

PyroMark PCR プロトコールとトラブルシューティング

パイロシークエンス (Pyrosequencing®) 解析に最適な
DNA テンプレートの PCR 増幅用

目次	ページ
プロトコール	
PyroMark PCR Master Mix を用いた PCR	2
PyroMark PCR Master Mix および Q-Solution を用いた PCR	6
トラブルシューティング	11



プロトコール：PyroMark PCR Master Mixを用いたPCR

実験を始める前の重要事項

- 次のパイロシーケンス操作で使用する一本鎖PCR産物を調製するために、プライマーペアの片方の5'末端がビオチン標識されていなければなりません。ビオチン標識プライマーの精製にはHPLCあるいはこれに相当する操作を推奨します。
- プライマーのデザインはPyroMark Assay Design Software 2.0をご利用ください。
- パイロシーケンス法に最適なPCRアンプリコンの長さは80～200 bpですが、最長500 bpの産物でもゲノムDNAのパイロシーケンス・アッセイで良好な結果が得られることがあります。
- HotStarTaq® DNA Polymeraseは**95℃で15分間**の活性化ステップが必要です（本プロトコールのステップ6参照）。
- PyroMark PCR Master Mixでは、最終反応ミックスのMgCl₂の最終濃度は1.5 mMです。この濃度で殆どの場合で満足できる結果が得られます。しかし、より高濃度のMg²⁺が必要な場合はキットに添付の25 mM MgCl₂をご使用ください。
- DNAの調製やPCR産物の解析を行なう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するため疎水性フィルター付きの使い捨てチップを使用してください。

操作手順

1. **PyroMark PCR Master Mix、CoralLoad® Concentrate、プライマー溶液、25 mM MgCl₂（必要な場合）**を室温（15～25℃）あるいは氷上で解凍する。
塩濃度が偏らないように、使用前に溶液を混和します。
2. 表1に従って反応セットアップを行なう。
HotStarTaq DNA Polymeraseは室温で不活性なので、反応容器を氷上で保存する必要はありません。
注：PyroMark Reaction BufferのMg²⁺濃度で、殆どの場合良好な結果が得られます。しかし、表2に従ってMg²⁺最終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。

表 1. PyroMark PCR Master Mix を用いた反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
反応ミックス		
PyroMark PCR Master Mix、 2x	12.5 µl	HotStarTaq DNA Polymerase、 1x PyroMark PCR Buffer*、 dNTPs 含有
CoralLoad Concentrate、10x	2.5 µl	1x
25 mM MgCl ₂ (オプション)	適量、表 2 参照	表 2 参照
プライマー A	適量	0.2 µM [†]
プライマー B	適量	0.2 µM [†]
RNase フリー水	適量	-
DNA テンプレート		
DNA テンプレート、 ステップ 4 で添加	適量	ゲノム DNA ≤ 500 ng / 反応 [‡] あるいはバイサルファイト 変換 DNA 10 ~ 20 ng
トータル容量	25 µl	-

注：他の反応容量を使用する場合は、各成分量を適宜減らす。

* 1.5 mM MgCl₂ 含有。

[†] PCR 反応でのプライマー最終濃度は一般に 0.2 µM が最適である。

[‡] 1 ~ 10 ng のヒトゲノム DNA を推奨。他の DNA を使用する場合は、ゲノムサイズに応じて量を調節する (英語版 Handbook 26 ページ、Appendix A)。

表 2. Mg²⁺ 最終濃度

反応液中の Mg ²⁺ 最終濃度 (mM) :	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
反応当たり必要な 25 mM MgCl ₂ の 容量 (µl) :	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5

3. マスターミックスをピペットで慎重に吸排出して完全に混和し、PCR チューブに適量を分注する。

- 個々のPCRチューブにDNAテンプレート (≤ 500 ng/反応) を添加する。10 ng のヒトゲノムDNAあるいは10～20 ngのバイサルファイト変換DNAを使用することを推奨します。

注：ヒトゲノムDNAをテンプレートとして使用しない場合は、ゲノムサイズに応じて量を調節してください（英語版 Handbook 26 ページ、Appendix A）。

- 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。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100 μ lのミネラルオイルを重層する。
- 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を入力する。

