

# QuantiFast SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR プロトコールとトラブルシューティング

SYBR Green I を用いた高速な  
1ステップ・リアルタイム定量 RT-PCR

目次	ページ
プロトコール	
リアルタイム 1ステップ RT-PCR	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1ステップRT-PCR

## 実験を始める前の重要事項

- QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit Kitは、95 の変性ステップと60 のアニーリング / エクステンション・ステップを組み合わせた two-step cycling プロトコールで使用するようデザインされています。本プロトコールは60 未満の  $T_m$  値を持つプライマーにも使用可能です。
- SYBR Green I を用いた効率的なリアルタイム RT-PCR Kit には、理想的には60 ~ 200 bp の長さのターゲットを用いてください。
- 逆転写反応の後 RT-PCR の PCR ステップはまず、95 で5分のインキュベーションを行なって、HotStarTaq® Plus 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いません。
- 96 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 25  $\mu$ l にすることを推奨します。キャピラリーサイクラーに関しては、最終容量を 20  $\mu$ l にすることを推奨します。384 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 10  $\mu$ l にすることを強く推奨します。
- 2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix に添加済みの  $Mg^{2+}$  濃度で常にスタートしてください。
- QuantiTect® Primer Assay を使用する場合は、反応液の最終濃度を 1x にします。表2のサイクリングプロトコールに従います。
- iCycler iQ®, iQ5, MyiQ を使用する際は、ウエ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 Well factors を使用します。詳細は英語版 Handbook 33 ページの Appendix F 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。

## 操作手順

1. 2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix、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。QuantiFast 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く。

注：2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix に添加済みの  $Mg^{2+}$  濃度で実験を始めることを強くお勧めします。

表1. 反応セットアップ

成分	容量 / 反応			最終濃度
	96ウェル ブロック	キャピラリー サイクラー	384ウェル ブロック	
2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix	12.5 µl	10 µl	5 µl	1x
プライマー A*	適量	適量	適量	1 µM
プライマー B*	適量	適量	適量	1 µM
QuantiFast RT Mix	0.25 µl	0.2 µl	0.1 µl	
RNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	適量	適量	≤100 ng / 反応
RNase フリー水	適量	適量	適量	
トータル量	25 µl	20 µl	10 µl	

\* QuantiTect Primer Assay を使用する場合は、最終濃度を 1x にします。

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。

PCR容器あるいはプレートを氷上に置いておきます。

4. RNA テンプレート (反応あたり 100 ng 以下) を反応ミックスの入ったそれぞれのPCR容器あるいはウェルに添加する。
5. 表2に記載したプログラムのアウトラインに従って、リアルタイムサイクラーのプログラミングを行なう。

データ収集は、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行ないます。

表2. リアルタイム・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	10分	50		
PCR最初の活性化	5分	95	最高/ 高速モード	HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこのヒーティングステップで活性化される。
<b>2ステップのサイクリング</b>				
変性：	10秒	95	最高/ 高速モード	
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	30秒	60 *	最高/ 高速モード	蛍光データ回収を行なう。
サイクル数：	35 ~ 40			サイクル数はテンプレートRNA量に依存

\* この温度は QuantiTect Primer Assay および  $T_m$  値が 60 未満の全てのプライマーセットにも使用できます。

6. PCR 容器あるいはプレートを実験用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。
7. オプション：RT-PCR産物の特異性と同定を確認するために、融解曲線解析を行なう。  
融解曲線解析はリアルタイム・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。メーカーが提供するインストラクションに従ってください。
8. オプション：RT-PCR産物の特異性をアガロースゲル電気泳動によってチェックする。

各サイクラーのソフトの操作について、ステップごとのガイドを弊社ウェブサイト [www.qiagen.com/FastPCR](http://www.qiagen.com/FastPCR) にアップしていく予定です。

