

QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR プロトコールとトラブルシューティング

SYBR Green Iを用いたリアルタイム定量1ステップ
RT-PCR用

目次	ページ
プロトコール	
Applied Biosystems Cyclorおよびその他のサイクラーでの リアルタイム1ステップRT-PCR	2
LightCycler 1.xおよび2.0を用いたリアルタイム1ステップRT-PCR	7
トラブルシューティング	11



プロトコール： Applied Biosystems® Cyclyerおよびその他のサイクラーでのリアルタイム1ステップRT-PCR

本プロトコールは、Applied Biosystems、Bio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Corbett、Eppendorf®、Roche®、Stratagene®社などほとんどのリアルタイム用サーマルサイクラーで使用可能です。**LightCycler® 1.x**あるいは**LightCycler 2.0**を使用される場合は、7ページのプロトコールに従ってください。

反応容量

ほとんどのリアルタイム用サーマルサイクラーで50 µlの反応容量を使用します。しかし、**Applied Biosystems 7500 Fast System**あるいは**SmartCycler® system**を使用した場合は25 µlに、**LightCycler 480**を使用する場合は10 µlに減らします。

反応容量を減らす場合は、反応で使用するマスターミックスおよびRTミックスの量も減らします：2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mixの容量は常に最終反応容量の半分にし、QuantiTect RT Mixの量は最終反応容量の1/100にします。さらに、プライマー、テンプレート、UNGの濃度は表1に記載しているものと同じにします（しかし、SmartCyclerシステムを使用する場合は、プライマー濃度を1 µMに増やします）。

実験を始める前の重要事項

- SYBR Green Iを用いた効率的なリアルタイムRT-PCR Kitには、ターゲットの長さを**100～150 bp**にするのが理想です。
- 逆転写反応の後、RT-PCRのPCRステップはまず、**95°Cで15分のインキュベーションを行ない**HotStarTaq® DNA Polymeraseを活性化させます。
- 不完全なcDNA合成を防ぐために、全ての反応液セットアップは氷上で行ないます。
- 本キットは50 µlの最終容量で最適化されています。他の反応液量を用いる場合は、2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master MixおよびQuantiTect RT Mixの量を調整して、これらの溶液の割合が一定になるようにしてください。
- 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix中に既に含有されている**2.5 mM Mg²⁺溶液**で実験を始めることを推奨します。より高濃度のMg²⁺濃度が必要な場合は至適化のためにMgCl₂ストック溶液を用いてください。
- 毎回ランの解析ごとにthreshold値を調整します。
- 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master MixはdUTPを含んでいるので、uracil-N-glycosylase (UNG)を使用する前処理が可能です。しかしその際は**熱感受性UNGのみ**を使用してください。
- **ABI PRISM® 7000**を使用する際にはoptical adhesive coverでPCRプレートを密封することをお勧めします。この機器を使用する際には、最終量が25 µl以下にならないようにします。

- **QuantiTect Primer Assays**を使用する際は、QuantiTect Primer Assay Handbookのプロトコールに従ってください。日本語版のプロトコールとトラブルシューティングも入手可能です。www.qiagen.com/HB/PrimerAssayからダウンロードが可能です。
- **iCycler iQ®、iQ5またはMyiQ**を使用する際は、ウェルファクターは各実験の初めに収集します。システムやピペッティングによるばらつきを補正する際にウェルファクターを使用します。詳細は英語版 Handbook 26 ページ、Appendix A あるいは機器に付属しているユーザーマニュアルをご覧ください。
- **SmartCycler system**を使用する場合は、逆転写反応ステップを20分に短縮します。
- **Applied Biosystems 7500**を使用する際は、初期設定値のthreshold値を低く調節します。詳細は英語版 Handbook 27 ページ、Appendix Bをご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix** (-20℃で保存の場合)、テンプレートRNA、プライマー、RNaseフリー水を解凍する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect RT Mix**は使用直前に-20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに-20℃に戻す。
2. 表1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。

