

QuantiTect[®] Reverse Transcription 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 cDNA 合成

2ステップ・リアルタイム RT-PCR 用

目次

ページ

プロトコール

リアルタイム定量 PCR 用ゲノム DNA 除去と逆転写反応

2

トラブルシューティング

5



プロトコール：リアルタイム定量PCR用ゲノムDNA除去と逆転写反応

実験を始める前の重要事項

- これは10 pgから1 µgまでのRNAを用いた場合のプロトコールです。1 µg以上のRNAを使用する際は、各溶液をRNA量に比例してスケールアップしてください。
- RNAの分解を最小限に抑えるために反応のセットアップはすべて氷上で行なってください。
- **RNase阻害剤とdNTPは既にキットに含まれています。** RNase阻害剤とdNTPをさらに添加しないでください。
- RT Primer Mix (添付) あるいは遺伝子特異的なプライマー (別途準備) を使用します。RT Primer Mixは、RNA転写物のすべての領域で高収量のcDNAを合成するために至適化されています。遺伝子特異的なプライマーを使用する際は、最終濃度を0.7 µMにするか、0.5 µMから1 µMの間で試すことを推奨します。
- **RT Primer Mixを常に逆転写反応に使用する場合、RT Primer Mix、5x Quantiscript™ RT Bufferを1：4の割合で前もって混和しておくくと便利です。** この混和物は-20℃で安定です。
- 逆転写反応を始める前に変性ステップとアニーリングステップを別々に行なう必要はありません。
- 逆転写反応の反応容量が200 µlを超える場合は、反応チューブが効率的に加熱されていることを注意してください (例；ヒートブロックを使用する際は、各ウェルに水を慎重に充填し、ブロックからチューブへの熱伝導を効率的にする)。
- 逆転写反応後、95℃、3分間のインキュベーションで反応を不活性化します。
- はじめてRNAを取り扱う際には英語版 Handbook 18 ページ、Appendix Aをお読みください。
- 逆転写反応後、リアルタイムPCRを行なう際の詳細に関しては英語版 Handbook 23 ページ、Appendix Cをお読みください。適切なコントロールに関する詳細は英語版 Handbook 24 ページ、Appendix Dをお読みください。
- **FastLane® Cell cDNA Kitをご使用の方：** FastLane Cell cDNA Kitを用いて調製したサンプルの逆転写反応を行なうために QuantiTect Reverse Transcription Kitを別途購入された場合には、FastLane Cell cDNAの Handbookに記載のプロトコール (日本語版あり) に従ってください。本プロトコールは用いないでください。

実験開始前の準備事項

- gDNA Wipeout Bufferで沈殿物をボルテックスにより溶解します。必要なら、バッファを37℃で簡単にインキュベートして沈殿物を溶かします。

操作手順

1. **RNAテンプレート**を氷上で解凍する。**gDNA Wipeout Buffer**、**Quantiscript Reverse Transcriptase**、**Quantiscript RT Buffer**、**RT Primer Mix**、**RNase フリー水**を室温（15～25℃）で解凍する。

チューブを指で弾いて各溶液を混和します。チューブの壁に残った液体を回収するためにスピンドウンします。

2. 表1に従って、氷上でゲノムDNA除去反応液を調製する。

混和後氷上で保冷します。

注：2回以上の反応液をセットアップする場合は、反応のトータル数に必要な量の10%増しでマスターミックスを調製します。その後個々のチューブに適切な量のマスターミックスとRNAサンプルを添加します。氷上でチューブを保冷します。

注：これは10 pgから1 µgまでのRNAを用いた逆転写反应用プロトコルです。1 µg以上のRNAを使用する際は、各溶液をRNA量に比例してスケールアップしてください。例えば2 µg RNAを使用する際は、全ての反応成分を2倍にして最終容量を28 µlにします。