# 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) PCR アニールリング / エクステンション時間が短すぎる  
推奨されているアニールリング / エクステンション時間 (30 秒) で行なう。
- b) Mg<sup>2+</sup> 濃度を変更した  
2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix に添加済みの Mg<sup>2+</sup> 濃度を変更しない。
- c) 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 °C、5 分) が含まれていることを確認する。
- d) RT ステップを行っていない  
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 RT ステップ (50 °C、10 分) が含まれていることを確認する。
- e) ピペティング・エラー、あるいは試薬の入れ忘れ  
プライマーや核酸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。プライマー濃度を評価する際の詳細は英語版 Handbook 20 ページ、Appendix B を参照する。PCR をもう一度行なう。
- f) 検出ステップが間違っている、あるいはない  
アニールリング / エクステンションを組み合わせたステップ中に蛍光検出が行なわれていることを確認する。
- g) プライマー濃度が最適でない  
プロトコールに記載されているように、各プライマー濃度 1 μM を使用する。10x QuantiTect Primer Assay を使用する場合は、反応液の最終濃度を 1x にする。  
プライマー濃度は分光光度計でチェックする (英語版 Handbook 20 ページの Appendix B を参照)。
- h) 反応量が多すぎた  
96 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 25 μl にすることを推奨する。キャピラリーサイクラーに関しては、最終容量を 20 μl にすることを推奨する。384 ウェルブロックサイクラーに関しては、最終容量を 10 μl にすることを強く推奨。

## コメント

- 
- |    |                  |  |
|----|------------------|--|
| i) | スタート・テンプレートに問題   | 濃度、保存条件、スタート・テンプレートの品質をチェックする（英語版 Handbook 18 ページ、Appendix A 参照）。<br><br>必要な場合には、テンプレート核酸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。   |
| j) | 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。   |
| k) | サイクル数が少ない        | サイクル数を 5 サイクルずつ増加する。   |
| l) | RT-PCR 産物が長すぎる   | 最適な結果には、RT-PCR 産物は 60 ~ 200 bp の長さにする。RT-PCR 産物の長さは 300 bp 以上にならないようにする。   |
| m) | プライマー・デザインが適切でない | 融解曲線（英語版 Handbook 27 ページ、Appendix E 参照）あるいはゲル電気泳動解析により RT-PCR 産物を確認する。特異的 RT-PCR 産物が検出されない場合は、primer design guideline を再考する（英語版 Handbook 20 ページ、Appendix B 参照）。あるいは、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 35 ページ、ordering information 参照）。 |
| n) | 検出の設定が有効でない      | 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。   |
| o) | 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。  |

### Applied Biosystems®、Bio-Rad®、Corbett Research、Stratagene® システムのみ：

- |    |                        |  |
|----|------------------------|--|
| p) | 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、あるいは 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® システムのみ：

- |    |                              |  |
|----|------------------------------|--|
| q) | 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。 |
|----|------------------------------|--|

## 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) Mg<sup>2+</sup>濃度を変更した 2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix に添加済みのMg<sup>2+</sup>濃度を変更しない。
- b) プライマー・デザインが適切でない 融解曲線（英語版 Handbook 27 ページ、Appendix E 参照）あるいはゲル電気泳動解析により RT-PCR 産物を確認する。特異的 RT-PCR 産物が検出されない場合は、primer design guideline を再考する（英語版 Handbook 20 ページ、Appendix B 参照）。あるいは、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 35 ページ、ordering information 参照）。
- c) RT-PCR 産物が長すぎる 最適な結果には、RT-PCR 産物は 60 ~ 200 bp の長さにする。RT-PCR 産物の長さは 300 bp 以上にならないようにする。
- d) 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。
- e) ゲノム DNA が RNA サンプルにコンタミ 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 35 ページ、ordering information 参照）。  
あるいは混入しているゲノム DNA を分解するために RNA サンプルを DNase 処理する。

### Applied Biosystems、Bio-Rad、Stratagene システムのみ：

- f) 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（ご使用のリアルタイム・サイクラーが可能な場合）か、テンプレート量を減らす。

### LightCycler システムのみ：

- g) 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。
- h) 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 カロセルに押し込まれていることを確認する。
- i) 検出チャンネルを間違えている 正しいチャンネルを選択したことを確認する。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, QuantiTect®, (QIAGEN Group);  
Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.);  
LightCycler® (Roche Group); iCycler iQ® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); Stratagene® (Stratagene).  
© 2007 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

