

# TopTaq™ PCR

## プロトコールとトラブルシューティング

スタンダードから特殊用途までの至適化不要の  
エンドポイント PCR

目次	ページ
プロトコール	
TopTaq DNA Polymerase を用いた PCR	2
TopTaq DNA Polymerase と Q-Solution を用いた PCR	5
TopTaq Master Mix Kit を用いた PCR	10
トラブルシューティング	13



# プロトコール：TopTaq DNA Polymerase を用いた PCR

## 実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールには、至適化済みのプライマー濃度とほとんどのプライマー・テンプレートシステムで最適なアニーリング温度が記載されています。これらの至適化済みの条件で実験を始めることをお勧めします。
- 最適な PCR パフォーマンスのために、添付の 10x TopTaq PCR Buffer を必ず使用してください。
- DNA を調製あるいは PCR 産物を解析する場所から離れたところで反応液のセットアップを行なってください。
- クロスコンタミを最小限に抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用してください。
- 蛍光強度や吸光度の測定が必要なダウンストリーム・アプリケーションでは、CoralLoad® Concentrate を添加した場合、必ずアプリケーションを行なう前に PCR 産物を精製してください (例；QIAquick® PCR Purification Kit または MinElute® PCR Purification Kit を使用)。

## 実験開始前の準備事項

- 必要に応じて各 dNTP が 10 mM 入った dNTP ミックスを調製します。これを分注して -20 °C で保存します。QIAGEN では PCR グレードの高品質な dNTP ミックス (10 mM) をお届けしています (cat. no. 201900)。

## 操作手順

1. dNTP ミックスおよびプライマー溶液を室温あるいは氷上で解凍する。4 °C で保存していた TopTaq DNA Polymerase、TopTaq PCR Buffer、CoralLoad Concentrate を取り出す。

塩濃度が均一になるように使用前に各溶液、特に TopTaq PCR Buffer を完全に混和することが重要です。

2. 表 1 (3 ページ) に従ってマスターミックスを調製する。

殆どのプライマー・テンプレートシステムでは、反応容器を氷上で保管する必要はありません。ユニークなバッファー組成により、TopTaq DNA Polymerase 反応ミックス中のポリメラーゼ活性は室温で抑制されています。

マスターミックスにはテンプレート DNA 以外の PCR に必要な成分が全て含まれています。PCR 反応の回数に必要なマスターミックス量よりも 10 % 増して調製します。ネガティブコントロール (テンプレート DNA なし) は必ず同時に行ないます。

注：殆どの場合、10x TopTaq PCR Buffer に含まれている 15 mM の Mg<sup>2+</sup> 濃度で良好な結果が得られます。しかし、Mg<sup>2+</sup> 濃度を増加することにより、反応が改善されることもあります (13 ページのトラブルシューティング参照)。

表 1. TopTaq DNA Polymerase を用いた反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
マスターミックス		
10x TopTaq PCR Buffer*	5 µl	1x
dNTP ミックス (各 10 mM)	1 µl	200 µM 各 dNTP
オプション: 10x CoralLoad Concentrate	5 µl	1x
プライマー A	変更可	0.1 ~ 0.5 µM ; <b>0.2 µM</b> は殆どの PCR システムで最適
プライマー B	変更可	0.1 ~ 0.5 µM ; <b>0.2 µM</b> は殆どの PCR システムで最適
TopTaq DNA Polymerase	0.25 µl	1.25 unit / 反応
RNase フリー水	変更可	-
テンプレート DNA		
テンプレート DNA	変更可	反応当たり 1 µg 以下
トータル容量	<b>50 µl</b>	-

注: 反応容量を少なくする場合は、各成分を適宜減らします。

\* 15 mM MgCl<sub>2</sub> 含有。TopTaq DNA Polymerase は必ず 10x TopTaq PCR Buffer と組み合わせて使用してください。