最終反応容量が50 µlでない場合、2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix および QuantiTect RT Mix の割合が一定になるように調整してください。

注：2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix中に既に含有されている2.5 mM Mg²⁺溶液で実験を始めることを推奨します。いくつかのターゲットではMg²⁺濃度を4 mMまで増やすことで、反応が改良されることがあります。

表1. 反応セットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix*	25 μ l [†]	1x
プライマーA	適量	0.5 μ M [‡]
プライマーB	適量	0.5 μ M [‡]
QuantiTect RT Mix	0.5 μ l [§]	
RNAテンプレート（ステップ4で添加）	適量	\leq 500 ng／反応
RNase フリー水	適量	
オプション： Uracil-N-glycosylase (UNG)、熱感受性	適量	1～2 units／反応
トータル反応容量	50 μl	

* 最終濃度 2.5 mMのMgCl₂含有

[†] 50 μ l以外の反応量を使用する場合には、この式を使って2x master mixの量を計算してください：2x master mixの容量 (μ l) = 0.5 x [トータルの反応容量 (μ l)]

[‡] 通常は、最終プライマー濃度は0.5 μ Mが最適です。しかし、各々に最適なプライマー濃度は、0.4 μ Mから1 μ Mのプライマー濃度で決定してください。SmartCycler systemを使用する際は、最終プライマー濃度は1 μ Mが必要です。

[§] 50 μ l以外のトータル反応量を使用する場合には、この式を使ってRT mixの量を計算してください：RT mixの容量 (μ l) = 0.01 x [トータルの反応容量 (μ l)]

3. 反応ミックスを完全に混和してPCRチューブあるいはプレートに適切な量を分注する。

PCRチューブあるいはプレートは氷上で保冷します。

4. テンプレートRNA (\leq 500 ng／反応) を反応ミックスの入った個々のPCRチューブあるいはウェルに添加する。

オプションのUNG処理を行なう場合には、サンプルを10分間以上氷上でインキュベートしてください。

5. 表2に記載したプログラムのアウトラインに従って、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。

表2. リアルタイム用サーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応*	30分	50℃	
PCR初期活性化	15分	95℃	HotStarTaq DNA Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
3 (4) ステップサイクリング			
変性*	15秒	94℃	
アニーリング:	30秒	50~60℃	プライマーの T_m より約5~8℃低い温度
エクステンション:	30秒	72℃	追加データの収集を行なうオプションステップを行なわない場合には蛍光データの収集が行なわれる
オプション: データ収集	15秒	x℃	T_m ダイマー < x < T_m 産物: 詳細はステップ8と9を参照
サイクル数:	35~45		サイクル数はテンプレートRNAと転写物の量に依存

* SmartCyclerを用いる場合はこのサイクラーの特性を利用して、逆転写反応時間を20分に、変性時間を1秒間に短縮することが可能です。

6. PCRチューブあるいはプレートを実タイム用サーマルサイクラーにセットしてサイクリングプログラムをスタートする。

Applied Biosystems 7500を使用される場合は、0.2に設定されているデフォルトの“Manual Ct” threshold値をさらに低く設定(例; 0.02)することでデータ解析が適切に行なわれます。詳細は英語版Handbook 27ページ、Appendix Bをご覧ください。

7. RT-PCR産物の融解曲線解析を行なう。

RT-PCR産物の同定と特異性の確認のためにこの融解曲線解析をルーチンに行なうことを推奨します。融解曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトに組み込まれている解析ステップです。メーカーの説明書に従ってください。一般的には、融解曲線のデータは65~95℃の間で得られます。

注: RT-PCR産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kitを用いて得られた T_m 値は、その他の試薬を用いて得られる値とは異なることがあります。