注：最初に酵素の熱活性化のために95℃で15分間インキュベートしてからPCRを開始します。

表3. PyroMark PCR Master Mix を用いた際の至適化済みサイクリング・プロトコール

			コメント
初期活性化 ステップ	15分	95℃	HotStarTaq DNA Polymerase はこの加熱ステップにより活性化
3ステップのサイクリング			
変性	30秒	94℃	
アニーリング*	30秒	60℃ 56℃	ゲノムDNAの場合 バイサルファイト変換DNAの場合
エクステンション	30秒	72℃	
サイクル数：	45		
最終エクステンション：	10分	72℃	

* PyroMark Assay Design Software 2.0を用いた際に推奨するアニーリング温度。その他の場合はすべて、計算したプライマーの T_m より5℃低い温度で開始する。目的のPCR産物に特異性の高いアニーリング温度を使用する。

- 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. 続くパイロシークエンス解析には25 µlのPCRのうち5～20 µlを使用する。

注：PyroMark MD装置を用いた場合5～10 µl、PyroMark Q24装置を用いた場合は10～20 µl、PyroMark ID装置を用いた場合は20 µlのPCR産物でほとんどの場合に良好なパイロシークエンス結果が得られます。必要に応じて装置のユーザーマニュアルに記載の方法に従ってPCR産物量を調節します。

パイロシークエンス解析の前に、QIAxcel™による高速解析あるいはアガロースゲル解析でPCR産物をチェックすることをお奨めします。CoralLoad Concentrateを用いた際は、PCR産物を直接アガロースゲルにロードできます。PCRローディング・バッファーおよびマーカー色素をPCR産物に添加する必要はありません。

CoralLoad Concentrateはゲルローディング試薬とマーカー色素を含みます。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の種類との相関関係は表4を参照してください。

注：溶液の粘性が高いため、アガロースゲルのウェルにゆっくりと溶液をアプライしてください。

表4. 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)

プロトコール：PyroMark PCR Master Mix および Q-Solution™ を用いた PCR

本プロトコールは PCR アッセイで 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、スタンダードな条件では増幅されない PCR システムに有用です。Q-Solution を特定のプライマーとテンプレートの組み合わせに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。

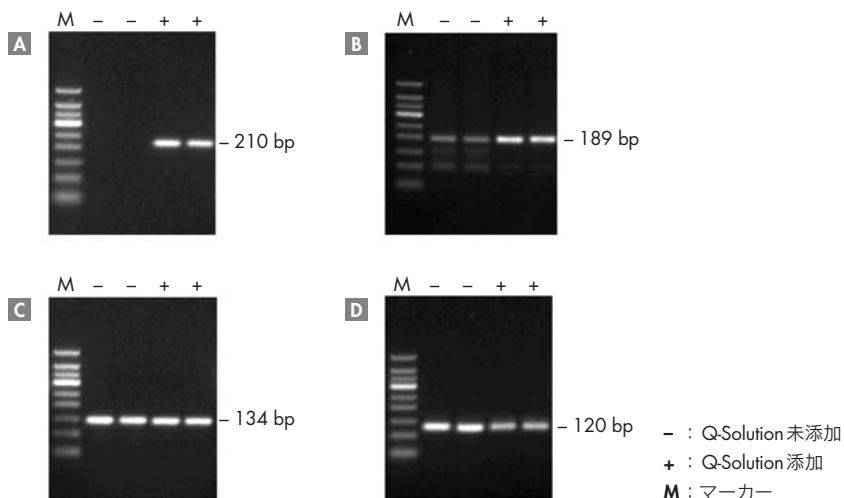
Q-Solution を使用した際、個々の PCR アッセイに依存して、次のような影響が観察されることがあります。