**3. マスターミックスをよく混和し、適切な量を PCR チューブに分注する。**

ピペットでマスターミックスを数回アップダウンするなどして、静かに混和します。PCR Buffer のユニークな組成により、室温では非特異的な DNA 合成が抑えられるので、PCR チューブを氷上に保存する必要はありません。

**4. マスターミックスの入った個々のチューブにテンプレート DNA (反応当たり 1 µg 以下) を添加する。**

RT-PCR の場合には、逆転写反応溶液の一部を添加します。この溶液量は最終 PCR 溶液量の 10% を超えないようにします (英語版 Handbook 35 ページ、Appendix D 参照)。

**5. 加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用する場合には、直ぐにステップ 6 に進む。それ以外のサーマルサイクラーでは、約 50 µl のミネラルオイルを各反応液に重層する。**

**6. メーカーの指示に従ってサーマルサイクラーにプログラムする。**

下記の PCR サイクリング・プログラムは殆どのプライマー・テンプレートシステム用に最適化済みです。しかし、アニーリング温度の最適化が必要な場合には、英語版 Handbook 31 ページの Appendix B を参照してください。

表2. 至適化済みのサイクリング・プロトコール

			コメント
初期変性	3分	94℃	
<b>3ステップサイクリング</b>			
変性:	30秒	94℃	
アニーリング:	30秒	60℃	殆どのPCRシステムでアニーリング温度は <b>60℃</b> が適している。アニーリング温度の至適化が必要な場合には、英語版 Handbook 32ページのTable 12 (Appendix B) を参照。
エクステンション:	1分	72℃	1 kb以上のPCR産物では1 kbのDNA当たり約1分間のエクステンション時間を使用。
サイクル数:	25～35		英語版 Handbook 35ページ、Appendix C参照。
最終エクステンション:	10分	72℃	

7. サーマルサイクラーにPCRチューブをセットし、サイクリングプログラムをスタートする。

注: 増幅後、サンプルは2～8℃で一晩、-20℃では長期間保存できます。

8. **CoralLoad Concentrate** を用いた際は、PCR反応液を直接アガロースゲルにロードできる。ゲルローディング・バッファーおよびマーカー色素を前もって添加する必要がない。

CoralLoad Concentrateにはゲルローディング試薬と2種類のマーカー色素が入っています。DNAの移動距離とアガロースゲル濃度の相関関係は表3を参照してください。

表3. マーカー色素の移動距離

%TAE (TBE)	赤色の色素	オレンジ色の色素
アガロースゲル		
0.8	500 bp (270 bp)	～80 bp (<10 bp)
1.0	300 bp (220 bp)	～40 bp (<10 bp)
1.5	250 bp (120 bp)	～20 bp (<10 bp)
2.0	100 bp (110 bp)	<10 bp (<10 bp)
3.0	50 bp (100 bp)	<10 bp (<10 bp)

## プロトコール： TopTaq DNA Polymerase と Q-Solution を用いた PCR

本プロトコールは PCR 反応で Q-Solution™ を使用するためにデザインされています。Q-Solution は DNA の変性環境を変えることにより、スタンダードな条件では増幅されない PCR を可能にします。Q-Solution を特定のプライマーとテンプレートの組み合わせで初めて使用する際には、常に Q-Solution 添加と未添加の反応を同時に行なってください。特定のプライマーとテンプレートの組み合わせに以前 DMSO のような他の PCR 添加物を使用していた場合にも、同様に実験することを推奨します。