プライマーのデザインやターゲットのコピー数によって、プライマー・ダイマーが生じることがあります。これらの融解点は低いので、特異的な産物と区別することができます。

8. オプション：追加のデータ収集ステップのためのオプションステップを含んだ一連の操作を繰り返す。

プライマー・ダイマー形成によって起きる蛍光光度を抑えるために、3ステップのサイクリング・プロトコールにオプションのステップを入れて、追加のデータを収集することが可能です（5 ページ、表 2）。温度はプライマー・ダイマーの T_m より高く、特異的な PCR 産物の T_m より約 3°C 低くします。プライマー・ダイマーが同時に増幅する場合には、この方法により、10 の数乗の単位でダイナミックレンジおよび定量の信頼性が増加します。

9. オプション：アガロースゲル電気泳動によって RT-PCR 産物の特異性を調べる。

プロトコール：LightCycler 1.xおよび2.0を用いたリアルタイム1ステップRT-PCR

本プロトコールはLightCycler 1.xおよびLightCycler 2.0のみで使用可能です。その他のサイクラーに関しては、2ページのプロトコールに従って行なってください。

実験を始める前の重要事項

- 既に確立されたプライマー・テンプレート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。
- SYBR Green Iを用いた効率的なリアルタイムRT-PCR Kitには、ターゲットの長さを **100～150 bp** にするのが理想です。
- 逆転写反応の後、RT-PCRのPCRステップはまず、**95℃で15分のインキュベーションを行ないHotStarTaq DNA Polymerase** を活性化させます。
- 不完全なcDNA合成を防ぐために、すべての反応セットアップは冷却したキャピラリー中で行ないます。
- 本キットは20 μ lの最終容量で最適化されています。他の反応液量を用いる場合は、2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master MixおよびQuantiTect RT Mixの量を調整して、これらの溶液の割合が一定になるようにしてください。
- 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix中に既に含有されている**2.5 mM Mg²⁺溶液**で実験を始めることを推奨します。
- データ解析に“fit-point”法を使用する際には、毎回ランの解析ごとに noise bandを調節します。
- 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master MixはdUTPを含んでいるので、uracil-N-glycosylase (UNG)を使用する前処理が可能です。しかしその際は熱感受性UNGのみを使用してください。
- **QuantiTect Primer Assays**を使用する際は、QuantiTect Primer Assay Handbookのプロトコールに従ってください。日本語版のプロトコールとトラブルシューティングも入手可能です。www.qiagen.com/HB/PrimerAssayからダウンロードが可能です。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix** (–20℃で保存の場合)、テンプレートRNA、プライマー、RNaseフリー水を解凍する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect RT Mix**は使用直前に–20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに–20℃に戻す。

2. 表3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キャピラリーを保冷してください。

最終反応容量が20 µlでない場合、2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix および QuantiTect RT Mix の割合が一定になるように調整してください。

注：2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix中に既に含有されている2.5 mM Mg²⁺溶液で実験を始めることを推奨します。いくつかのターゲットではMg²⁺濃度を4 mMまで増やすことで、反応が改良されることがあります。

表3. 反応セットアップ

成分	容量/反応	最終濃度
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix*	10 µl	1x
プライマーA	適量	1 µM [†]
プライマーB	適量	1 µM [†]
QuantiTect RT Mix	0.2 µl	
RNAテンプレート（ステップ4で添加）	適量	≤500 ng/反応
RNase フリー水	適量	
オプション： Uracil-N-glycosylase (UNG)、熱感受性	適量	1～2 units/反応
トータル反応容量	20 µl	

* 最終濃度2.5 mMのMgCl₂含有

[†] 通常は、最終プライマー濃度は1 µMが最適です。しかし、各々に最適なプライマー濃度は、0.5 µMから2 µMのプライマー濃度で決定してください。

3. 反応ミックスを完全に混和し、PCRキャピラリーに適切な量を分注する。

キャピラリーは保冷してください。

4. テンプレートRNA（≤500 ng/反応）を反応ミックスの入った個々のPCRキャピラリーに添加する。

オプションのUNG処理を行なう場合には、冷却したキャピラリーにサンプルを少なくとも10分間インキュベートする。

5. 表4に記載したプログラムのアウトラインに従って、LightCyclerのプログラミングを行なう。表5に記載されているようにfluorescence gainをセットする（LightCyclerソフトウェアのバージョンが3.5より古いものを使用の場合）。