表1. ゲノムDNA除去反応液成分

成分	容量/反応	最終濃度
gDNA Wipeout Buffer、7x	2 µl	1x
RNAテンプレート	適量（最高1 µg*）	
RNase フリー水	適量	
トータル容量	14 µl	-

* ここで指定のRNA量は反応液中の全RNA（rRNA、mRNA、ウイルスRNAおよびキャリアRNAを含む）を意味し、使用したプライマー量や合成されたcDNA量は関与しません。

3. **42℃で2分間インキュベートする。すぐに氷上に置く。**

注：インキュベーション時間は10分を超えないでください。

4. 表2に従い、氷上で逆転写反応マスターミックスを調製する。

混和後氷上で保冷します。逆転写反応マスターミックスには一本鎖cDNA合成に必要なすべての成分がRNAテンプレートを除いて含まれています。

注：2回以上の反応液をセットアップする場合は、反応のトータル数に必要な量の10%増しでマスターミックスを調製します。

注：これは10 pgから1 µgまでのRNAを用いた場合のプロトコルです。1 µg以上のRNAを使用する際は、各溶液をRNA量に比例してスケールアップしてください。例えば2 µg RNAを使用する際は、全ての反応成分を2倍にして最終容量を40 µlにします。

表 2. 逆転写反応液成分

成分	容量／反応	最終濃度
逆転写反応マスターミックス		
Quantiscript Reverse Transcriptase*	1 μ l	
Quantiscript RT Buffer、5x ^{††}	4 μ l	1x
RT Primer Mix [†]	1 μ l	
RNA テンプレート		
ゲノムDNA 除去反応液全量 (ステップ 3)	14 μ l (ステップ 5 で添加)	
トータル容量	20 μl	-

* RNase 阻害剤も含む。

[†] Mg²⁺ および dNTP を含む。

^{††} RT Primer Mix を常に逆転写反応に使用する場合は、RT Primer Mix、5x Quantiscript RT Buffer を 1 : 4 の割合で前もって混和しておくとう便利である。この溶液は -20℃ で安定。反応液 20 μ l あたりこの溶液を 5 μ l 使用する。

5. 逆転写反応マスターミックスを含んだ各チューブにステップ 3 からの RNA テンプレート (14 μ l) を添加する。

混和後氷上で保冷します。

6. 42℃で15分間インキュベートする。

RT-PCR 産物の長さが 200 bp 以上あるいは非常に高度の二次構造を持つ RNA を解析する場合、インキュベーション時間を 30 分まで延長すると cDNA 収量が増加することがあります。

7. Quantiscript Reverse Transcriptase を不活性化するために 95℃、3分間インキュベートする。

8. 逆転写反応が終了した各反応液の一部をリアルタイム PCR ミックスに添加する (英語版 Handbook 23 ページ、Appendix C を参照)。

逆転写反応液を氷上で保冷して直接リアルタイム PCR に進むか、長期保存の場合には逆転写反応液を -20℃ で保存します。リアルタイム PCR には Rotor-Gene™ Kit、QuantiFast™ Kit、あるいは QuantiTect Kit をお勧めします (英語版 Handbook 10 ページ参照)。

トラブルシューティングガイド

コメント

リアルタイムPCRで産物がない、あるいは遅れて検出される（逆転写反応中に問題が生じている場合）

- | | |
|--|--|
| a) 逆転写反応のセットアップの際に、ピペティングエラーまたは試薬の入れ忘れ | 実験のセットアップに使用したピペットをチェックする。解凍後、すべての試薬をよく混和し、逆転写反応をもう一度行なう。 |
| b) 逆転写反応のセットアップが不適切 | 反応液を必ず氷上で調製する。 |
| c) リアルタイムPCRに添加した逆転写反応液量が多すぎる | PCRミックスに添加する逆転写反応液量が多すぎると、増幅効率と反応の直線性が低下することがある。一般に、逆転写反応液量はPCR最終反応量の10%を超えないようにする。 |
| d) 逆転写反応の温度 | 逆転写反応は42℃で行なう。ヒートブロックまたは水浴の温度をチェックする。非常に高度な二次構造を持つRNAを解析する際に、温度を最高50℃まで上昇させると好結果が得られることがある。しかし42℃以上の温度ではQuantiscript Reverse Transcriptaseの活性が減少するのでcDNA収量に影響する。 |
| e) インキュベーション時間が短い | 標準の逆転写反応ではインキュベーション時間は15分必要。非常に高度な二次構造を持つRNAを解析する場合、またはRT-PCR産物の長さが200 bp以上の場合、インキュベーション時間を30分に延長すると好結果が得られることがある。 |