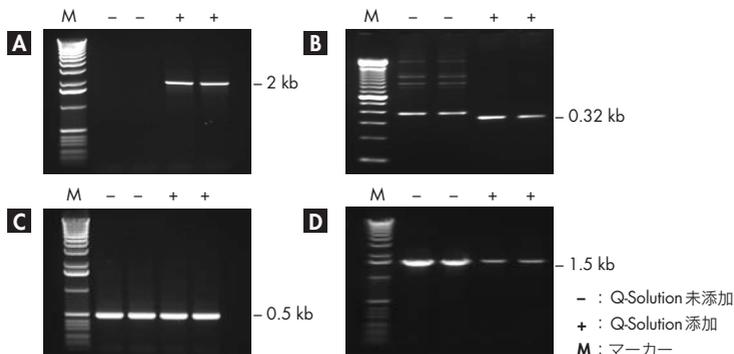
Q-Solution を使用した際、個々の PCR アッセイに依存して、次のような影響が観察されることがあります。

ケース A： Q-Solution によって以前には得られなかった産物が増幅可能になった。

ケース B： Q-Solution によりある種のプライマー・テンプレートシステムで PCR の特異性が増大した。

ケース C： Q-Solution は PCR パフォーマンスに関与しなかった。

ケース D： Q-Solution によってこれまで成功した増幅反応が失敗したり、増幅効率が減少した。このように Q-Solution の添加が適切なプライマー・テンプレートアニーリングを妨害することもある。従って Q-Solution を特定のプライマーとテンプレートの組み合わせで初めて使用する際には、Q-Solution を使用と未使用の反応を常に同時に行なってください。



## 実験を始める前の重要事項

- 初めてのプライマー・テンプレートシステムに Q-Solution を使用する場合には、必ず Q-Solution を添加および未添加の増幅反応を同時に行ないます。
- 本プロトコルには、至適化済みのプライマー濃度とほとんどのプライマー・テンプレートシステムで最適なアニーリング温度が記載されています。これらの至適化済みの条件で実験を始めることをお勧めします。
- 最適な PCR パフォーマンスのために、添付の 10x TopTaq PCR Buffer を必ず使用してください。
- DNA を調製あるいは PCR 産物を解析する場所から離れたところで反応液のセットアップを行なってください。
- クロスコンタミを最小限に抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用してください。
- 蛍光強度や吸光度の測定が必要なダウンストリーム・アプリケーションでは、CoralLoad Concentrate を添加した場合、必ずアプリケーションを行なう前に PCR 産物を精製してください（例； QIAquick PCR Purification Kit または MinElute PCR Purification Kit を使用）。

## 実験開始前の準備事項

- 必要に応じて各 dNTP が 10 mM 入った dNTP ミックスを調製します。QIAGEN では PCR グレードの高品質な dNTP ミックス (10 mM) をお届けしています (cat. no. 201900)。

## 操作手順

1. **dNTP ミックスおよびプライマー溶液を室温または氷上で解凍する。4°C で保存していた TopTaq DNA Polymerase、TopTaq PCR Buffer、CoralLoad Concentrate、Q-Solution を取り出す。**

塩濃度が均一になるように使用前に各溶液、特に TopTaq PCR Buffer を完全に混和します。

Q-Solution を使用する際は、通常 MgCl<sub>2</sub> を添加する必要はありません。

2. **表 4 (7 ページ) に従ってマスターミックスを室温で調製する。**

殆どのプライマー・テンプレートシステムでは、反応容器を氷上で保管する必要はありません。ユニークなバッファー組成により、TopTaq DNA Polymerase 反応ミックス中のポリメラーゼ活性は室温で抑制されています。

マスターミックスにはテンプレート DNA 以外の PCR に必要な成分が全て含まれています。PCR 反応の回数に必要なマスターミックス量よりも 10% 増しで調製します。ネガティブコントロール（テンプレート DNA なし）は必ず同時に行ないます。