表4. リアルタイム用サーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
逆転写反応	20分	50℃	20℃/秒	
PCR 初期活性化	15分	95℃	20℃/秒	HotStarTaq DNA Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
3 (4) ステップサイクリング				
変性：	15秒	94℃	20℃/秒	
アニーリング：	20～30秒	50～60℃	20℃/秒	プライマーの T_m より約5～8℃低い温度
エクステンション：	30秒	72℃	2℃/秒	追加データの収集オプションステップを行わない場合には蛍光データの収集が行なわれる。エクステンション時間は産物の長さに依存する。100 bpあたり5秒、最低エクステンション時間は10秒にする。
オプション： データ収集	5秒	x℃	20℃/秒	T_m ダイマー $x < T_m$ 産物：詳細はステップ8と9を参照
サイクル数：	35～55			サイクル数はテンプレートRNA量に依存

表 5. 蛍光パラメーター

Fluorimeter gain	Value
Channel 1 (F1)	15
Channel 2 (F2)	10
Channel 3 (F3)	10

Display mode : fluorescence channel 1/1 (F1/1)

LightCyclerソフトウェアバージョン3.5またはそれ以降のものは fluorescence channels用の fluorimeter gainが自動的に調節されます。ユーザーによるセッティングの必要はありません。

6. PCRキャピラリーをLightCyclerにセットして、サイクリングプログラムをスタートする。

“seek sample” 操作時の温度を 50℃にセットします。

7. RT-PCR産物の融解曲線解析を行なう。

RT-PCR産物の同定と特異性の確認のためにこの融解曲線解析をルーチンに行なうことを推奨します。融解曲線解析の解析ステップは、LightCyclerのソフトに組み込まれています。メーカーの説明書に従ってください。一般的には、融解曲線のデータは65℃～95℃の間で得られます。

注：RT-PCR産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kitを用いて得られた T_m 値は、その他の試薬を用いて得られる値とは異なることがあります。

プライマーのデザインやターゲットのコピー数によって、プライマー・ダイマーが生じることがあります。これらの融解点は低いので、特異的な産物と区別することができます。

8. オプション：追加のデータ収集ステップのためのオプションステップを含んだ一連の操作を繰り返す。

プライマー・ダイマー形成によって起きる蛍光光度を抑えるために、3ステップのサイクリング・プロトコルにオプションのステップを入れて、追加のデータを収集することが可能です（9ページ、表4）。温度はプライマー・ダイマーの T_m より高く、特異的なPCR産物の T_m より約3℃低くします。プライマー・ダイマーが同時に増幅する場合には、この方法により、10の数乗の単位でダイナミックレンジおよび定量の信頼性が増加します。