コメント

- f) 逆転写反応に用いた RNA テンプレートの品質が悪い、あるいは量が間違っている
プロトコールを始める前に RNA テンプレートの濃度、純度、分解度をチェックする（英語版 Handbook 20 ページ、Appendix B）。RNA テンプレートを解凍後、よく混和する。特に少量の RNA を用いた際に、微量の RNase が cDNA 合成や RT-PCR の感度に影響することがある。
- g) RNA 濃度が高すぎる、あるいは低すぎる
Quantiscript Reverse Transcriptase は 10 pg から 1 µg の RNA で使用するようデザインされている。1 µg を超える RNA を使用する際は、反応溶液の量をスケールアップする。
- h) RNA を変性
RNA テンプレートの変性は不要。RNA の変性を行なった場合には、RNA が分解することがある。
- i) 逆転写反应用プライマーの濃度が不正確あるいは分解している
逆転写反应用の遺伝子特異的プライマーを使用した際は、プライマーの濃度と分解度をチェックする。必要なら異なる濃度のプライマーで逆転写反応を行なうか、あるいは添付の RT Primer Mix を用いる。RT Primer Mix を用いる際は、反応液 20 µl あたり RT Primer Mix を 1 µl 用いる。
- j) インキュベーション温度が高すぎる
逆転写反応は 42 °C で行なう。これより高い温度では cDNA 産物の長さが短くなったり、Quantiscript Reverse Transcriptase の活性が低下する。ヒートブロックあるいは水浴の温度をチェックする。

FastLane Cell cDNA Kit を利用されている場合

- k) プロトコールが間違っている
FastLane Cell cDNA Kit を用いて調製したサンプルの逆転写反応を行なうために、QuantiTect Reverse Transcription Kit を別途購入された場合には、FastLane Cell cDNA の Handbook に記載のプロトコール（日本語版あり）に従う。

コメント

リアルタイムPCRで産物がない、あるいは遅れて検出される、またはプライマー・ダイマーのみを検出（リアルタイムPCR中に問題が生じている場合）

- | | |
|--|--|
| a) PCR アニール時間
が短すぎる | 使用しているリアルタイムPCRキットのプロトコールに明記されているアニール時間を用いる。 |
| b) PCR エクステンション
時間が短すぎる | 使用しているリアルタイムPCRキットのプロトコールに明記されているエクステンション時間を用いる。 |
| c) PCRのMg ²⁺ 濃度が最適
でない | 使用しているリアルタイムPCRキットのプロトコールで推奨されているMg ²⁺ 濃度で実験をスタートする。0.5 mM単位でMg ²⁺ 濃度を変えてみる。 |
| d) PCRのセットアップの際にピペッティング
エラーあるいは試薬の
入れ忘れ | プライマーやcDNAを含む試薬の濃度や保存条件をチェックする。 |
| e) <i>Taq</i> DNA Polymerase
がホットスタートで
活性化されていない | <i>Taq</i> DNA polymeraseのホットスタート活性化ステップをサイクリングプログラムが含んでいることを確認する。詳細はポリメラーゼに添付されている使用説明書をチェックする。 |
| f) PCR産物が長過ぎる | 最適な結果を得るためには、PCR産物の長さは100～150 bpで300 bpを超えないようにする。 |
| g) リアルタイムPCR用
プライマーのデザイン
が最適でない | ゲル電気泳動あるいは融解曲線解析によりPCR産物が存在することを確認する。特異的なPCR産物が検出されない場合はプライマーデザインを再考する。 |
| h) リアルタイムPCRの
プライマー濃度が最適
でない | 使用しているリアルタイムPCRキットのプロトコールで推奨されているプライマー濃度を用いる。 |
| i) サイクル数が不十分 | サイクル数を増やす。 |
| j) PCRアニール温度
が高すぎる | アニール温度を3℃ずつ下げる。 |
| k) PCRアニール温度
が低すぎる | アニール温度を2℃ずつ上げる。 |
| l) 蛍光取り込みが
設定されていない | サイクリングプログラムで蛍光検出が設定されていることをチェックする。 |