表 4. TopTaq DNA Polymerase と Q-Solution を用いた反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
<b>マスターミックス</b>		
10x TopTaq PCR Buffer*	5 $\mu$ l	1x
オプション：10x CoralLoad Concentrate	5 $\mu$ l	1x
5x Q-Solution	10 $\mu$ l	1x
dNTP ミックス (各 10 mM)	1 $\mu$ l	200 $\mu$ M 各 dNTP
プライマー A	変更可	0.1 ~ 0.5 $\mu$ M； <b>0.2 <math>\mu</math>M</b> は殆どの PCR システムで最適
プライマー B	変更可	0.1 ~ 0.5 $\mu$ M； <b>0.2 <math>\mu</math>M</b> は殆どの PCR システムで最適
TopTaq DNA Polymerase	0.25 $\mu$ l	1.25 unit／反応
RNase フリー水	変更可	-
<b>テンプレート DNA</b>		
テンプレート DNA、 ステップ 4 で添加	変更可	反応当たり 1 $\mu$ g 以下
<b>トータル容量</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	-

注：反応容量を少なくする場合は、各成分を適宜減らします。

\* 15 mM MgCl<sub>2</sub> 含有。TopTaq DNA Polymerase は必ず 10x TopTaq PCR Buffer と組み合わせて使用してください。

**3. マスターミックスをよく混和し、適切な量を PCR チューブに分注する。**

ピペットでマスターミックスを数回アップダウンするなどして、静かに混和します。PCR Buffer のユニークな組成により、室温では非特異的な DNA 合成が抑えられるので、PCR チューブを氷上に保存する必要はありません。

**4. マスターミックスの入った個々のチューブにテンプレート DNA (反応当たり 1  $\mu$ g 以下) を添加する。**

RT-PCR の場合には、逆転写反応溶液の一部を添加します。この溶液量は最終 PCR 溶液量の 10% を超えないようにします (英語版 Handbook 35 ページ、Appendix D 参照)。

**5. 加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用する場合には、直ぐにステップ 6 に進む。それ以外のサーマルサイクラーでは、約 50  $\mu$ l のミネラルオイルを各反応液に重層する。**

6. メーカーの指示に従ってサーマルサイクラーにプログラムする。

下記のPCRサイクリング・プログラムは殆どのプライマー・テンプレートシステム用に至適化済みです。しかし、アニーリング温度の至適化が必要な場合には、英語版 Handbook 31 ページ、Appendix B を参照してください。

表 5. 至適化済みのサイクリング・プロトコール

			コメント
初期変性	3分	94℃	
<b>3ステップサイクリング</b>			
変性：	30秒	94℃	
アニーリング：	30秒	60℃	殆どのPCRシステムでアニーリング温度は <b>60℃</b> が適している。アニーリング温度の至適化が必要な場合には、英語版 Handbook 32 ページの Table 12 (Appendix B) を参照。
エクステンション：	1分	72℃	1 kb以上のPCR産物では1 kbのDNA当たり約1分間のエクステンション時間を使用。
サイクル数：	25～35		英語版 Handbook 35 ページ、Appendix C 参照。
最終エクステンション：	10分	72℃	

7. サーマルサイクラーにPCRチューブをセットし、サイクリングプログラムをスタートする。

注：増幅後、サンプルは2～8℃で一晩、-20℃で長期間保存できます。

8. **Coraload Concentrate** を用いた際は、PCR 反応液を直接アガロースゲルにロードできる。ゲルローディング・バッファーおよびマーカー色素を前もって添加する必要がない。

Coraload Concentrate にはゲルローディング試薬と2種類のマーカー色素が入っています。DNAの移動距離とアガロースゲル濃度の相関関係は表6を参照してください。

表6. マーカー色素の移動距離

%TAE (TBE)	赤色の色素	オレンジ色の色素
0.8	500 bp (270 bp)	~ 80 bp (<10 bp)
1.0	300 bp (220 bp)	~ 40 bp (<10 bp)
1.5	250 bp (120 bp)	~ 20 bp (<10 bp)
2.0	100 bp (110 bp)	<10 bp (<10 bp)
3.0	50 bp (100 bp)	<10 bp (<10 bp)