9. オプション：アガロースゲル電気泳動によってRT-PCR産物の特異性を調べる。

トラブルシューティングガイド

コメント

RT-PCR 産物がない、RT-PCR 産物の検出が遅れる、プライマーダイマーのみを検出

- a) アニーリング時間が短すぎる
推奨するアニーリング時間を用いる。
LightCycler 1.x および 2.0 : アニーリング時間は 20 ~ 30 秒。
その他のサイクラー : アニーリング時間は 30 秒。
- b) エクステンション時間が短すぎる
常にプロトコールに記載されているエクステンション時間を用いる。
LightCycler 1.x および 2.0 : エクステンション時間は RT-PCR 産物 100 bp あたり 5 秒、最低エクステンション時間は 10 秒にする。
その他のサイクラー : エクステンション時間は 500 bp までの RT-PCR 産物で 30 秒
- c) Mg^{2+} 濃度が最適ではない
いつも QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix に既に含まれている Mg^{2+} 濃度でスタートする (最終濃度 2.5 mM)。いくつかのターゲットでは Mg^{2+} 濃度を 4 mM まで増加して効果がある。0.5 mM 間隔の異なる濃度でテストする。
- d) ピペット操作ミスあるいは試薬の入れ忘れ
プライマーや RNA テンプレートを含んだ試薬の濃度や保存条件をチェックする*。RT-PCR をやり直す。
- e) HotStarTaq 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 DNA Polymerase 活性化ステップ (95°C、15 分) が含まれていることを確認する。
- f) HotStarTaq DNA Polymerase の活性化が早すぎる
サイクリングプログラムをチェック。HotStarTaq DNA Polymerase を活性化する前に逆転写反応が完了していることを確認する。
LightCycler 1.x および 2.0 : 50°C で 20 分間
その他のサイクラー : 50°C で 30 分間
- g) 逆転写反応の温度が適切でない
逆転写反応は 50°C を推奨する。しかし 50°C で満足できる結果が得られない場合には反応温度を 48 ~ 55°C で変更してみる。

* 詳細は www.qiagen.com/resources/info の “リアルタイム PCR のガイドライン” を参照してください。

コメント

- h) QuantiTect RT Mixの濃度が適正でない
正確な量のQuantiTect RT Mixを使用。
LightCycler 480 : 反応あたり 0.1 µl の RT Mix
LightCycler 1.x および 2.0 : 反応あたり 0.2 µl の RT Mix
SmartCycler および **Applied Biosystems 7500 Fast System** : 反応あたり 0.25 µl の RT Mix
その他のサイクラー : 反応あたり 0.5 µl の RT Mix
- i) QuantiTect RT Mix と QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix の割合が正しくない
標準の反応容量を変更した場合は、QuantiTect RT Mix と QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix の割合が一定になるように QuantiTect RT Mix の量を変えたことを調節する。
- j) RT-PCR 産物が長すぎる
最適な結果を得るには、RT-PCR 産物を 100 ~ 150 bp の長さにする。RT-PCR 産物の長さは 500 bp 以上にならないようにする。
- k) プライマー・デザインが最適でない
融解曲線解析 * あるいはゲル電気泳動で RT-PCR 産物をチェックする。特異的 RT-PCR 産物が検出されない場合は、“アッセイデザインおよびプライマーの取り扱い”を再考する*。または、リアルタイム RT-PCR 用のデザイン済みプライマーセット、QuantiTect Primer Assay を使用する（英語版 Handbook 28 ページの ordering information 参照）。
- l) プライマー濃度が最適でない
適切なプライマー濃度を用いる。
LightCycler 1.x、2.0 および SmartCycler : 各プライマーの濃度は 1 µM。
その他のサイクラー : 各プライマーの濃度は 0.5 µM。分光光度計でプライマー濃度をチェックする*。
- m) スタートテンプレートに問題
スタートのテンプレート RNA の濃度、保存条件、品質についてチェックする*。
必要な場合には、RNA テンプレートのストック溶液を段階的に希釈する。新しい希釈液を用いて RT-PCR を繰り返す。
- n) 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 RNA がサンプル中に存在していることを確認する。

* 詳細は www.qiagen.com/resources/info の “リアルタイム PCR のガイドライン” を参照にしてください。

コメント

- | | |
|---------------------------------------|---|
| o) サイクル数が足りない | サイクル数を増やす。 |
| p) アニール温度が高い | アニール温度を3℃ずつ下げる。 |
| q) 検出が活性化されていない | サイクリングプログラムで蛍光検出が有効かをチェックする。 |
| r) 検出ステップが間違っている | 蛍光検出がサイクリングプログラムのエクステンションステップで行なわれたか確認する。 |
| s) 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。 |
| t) ターゲット転写物が発現していない | RT-PCR 産物が存在しないのは逆転写反応や増幅、検出に問題があるためではないことを確認するために、RT-PCRを繰り返して行ない、ポジティブコントロールも含める*。 |
| u) 熱感受性UNGを使用していない | RT-PCRを開始する前にオプションのUNG処理を行なう際は、 熱感受性UNG のみを使用する。大腸菌のUNGは温度が上がっても安定で、50℃の逆転写反応中に合成されたcDNAを壊すことがある。 |
| v) オプションのデータ収集ステップを行なっている場合：検出温度が高すぎる | データ収集ステップの温度を特異的な産物の T_m より3℃低くする。新しいプライマー/テンプレート系を使用する際に、最初からオプションのデータ収集(プロトコルのステップ8)は行なわず、プロトコル通りの通常の3ステップ・サイクリングで反応を行なう。 |