コメント

- | | |
|--|--|
| m) 間違った検出ステップ | 蛍光検出がPCRサイクリングプログラムの適切なステップで行なわれたか確認する。 |
| n) リアルタイムPCR用プライマー/プローブが分解 | 変性ポリアクリルアミドゲルでプライマー/プローブが分解している可能性をチェックする。 |
| o) 間違った色素 layer/filter を設定 | 適切な layer/filter を設定したことを確認する。 |
| p) テンプレートのスタート量が不十分 | 可能ならcDNA テンプレート量を増やす。 |
| q) SYBR® Green I を用いたリアルタイムPCRでプライマー・ダイマーと一緒に増幅される | プライマー・ダイマーの検出を避けるために、サイクリングプログラムに追加の蛍光取り込みステップを挿入する。 |
| r) SYBR Green I を用いたリアルタイムPCRでオプションの蛍光取り込みステップの検出温度が高すぎる | 特異的産物の T_m よりも検出温度が少なくとも3℃低いことを確認する。新しいプライマー・テンプレートシステムを確立する場合は、まずオプションの4番目のステップを除いた3ステップサイクリングを常に行なう。 |

融解温度曲線解析でピークが複数ある/複数のPCR産物がある

- | | |
|--------------|--|
| 室温で反応をセットアップ | 非特異的なプライマーのアニーリングを避けるために、冷却した容器でリアルタイムPCRのセットアップを行なう、あるいはホットスタートが可能な Taq DNA polymerase を使用する。 |
|--------------|--|

“No RT” コントロールの反応で強い蛍光強度

- | | |
|-----------|--|
| ゲノムDNAが混在 | gDNA Wipeout BufferによるゲノムDNA除去ステップが正しく行なわれたことをチェックする。ヒートブロックあるいは水浴の温度および反応成分の濃度をチェックする。

RNA精製にはRNeasy® Plus Kitを推奨。これはゲノムDNAを除去するためのgDNA Eliminatorカラムあるいはプレートを採用している（英語版 Handbook 29 ページ、ordering information 参照）。 |
|-----------|--|

コメント

テンプレート量の対数値と C_T 値/crossing point 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 推奨された cDNA テンプレート量の最大量を超えないようにする。詳細は使用しているリアルタイム PCR キットのプロトコールを参照する。
- b) テンプレート量が
少なすぎる 可能なら、RNA テンプレート量を増やす。

“No Template” コントロールで強い蛍光強度

- a) 試薬の汚染 反応に使用した試薬を捨てて、新しい試薬でもう一度繰り返す。
- b) 反応セットアップ中に
汚染 適切な対応策を講じる（例；フィルターチップの使用）。

蛍光強度がばらつく

- a) リアルタイムサイク
ラーが汚染されている 使用説明書に従ってリアルタイムサイクラーの汚染を除去する。
- b) リアルタイムサイク
ラーの較正がずれている 使用説明書に従ってリアルタイムサイクラーのキャリブレーションを再度行なう。

Trademarks: QIAGEN®, FastLane®, QuantiFast™, Quantiscript™, QuantiTect®, RNeasy® (QIAGEN Group); Rotor-Gene™ (Corbett Research); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

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。

© 2005-2009 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