# プロトコール：TopTaq Master Mix Kitを用いたPCR

## 実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールには、至適化済みのプライマー濃度とほとんどのプライマー・テンプレートシステムで最適なアニーリング温度が記載されています。これらの至適化済みの条件で実験を始めることをお勧めします。
- DNAを調製あるいはPCR産物を解析する場所から離れたところで反応液のセットアップを行なってください。
- クロスコンタミを最小限に抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用してください。
- 蛍光強度や吸光度の測定が必要なダウンストリーム・アプリケーションでは、CoralLoad Concentrateを添加した場合、必ずアプリケーションを行なう前にPCR産物を精製してください（例；QIAquick PCR Purification KitまたはMinElute PCR Purification Kitを使用）。

## 操作手順

1. プライマー溶液およびテンプレートDNAを解凍する。  
使用前によく混和します。
2. **TopTaq Master Mix**をボルテックスにより簡単に混和し、表7に従って各PCRチューブに**25 µl**ずつ分注する。  
塩濃度が均一になるように使用前にTopTaq Master Mixを完全に混和します。TopTaq Master Mixのユニークなバッファー組成により室温でのポリメラーゼ活性が抑制されるので、殆どのプライマー・テンプレートシステムでは、反応容器を氷上で保管する必要はありません。
3. **Master Mix**の入った個々のPCRチューブに、希釈した適切な量のプライマーミックスを分注する。
4. **DNAテンプレート**（反応あたり**1 µg**以下）をそれぞれのPCRチューブに添加する。  
RT-PCRの場合には、逆転写反応溶液の一部を添加します。この溶液量は最終PCR溶液量の10%を超えないようにします（英語版 Handbook 35 ページ、Appendix D 参照）。

表 7. TopTaq Master Mix を用いた反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
TopTaq Master Mix, 2x	25 $\mu$ l	1.25 units TopTaq DNA Polymerase 1 x TopTaq PCR Buffer* 200 $\mu$ M 各 dNTP
<b>希釈したプライマーミックス</b>		
プライマー A	変更可	0.1 ~ 0.5 $\mu$ M ; <b>0.2 <math>\mu</math>M</b> は殆どの PCR システムで最適
プライマー B	変更可	0.1 ~ 0.5 $\mu$ M ; <b>0.2 <math>\mu</math>M</b> は殆どの PCR システムで最適
オプション : Coraload Concentrate, 10x	5 $\mu$ l	1x Coraload Concentrate
RNase フリー水	変更可	-
<b>テンプレート DNA</b> テンプレート DNA	変更可	反応当たり 1 $\mu$ g 未満
<b>トータル容量</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>	-

注：反応容量を変更する場合は、各成分量を適宜調節します。

\* 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 含有

- 加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用する場合は、ミネラルオイルを使用しない。直ぐにステップ 6 に進む。それ以外のサーマルサイクラーでは、約 50  $\mu$ l のミネラルオイルを各反応液に重層する。
- メーカーの指示に従ってサーマルサイクラーにプログラムする。  
下記の PCR サイクリング・プログラムは殆どのプライマー・テンプレートシステム用に至適化済みです。  
しかし、アニーリング温度の至適化が必要な場合には、英語版 Handbook 31 ページの Appendix B を参照してください。

表8. 至適化済みのサイクリング・プロトコール

			コメント
初期変性	3分	94℃	
<b>3ステップサイクリング</b>			
変性:	30秒	94℃	
アニーリング:	30秒	60℃	TopTaq Master Mixを用いたほとんどのPCRシステムでアニーリング温度は60℃が適している。アニーリング温度の至適化が必要な場合には、英語版 Handbook 32ページのTable 12 (Appendix B) を参照。
エクステンション:	1分	72℃	1 kb以上のPCR産物では1 kbのDNA当たり約1分間のエクステンション時間を使用。
サイクル数:	25~35		英語版 Handbook 35ページ、Appendix C参照。
最終エクステンション:	10分	72℃	