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る。

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 の特異性が増大する。

ケース C： Q-Solution が PCR 結果に影響しない。

ケース D： Q-Solution によってこれまで成功していた増幅反応が失敗したり、増幅効率が低下する。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ります。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。
- 次のパイロシーケンス操作で使用する一本鎖PCR産物を調製するために、プライマーペアの片方の5'末端がビオチン標識されていなければなりません。ビオチン標識プライマーの精製にはHPLCあるいはこれに相当する操作を推奨します。
- プライマーのデザインはPyroMark Assay Design Software 2.0をご利用ください。
- パイロシーケンス法に最適なPCRアンプリコンの長さは80～200 bpですが、最高500 bpの産物でもゲノムDNAのパイロシーケンス・アッセイで良好な結果が得られることがあります。
- HotStarTaq DNA Polymeraseは**95℃で15分間**の活性化ステップが必要です(本プロトコールのステップ6参照)。
- DNAの調製やPCR産物の解析を行なう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するため疎水性フィルター付きの使い捨てチップを使用してください。

操作手順

1. **PyroMark PCR Master Mix、CoralLoad Concentrate、プライマー溶液、Q-Solutionを室温(15～25℃)あるいは氷上で解凍する。**

塩濃度が偏らないように、使用前に溶液を混和します。Q-Solutionを使用する際は、通常MgCl₂を添加する必要はありません。

2. **表5に従って反応セットアップを行なう。**

HotStarTaq DNA Polymeraseは室温で不活性なので、反応容器を氷上で保存する必要はありません。

表 5. PyroMark PCR Master Mix を用いた反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
反応ミックス		
PyroMark PCR Master Mix、 2x	12.5 μ l	HotStarTaq DNA Polymerase、 1x PyroMark PCR Buffer*、 dNTPs 含有
Coraload Concentrate、10x	2.5 μ l	1x
Q-Solution、5x	5 μ l	1x
プライマー A	適量	0.2 μ M [†]
プライマー B	適量	0.2 μ M [†]
RNase フリー水	適量	-
DNA テンプレート		
DNA テンプレート、 ステップ 4 で添加	適量	ゲノム DNA \leq 500 ng / 反応 [‡] あるいはバイサルファイト 変換 DNA 10 ~ 20 ng
トータル容量	25 μl	-

注：他の反応容量を使用する場合は、各成分量を適宜減らす。

* 1.5 mM MgCl₂ 含有。

[†] PCR 反応でのプライマー最終濃度は一般に 0.2 μ M が最適である。

[‡] 1 ~ 10 ng のヒトゲノム DNA を推奨。他の DNA を使用する場合は、ゲノムサイズに応じて量を調節する（英語版 Handbook 26 ページ、Appendix A）。

3. マスターミックスをピペットで慎重に吸排出して完全に混和し、PCR チューブに適量を分注する。
4. 個々の PCR チューブに DNA テンプレート (\leq 500 ng / 反応) を添加する。10 ng のヒトゲノム DNA あるいは 10 ~ 20 ng のバイサルファイト変換 DNA を使用することを推奨します。

注：ヒトゲノム DNA をテンプレートとして使用しない場合は、ゲノムサイズに応じて量を調節する（英語版 Handbook 26 ページ、Appendix A）。

5. 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。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 100 μ l のミネラルオイルを重層する。

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。

注：最初に酵素の熱活性化のために95℃で15分間インキュベートしてからPCRを開始します。

表6. PyroMark PCR Master MixとQ-Solutionを用いた際の至適化済みサイクリング・プロトコール

			コメント
初期活性化 ステップ	15分	95℃	HotStarTaq DNA Polymeraseは この加熱ステップにより活性化
3ステップのサイクリング			
変性	30秒	94℃	
アニーリング*	30秒	60℃ 56℃	ゲノムDNAの場合 バイサルファイト変換DNAの場合
エクステンション	30秒	72℃	
サイクル数：	45		
最終エクステンション：	10分	72℃	

* PyroMark Assay Design Software 2.0を用いる際に推奨するアニーリング温度。その他の場合はすべて、計算したプライマーの T_m より5℃低い温度で開始する。目的のPCR産物に特異性の高いアニーリング温度を使用する。

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. 続くパイロシーケンス解析にPCR 25 µlのうち5～20 µlを使用する。

注：PyroMark MD装置を用いた場合5～10 µl、PyroMark Q24装置を用いた場合は10～20 µl、PyroMark ID装置を用いた場合は20 µlのPCR産物でほとんどの場合に良好なパイロシーケンス結果が得られます。必要に応じて装置のマニュアルに記載の方法に従ってPCR産物量を調節します。