LightCycler1.x および2.0以外のリアルタイム用サーマルサイクラー

- | | |
|---------------------------|---|
| w) 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有効か、またはSYBR Green Iに正しいフィルターを選択しているかを確認する。 |
|---------------------------|---|

LightCycler 1.x および2.0のみ：

- | | |
|-------------------------------|---|
| x) 選択したfluorescence gainが低すぎる | 3.5以前のソフトウェアバージョンを用いている場合にはchannel 1のfluorescence gainが“15”にセットしてあることを確認する。 |
|-------------------------------|---|

* 詳細はwww.qiagen.com/resources/infoの“リアルタイムPCRのガイドライン”を参照してください。

コメント

プライマー・ダイマーおよび／あるいは非特異的RT-PCR産物

- a) 室温で反応をセットアップした
冷却した反応容器の中にRT-PCRをセットして、非特異的なプライマーアニーリングからのcDNA合成が起きないようにする。
- b) 逆転写反応のスタート条件が適切でない
リアルタイム用サーマルサイクラーにサンプルをセットした直後にRT-PCRプログラムが開始したことを確認する。
- c) Mg^{2+} 濃度が最適ではない
いつも QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix に既に含まれている Mg^{2+} 濃度でスタートする（最終濃度 2.5 mM）。いくつかのターゲットでは Mg^{2+} 濃度を 4 mMまで増加して効果がある。0.5 mM間隔で濃度を増やしてみる。
- d) アニーリング温度が低すぎる
アニーリング温度を 2℃ずつ増やす。
- e) プライマー・デザインが最適でない
プライマーをデザインし直す*。プライマーの再デザインが不可能な場合はプライマー・ダイマーの T_m より高い温度でのデータ収集ステップを加える（プロトコールのステップ5）。または、リアルタイムRT-PCR用のデザイン済みプライマーセット、QuantiTect Primer Assayを使用する（英語版 Handbook 28ページの ordering information 参照）。
- f) ゲノムDNAがRNAサンプルに混入
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をデザインする。あるいは、ゲノムDNAの増幅を回避するようにデザインされたプライマーセット、QuantiTect Primer Assayを使用する（英語版 Handbook 28ページの ordering information 参照）。
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。
- g) RT-PCR産物が長すぎる
最適な結果を得るには、RT-PCR産物を 100～150 bpの長さにする。RT-PCR産物の長さは500 bp以上にならないようにする。
- h) プライマー・ダイマーと一緒に増幅
プロトコールに掲載されているように（6、10ページのステップ8）、サイクリングプログラムに追加の検出ステップを挿入し、プライマー・ダイマーの検出を避ける。

* 詳細は www.qiagen.com/resources/info の“リアルタイムPCRのガイドライン”を参照にしてください。

コメント

- i) 逆転写反応の温度が低すぎる 逆転写反応の温度は 50 °C を推奨。満足する結果が得られない場合には反応温度を 55 °C まで上げることが可能。
- j) 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。

テンプレート量のログ値と 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 反応あたり 500 ng 以上の RNA テンプレートを使わない。
- b) テンプレートの量が低すぎる 可能な場合はテンプレート量を増やす。
- c) プライマー・ダイマーと一緒に増幅 プロトコールに掲載されているように（6、10 ページのステップ 8）、サイクリングプログラムに追加の検出ステップを挿入し、プライマー・ダイマーの検出を避ける。
- d) QuantiTect RT Mix の量が適正でない 正確な量の QuantiTect RT Mix を使用。
LightCycler 480 : 反応あたり 0.1 μ l の RT Mix
LightCycler 1.x および 2.0 : 反応あたり 0.2 μ l の RT Mix
SmartCycler および Applied Biosystems 7500 Fast System : 反応あたり 0.25 μ l の RT Mix
その他のサイクラー : 反応あたり 0.5 μ l の RT Mix