7. サーマルサイクラーにPCR チューブをセットし、サイクリングプログラムをスタートする。

注：増幅後、サンプルは2~8℃で一晩、-20℃では長期間保存できます。

8. CoralLoad Concentrate を用いた際は、PCR 反応液を直接アガロースゲルにロードできる。ゲルローディング・バッファーおよびマーカー色素を前もって添加する必要がない。

CoralLoad Concentrate にはゲルローディング試薬とマーカー色素が入っています。色素の移動距離、アガロースゲルの濃度および泳動バッファーとの相関関係は表9を参照してください。

表9. マーカー色素の移動距離

%TAE (TBE)		
アガロースゲル	赤色の色素	オレンジ色の色素
0.8	500 bp (270 bp)	~ 80 bp (<10 bp)
1.0	300 bp (220 bp)	~ 40 bp (<10 bp)
1.5	250 bp (120 bp)	~ 20 bp (<10 bp)
2.0	100 bp (110 bp)	<10 bp (<10 bp)
3.0	50 bp (100 bp)	<10 bp (<10 bp)

# トラブルシューティングガイド

## コメント

### 増幅産物が皆無あるいは少ない

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| a) ピペッティング・エラー、あるいは試薬の入れ忘れ   | PCRをもう一度行なう。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。   |
| b) 間違ったPCRバッファーを使用           | 最適なパフォーマンスのためにはキットに添付されている10x TopTaq PCR Bufferを用いる。  |
| c) PCRサイクリング条件が最適でない         | 同じサイクリング条件でQ-Solutionを用いてPCRを再度行なう。5ページのプロトコールに従って行なう。  |
| d) プライマー濃度が最適でない、またはプライマーが分解 | TopTaq DNA Polymeraseを用いたほとんどのプライマー・テンプレートシステムで0.2 $\mu\text{M}$ のプライマー最終濃度が最適である。しかしプライマー濃度の最適化が必要な場合は、各プライマー濃度0.1 ~ 0.5 $\mu\text{M}$ (0.1 $\mu\text{M}$ ずつ) でPCRを再度行なう。特に高感度なPCRを行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲルでプライマーが分解していないかを確認する*。 |
| e) 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、品質を確認する (英語版 Handbook 30ページ、Appendix A参照)。ストック溶液からテンプレート核酸の連続希釈溶液を調製する。これを用いてPCRを再度行なう。  |
| f) $\text{Mg}^{2+}$ 濃度が最適でない | 添付の25 mM $\text{MgCl}_2$ 溶液を用いて0.5 mM間隔で1.5 ~ 5.0 mMまでの $\text{Mg}^{2+}$ 最終濃度の範囲でPCRを行なう。   |
| g) 酵素濃度が低すぎる                 | TopTaq DNA Polymeraseを用いた際は50 $\mu\text{l}$ 反応液当たり1.25 unitを使用する。必要の場合は、0.5 unit単位でTopTaq DNA Polymeraseの量を増加する。  |
| h) サイクル数が不十分                 | 5サイクルずつサイクル数を増加する (英語版 Handbook 35ページ、Appendix C参照)。  |
| i) アニーリング温度あるいは時間が正確ではない     | 2°Cずつアニーリング温度を下げる。アニーリング時間は30 ~ 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を用いて多くの場合は解決できる (英語版 Handbook 37ページのAppendix Eを参照)。   |

\* 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

- |  |  |
|--|--|
| j) 変性温度あるいは時間が正確でない                        | 変性は94℃で30～60秒間行なう。PCRプロトコールのステップ6に記載されているように、最初に94℃で3分間のインキュベーションを行なう(4、8、11ページ)。                            |
| k) エクステンション時間が短い                           | エクステンション時間を1分単位で延長する。  |
| l) プライマー・デザインが適切でない                        | プライマー・デザインを再考する(英語版 Handbook 31ページ、Appendix B参照)。  |
| m) RT反応が間違っている                             | RT-PCRでは逆転写反応効率の平均値が10～30%であることを考慮しなければならない。逆転写反応液の添加量は最終PCR溶液量の10%を超えてはならない(英語版 Handbook 35ページ、Appendix D)。 |
| n) 加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用し、ミネラルオイルを重層してPCRを行なった | 加熱蓋付きサーマルサイクラーを使用する際には、PCR産物の収量が減少するのでPCRサンプルの上にミネラルオイルを重層しない。   |
| o) サーマルサイクラーに問題がある                         | 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たかチェックする。   |