パイロシーケンス解析の前に、QIAxcelによる高速解析あるいはアガロースゲル解析でPCR産物をチェックすることをお奨めします。Coraload Concentrateを用いた際は、PCR産物を直接アガロースゲルにロードできます。PCRローディング・バッファーおよびマーカー色素をPCR産物に添加する必要はありません。

Coraload 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7を参照してください。

注：溶液の粘性が高いので、アガロースゲルのウェルにゆっくりと溶液をアプラインしてください。

表7. 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

コメント

PCR 関連のエラー

PCR 産物が少ないあるいは皆無である

- | | | |
|----|--------------------------------------|---|
| a) | HotStarTaq DNA Polymerase が活性化されていない | 95°C で 15 分間の初期活性化を行ない PCR を開始したかチェックする。 |
| b) | ピペッティング・エラー、あるいは試薬の入れ忘れ | PCR を再度行なう。プライマーなどの試薬の濃度および保存条件をチェックする。反応液 25 μ l あたり 12.5 μ l の PyroMark Master Mix を使用する。 |
| c) | GC 含量が高い | 同じサイクリング条件で Q-Solution を用いて PCR を再度行なう。 |
| d) | プライマー濃度が適切でないかプライマーが分解 | 各プライマー濃度を 0.1 ~ 0.5 μ M (0.1 μ M ずつ) で PCR を再度行なう。しかし、過剰のピオチン標識プライマーはパイロシーケンス・アッセイでバックグラウンドを生じることがある。 |
| 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、品質をチェックする (英語版 Handbook 25 ページ、Appendix A 参照)。必要に応じて、ストック溶液から核酸テンプレート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) | バイサルファイト変換反応に問題 | バイサルファイト変換 DNA の濃度、保存条件、品質についてチェックする。最適な結果を得るには効果的なバイサルファイト変換と PCR 阻害物質の除去が必須である。適切なバイサルファイト変換法を用いてサンプルから核酸のバイサルファイト処理を行なう。変換には EpiTect [®] Bisulfite Kit を推奨。 |
| g) | プライマーデザインが適切ではない | プライマーデザインには、PyroMark Assay Design Software 2.0 を使用することを強く推奨する。 |
| h) | 変性温度あるいは時間が正確でない | 変性は 94°C 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 95°C で 15 分間のインキュベーションを行なう。 |

コメント

- i) アニーリング温度あるいは時間が正確でない
可能ならば 50 ~ 65 °C の温度勾配でアニーリングを行ない、アガロースゲルで PCR 産物をチェックする。特異性と収量が最高になるアニーリング温度を選ぶ。Gradient PCR が不可能な場合、アニーリング温度を 2 °C ずつ下げる。アニーリング時間は 30 ~ 60 秒の間にする。
- j) Mg²⁺濃度が適切でない
添付の 25 mM MgCl₂ 溶液を用いて 0.5 mM 間隔で 1.5 ~ 5.0 mM の Mg²⁺ 最終濃度で PCR を行なう。
- k) マスターミックスが多すぎる／少なすぎる
PyroMark PCR Master Mix は 2 倍濃度である。25 µl 反応液あたり 12.5 µl の PyroMark Master Mix を使用する。
- l) サーマルサイクラーの問題
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るかチェックする。
- m) 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。

増幅産物が多数検出

- a) 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。6 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すぎる
可能ならば 50 °C ~ 65 °C の温度勾配でアニーリングを行ない、アガロースゲルで PCR 産物をチェックする。特異性と収量が最高になるアニーリング温度を選ぶ。Gradient PCR が不可能な場合、アニーリング温度を 2 °C ずつ上げる。アニーリング時間は 30 ~ 60 秒にする。
- c) プライマーデザインが適切ではない
プライマーデザインには、PyroMark Assay Design Software 2.0 を使用することを強く推奨する。
- d) プライマー濃度が適切でないかプライマーが分解
各プライマー濃度 0.1 ~ 0.5 µM (0.1 µM ずつ) で PCR を再度行なう。しかし、ピオチン標識プライマーが過剰に存在するとパイロシークエンス・アッセイでバックグラウンドを生じることがある。