“No Template” コントロールで強い蛍光強度

- a) 試薬のコンタミ 反応に使用した試薬を捨てて、新しい試薬でもう一度 RT-PCR を繰り返す。
- b) 反応セットアップ中にコンタミネーション 適切な対応策を講じる（例；フィルターチップを使用）。
前の反応液からのキャリーオーバーを防ぐために、熱感受性 uracil-N-glycosylase を用いる。

コメント

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

RNA サンプル中に
ゲノムDNAが混在

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をデザインする。あるいは、ゲノムDNAの増幅を回避するようにデザインされたプライマーセット、QuantiTect Primer Assayを使用する（英語版 Handbook 28 ページの ordering information 参照）。

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。

蛍光強度がバラつく

- a) リアルタイム用サーマルサイクラーの汚染 使用説明書に従って、リアルタイム用サーマルサイクラーの汚染を除去する。
- b) リアルタイム用サーマルサイクラーの較正ができていない 使用説明書に従って、リアルタイム用サーマルサイクラーのキャリブレーションを再度行なう。

Applied Biosystems、Bio-Rad、Stratagene システムのサイクラーのみ：

- c) 高濃度のテンプレートで波状のカーブ ベースラインを計算するために使用したサイクル数を減らす。

LightCycler 1.x および 2.0 のみ：

- d) RT-PCR ミックスがキャピラリーチップに入っていない キャピラリーチップに RT-PCR ミックスを入れるために、キャピラリーを遠心する。
- e) キャピラリーが完全に押し込まれていない キャピラリーが完全に LightCycler カローセルに押し込まれていることを確認する。
- f) **LightCycler 1.x のみ：** Detection channel が間違っている Channel 1 を選んだことを確認する。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, QuantiTect® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applera Corporation or its subsidiaries); Bio-Rad®, iCycler iQ® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Eppendorf® [Eppendorf AG]; Roche®, LightCycler® (Roche Group); Cepheid®, SmartCycler® (Cepheid); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); Stratagene® [Stratagene].

The purchase price of this product (QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit) includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patents Nos. 5,994,056 and 6,171,785 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 the product for dsDNA-binding dye processes covered by said patents solely for the purchaser's own internal research. This product is also a Licensed dsDNA Dye Binding Kit for use with service sublicenses available from Applied Biosystems. 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 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.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

The purchase price of this product (QuantiTect SYBR Green 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.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

This product (QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit) or its use is covered by at least one claim of U.S. Pat. Nos. 5,035,996; 5,945,313; 6,287,823; or 6,518,026, owned by Invitrogen Corporation. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product, (b) its components, or (c) materials made by the employment of this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made by the employment of this product or its components for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity for which a party receives or is due to receive consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. The buyer cannot use this product or its components or materials made using this product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes. Further information on purchasing licenses under the above patents may be obtained by contacting the Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008. Email: outlicensing@invitrogen.com.

NOTICE TO PURCHASER: DISCLAIMER OF LICENSE

This product (QuantiTect Primer Assays) is compatible for use in real-time PCR methodologies, including 5' nuclease processes and dsDNA-binding dye processes claimed in patents owned by Roche Molecular Systems, Inc., F. Hoffmann-La Roche Ltd, and Applera Corporation. No right to perform any of these patented processes is conveyed, expressly, by implication or by estoppel to the purchaser by the purchase of this product. A license to use these patented processes for the purchaser's own internal research accompanies the purchase of certain reagents of Applied Biosystems and other licensed suppliers, or is available from Applied Biosystems. 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.

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。

© 2001–2008 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