### 増幅産物が多数検出

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| a) 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でQ-Solutionを用いてPCRを再度行なう。5ページのプロトコールに従って行なう。  |
| b) アニーリング温度が低過ぎる             | 2℃ずつアニーリング温度を上げる。アニーリング時間は30～60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を用いて多くの場合は解決できる(英語版 Handbook 37ページのAppendix Eを参照)。 |
| c) プライマー濃度が最適でない、またはプライマーが分解 | 各プライマー濃度を0.1～0.5 μM (0.1 μMずつ)でPCRを再度行なう。特に高感度PCRを行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲル*でプライマーが分解していないかをチェックする。                         |
| d) プライマー・デザインが適切でない          | プライマー・デザインを再考する(英語版 Handbook 31ページ、Appendix B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

### スメア状の産物

- a) 最初のテンプレート量が多すぎる
- スタート・テンプレートの濃度と保存温度を確認する（英語版 Handbook 30 ページ、Appendix A 参照）。ストック溶液からテンプレート核酸の連続希釈溶液を新しく調製する。
- この連続希釈溶液を用いて PCR を行なう。PCR 産物を再増幅する際は、最初の PCR 産物を  $10^3 \sim 10^4$  倍に希釈、1  $\mu$ l を再増幅反応に用いる。
- b) キャリーオーバーが混入
- ネガティブコントロールの PCR（テンプレート DNA なし）で PCR 産物あるいはスメア状の産物が観察される場合には試薬をすべて交換する。クロスコンタミを最小限に抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用。DNA を調製あるいは PCR 産物を解析する場所から離れたところで反応液のセットアップを行なう。
- c) 酵素濃度が高すぎる
- TopTaq DNA Polymerase を用いた際は 50  $\mu$ l 反応液当たり 1.25 unit を使用する。TopTaq Master Mix を使用する場合は、50  $\mu$ l 反応液当たり 25  $\mu$ l の TopTaq Master Mix を常に使用する。
- d) サイクル数が多すぎる
- 3 サイクルずつサイクル数を減らす。
- e)  $Mg^{2+}$  濃度が適切でない
- 添付の 25 mM  $MgCl_2$  溶液を用いて 0.5 mM 間隔で 1.5  $\sim$  5.0 mM までの  $Mg^{2+}$  最終濃度で PCR を行なう。
- f) プライマー濃度が最適でない、またはプライマーが分解
- TopTaq DNA Polymerase を用いたほとんどのプライマー・テンプレートシステムで 0.2  $\mu$ M のプライマー最終濃度が最適である。しかしプライマー濃度の最適化が必要な場合は、各プライマー濃度 0.1  $\sim$  0.5  $\mu$ M (0.1  $\mu$ M ずつ) で PCR を再度行なう。特に、高感度 PCR を行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲルでプライマーが分解していないかをチェックする\*。
- g) プライマー・デザインが最適でない
- プライマー・デザインを再考する（英語版 Handbook 31 ページ、Appendix B 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。

---

Trademarks: QIAGEN®, QIAquick®, CoralLoad®, MinElute®, TapTaq™, Q-Solution™ (QIAGEN Group).

Purchase of this product is not accompanied by a license under patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd. No rights to real-time PCR or to any primers, probes or pathogens are conveyed expressly, by implication or by estoppel.

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 製品は全て研究用です。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。

© 2008 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