コメント

スメア状のPCR産物

- a) スタートテンプレート
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 25 ページ、Appendix A 参照）。ストック溶液から核酸テンプレート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。
- b) プライマーデザインが
適切ではない
- プライマーデザインには、PyroMark Assay Design Software 2.0 を使用することを強く推奨する。
- c) プライマー濃度が最適
でない、あるいはプライ
マーが分解している
- 各プライマー濃度 0.1 ~ 0.5 μM (0.1 μM ずつ) で PCR を再度行なう。しかし、ビオチン標識プライマーが過剰に存在するとパイロシークエンス・アッセイでバックグラウンドを生じることがある。
- d) Mg^{2+} 濃度が最適でない
- 添付の 25 mM MgCl_2 溶液を用いて 0.5 mM 間隔で 1.5 ~ 5.0 mM の Mg^{2+} 最終濃度で PCR を行なう。
- e) キャリーオーバーに
よるコンタミ
- ネガティブコントロールの PCR (DNA テンプレートなし) 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するため疎水性フィルター付きの使い捨てピペットチップを使用する。DNA の調製や PCR 産物の解析を行なう場所から離れたところで全ての反応液のセットアップを行なう。
- f) マスターミックスが
多すぎる／少なすぎる
- PyroMark PCR Master Mix は 2x 濃縮液である。25 μl 反応液あたり 12.5 μl の PyroMark Master Mix を使用する。
- g) サイクル数が多すぎる
- サイクル数を 3 サイクルずつ減らす。

コメント

パイロシーケンスに関連するエラー

パイログラム（パイロシーケンス）でピークが低い／ない

- | | | |
|----|--|--|
| a) | プライマーが十分でない、あるいはピオチン標識されていない | PCR プライマーの品質が高いことを確認する（HPLC 精製ピオチン標識プライマーを使用）。パイロシーケンス用の一本鎖テンプレートを調製する際に、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズに固定化するために、PCR プライマーペアの片方の 5' 末端がピオチン標識されていなければならない。 |
| b) | シーケンシング用プライマーがピオチン標識したテンプレート鎖にマッチしていない | シーケンシング用プライマーがピオチン標識したテンプレート鎖に結合することを確認する。 |
| c) | パイロシーケンス用テンプレートの品質が低い | 推奨した PCR 条件でほとんどの場合、高品質のパイロシーケンス用テンプレートが得られる。必要ならば PCR を至適化する（前項参照）。しかし、アガロースゲルで PCR 産物を確認することを薦める。パイロシーケンスに十分な量のシングルバンドのテンプレートを使用すること。 |
| d) | アッセイデザインが最適ではない | プライマーのデザインや方向性を確保するためには、PCR およびシーケンシング用プライマーのデザインに PyroMark Assay Design Software 2.0 の使用を強く推奨する。 |
| e) | サンプル調製およびパイロシーケンスのワークフローに関するエラー | 使用している PyroMark 装置のユーザーマニュアルを参照する。 |

パイロシーケンス結果が良好ではない、あるいは失敗

- a) PCRにおける非特異的な産物がバックグラウンド
- アガロースゲルのPCR産物をチェックして、特異的なPCR産物が1種類しかいないことを確認する。非特異的なシーケンス・シグナルは次のような様々な現象が原因になりえる；

- シークエンシング用プライマーおよび／あるいはビオチン標識プライマーがダイマーを形成
- ビオチン標識プライマーのヘアピン形成および／あるいはパイロシーケンス用テンプレートでループ形成
- シークエンシング用プライマーとビオチン標識PCRプライマー間でのアニーリング
- シークエンシング用プライマーがパイロシーケンス用テンプレートに非特異的にアニーリング

初めてアッセイを行なう場合は次のコントロールを必ず行なう：

- DNA未添加のPCR
- シークエンシングプライマーのみ
- シークエンシング用プライマー未添加のテンプレート

詳細はパイロシーケンス用装置に添付のユーザーマニュアルをご覧ください。

PCRおよびシークエンシング用プライマーのデザインにはPyroMark Assay Design Software 2.0を使用することを強く推奨します。

Trademarks: QIAGEN®, QIAxcel™, CoralLoad®, HotStarTaq®, EpiTect®, Q-Solution™ (QIAGEN Group); Pyrosequencing® (Pyrosequencing AB).

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。

© 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

