロトコールは、Rotor-Gene System および Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System、Bio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Eppendorf®、Roche®、Stratagene® のリアルタイム用サーマルサイクラー上での、TaqMan プローブと QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit を用いた実験用に最適化されています。詳細は英語版 Handbook 12 ページ、“Passive reference dye” を参照ください。

注：本プロトコールは、1 種類のプライマー・プローブミックスを用いた singleplex RT-PCR にも適合できます。

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。
- Duplex 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。
- 英語版 Handbook 16 ページの “Guidelines for effective duplex assays” をお読みください。選んだレポーター色素の組み合わせがお客様のリアルタイム用サーマルサイクラーと適合していることをチェックしてください。
- 既に確立されている duplex 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、各ランにおいて、レポーター色素チャンネルごとに解析の設定（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。
- **LightCycler® 2.0** あるいは **LightCycler 480** を使用する際は、color compensation ファイルを作成します。実験に関する詳細は www.qiagen.com/literature で QIAGEN Supplementary Protocol PCR81 (LightCycler 2.0) あるいは PCR82 (LightCycler 480) をダウンロードしてご覧ください。

実験開始前の準備事項

- 実験の簡便化のために、各ターゲット毎に、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。Duplex RT-PCR 用の 20x プライマー・プローブミックスは、TE バッファー中に 8 μ M の forward primer、8 μ M の reverse primer、4 μ M のプローブが入っています。また、プライマー溶液とプローブ溶液を別々に調製して、反応ミックスを準備することも可能です。

- QuantiFast Probe Assayをご使用になる場合は、プロダクトシートの説明に従って TE バッファーで調製してください。調製後、QuantiFast Probe Assays (20x) を以下のプロトコールでご使用いただけます。

操作手順

1. **2x QuantiFast Mix 1**、**2x QuantiFast Mix 2 (Probe)**、**ROX Dye Solution**、**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。各溶液を混和する。**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 に戻す。
2. 表 19 に従ってゲノム DNA 除去に必要な反応ミックスを準備する。

表 19. ゲノム DNA 除去に必要な反応ミックス

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiFast Mix 1	6.25 μl	1x
テンプレート RNA (ステップ 4 で添加)	適量	$\leq 100 \text{ ng} / \text{反応}$
RNase フリー水	適量	
トータル容量	13 μl *	

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 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、**PCR チューブ**、**PCR キャピラリー**あるいは**PCR プレーットのウェル**に適切な量を分注する。
注：PCR 容器あるいはプレートを保冷しないください。
4. それぞれの**PCR チューブ**、**キャピラリー**あるいは**ウェル**に**テンプレート RNA** ($\leq 100 \text{ ng}$) を添加し、室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) 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 20 (9 ページ) に従って **QuantiFast 反応ミックス**を調製する。**QuantiFast Probe Assay**を使用する場合は、表 21 (10 ページ) に従って **QuantiFast 反応ミックス**を調製する。

表 20. QuantiFast 反応ミックスのセットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiFast Mix 2 (Probe)	6.25 μ l	1x
20x プライマー・プローブ ミックス 1 [†]	1.25 μ l	0.4 μ M forward primer 1 [†] 0.4 μ M reverse primer 1 [†] 0.2 μ M probe 1 [§]
20x プライマー・プローブ ミックス 2 [†]	1.25 μ l	0.4 μ M forward primer 2 [†] 0.4 μ M reverse primer 2 [†] 0.2 μ M probe 2 [§]
ROX Dye Solution [¶]	0.5 μ l	
QuantiFast RT Mix	0.25 μ l	
RNase フリー水	2.5 μ l	
トータル反応容量	12 μl*	

* 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。LightCycler 480 で 384 ウェルプレートを用いる場合には、10 μ l の反応量を使用する。

[†] Duplex RT-PCR 用の 20x プライマー・プローブミックスは、TE バッファー中に 8 μ M の forward primer、8 μ M の reverse primer、4 μ M のプローブが入っている。

[‡] プライマー最終濃度は 0.4 μ M が最適。プライマー濃度を調節する前に使用中のプライマー溶液の濃度を確認する。

[§] 0.2 μ M のプローブ最終濃度でほとんどの場合満足できる結果が得られる。プローブの品質や使用した精製方法により、最適濃度は 0.1 ~ 0.4 μ M の間である。

[¶] ROX 色素が不要なサイクラーでは、代わりに RNase フリー水を添加する。

表 21. QuantiFast Probe Assay を用いた QuantiFast 反応ミックスのセットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiFast Mix 2 (Probe)	6.25 µl	1x
20x QuantiFast Probe Assay (FAM)	1.25 µl	1x
20x QuantiFast Probe Assay (MAX)	1.25 µl	1x
ROX Dye Solution †	0.5 µl	
QuantiFast RT Mix	0.25 µl	
RNase フリー水	2.5 µl	
トータル反応容量	12 µl*	

* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25 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。

† ROX 色素が不要なサイクラーでは、代わりに RNase フリー水を添加する。

- 6. QuantiFast 反応ミックスを完全に混和し、適切な量をゲノム DNA 除去用反応ミックスの入った 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 22 (11 ページ) に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミングを行なう。**

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。機器によっては、初めて使用するレポーター色素ごとにキャリブレーション操作が必要になることがあります。

- 8. PCR チューブ、キャピラリー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）を各プローブごとに選択します。正確な定量データのためには最適な解析設定が必須条件の一つです。

表 22. 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	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 RNA およびターゲット遺伝子の発現 レベルに依存

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。サイクリング条件で HotStarTaq Plus DNA Polymerase 活性化ステップ (95℃、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。 |
| 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℃、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、核酸テンプレートなどの試薬の濃度と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 | TaqMan プローブを用いた時、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 | <p>ほとんどの場合、ほぼ全てのリアルタイム用サーマルサイクラーでプライマー濃度は 0.4 μM を使用する。プライマー濃度を調節する前に使用中のプライマー溶液の濃度を確認する。</p> <p>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。使用したプローブの品質によっては、0.1 ~ 0.4 μM にプローブ濃度を調節することで結果が改善されることがある。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> |

コメント

-
- | | |
|---------------------------|--|
| f) Mg^{2+} 濃度が最適でない | QuantiFast Mix 2 (Probe) 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。 |
| g) 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精製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) サイクル数が不十分 | サイクル数を増やす。 |
| 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場合は、プローブに問題のある可能性がある。Probe design guideline を参照。 |
| k) 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。 |
| 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サイクラー上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。 |

Duplex RT-PCR アッセイと相当する singleplex RT-PCR 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。サイクリング条件で HotStarTaq Plus DNA Polymerase 活性化ステップ (95℃、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。
- 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。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) 試薬がコンタミ Duplex アッセイに使用した試薬（例；マスターミックス、プライマー、プローブ）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高い

- a) ゲノム DNA 除去が C_T 値が 40 未満であることが稀にある。
不完全 RNA 添加後のインキュベーションステップ（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。
- 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 未満であることが稀にある。

蛍光強度がばらつく

- a) リアルタイム用 メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマル
サーマルサイクラーが サイクラーのコンタミを除去する。
コンタミ
- b) リアルタイム用 メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマル
サーマルサイクラーの サイクラーの再キャリブレーションを行なう。
較正がずれている
- c) ターゲットの発現が高 解析設定でバックグラウンドを計算するために使用
く多量のテンプレート するサイクル数を減らす（変更可能なリアルタイム
で曲線が波状になる 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** : 反応液量を 25 μ l 以上にする。必ず optical adhesive
曲線が乱れる、あるい cover でプレートをシールする。反応液量を 50 μ l に
は実験結果のばらつき 増加すると、結果が改善されることがある。
が大きい

Trademarks: QIAGEN®, QuantiFast™, HotStarTaq® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Cepheid® (Cepheid); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Eppendorf® (Eppendorf AG); Stratagene® (Stratagene); TaqMan®, Roche®, LightCycler® (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は使用することはできません。

© 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



お客様各位

QuantiFast™ Probe RT-PCR Plus Kit (Cat. no. 204482) に添付の英語版 Handbook (September 2010) に、2 箇所の記載が間違いがあり、下記の通り訂正しお詫びいたします。

Kit Contents (5 ページ)

	(誤)	(正)
■ QuantiFast Mix 1	55 μ l	500 μl
■ QuantiFast Mix 2 (Probe)	55 μ l	500 μl

正しい Kit Contents は以下となります。

QuantiFast Probe RT-PCR Plus Kit	(80)	(400)
Number of 25 μ l reactions	80	400
Cat. no.	204482	204484
2x QuantiFast Mix 1	500 μ l	2 x 1.3 ml
2x QuantiFast Mix 2 (Probe)	500 μ l	2 x 1.3 ml
QuantiFast RT Mix	100 μ l	100 μ l
ROX Dye Solution	45 μ l	210 μ l
High-ROX Dye Solution	45 μ l	210 μ l
RNase-Free Water	1.9 ml	2 x 1.9 ml
Handbook	1	1



Product Description (7 ページの表)

(誤)

ROX passive reference dye *	Optimized concentration of fluorescent dye for normalization of fluorescent signals on all instruments from Applied Biosystems® except Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems
High-ROX Dye Solution	Optimized concentration of fluorescent dye for normalization of fluorescent signals on all instruments from Applied Biosystems except the Applied Biosystems 7500

(正)

ROX passive reference dye	Separate tube of passive reference dye for normalization of fluorescent signals on the Applied Biosystems 7500 and, optionally, on instruments from Stratagene; not required for instruments from Bio-Rad® / MJ Research, Cepheid®, Corbett Research, Eppendorf®, and Roche®
High-ROX Dye Solution	Separate tube of passive reference dye for normalization of fluorescent signals on all instruments from Applied Biosystems except Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems

Trademarks: QIAGEN®, QuantiFast™ (QIAGEN Group).

ご不明な点がございましたら、弊社テクニカルサポートへお問い合わせください。

TEL : 03-6890-7300、FAX : 03-5547-0818、E-mail : techservice-jp@qiagen.com

