

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

SYBR Green I を用いた高速リアルタイム定量 PCR  
および 2 ステップ RT-PCR 用

目次	ページ
プロトコール	
リアルタイム PCR / 2 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PCR／2ステップRT-PCR

## 実験を始める前の重要事項

- QuantiFast SYBR Green PCR 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に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PCR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。
- HotStarTaq® Plus DNA Polymeraseを活性化するため、PCRで最初に必ず**95℃で5分間のインキュベーション**を行なってください。
- 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 µl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 µlにすることを強く推奨します。
- 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mixに添加済みの**Mg<sup>2+</sup>濃度**で常に始めてください。
- 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 36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 PCR Master Mix**、**テンプレートDNA**あるいは**cDNA**、**プライマー**、**RNaseフリー水**を解凍する。各溶液をミックスする。
2. 表1に従って**反応ミックス**を調製する。

ホットスタートPCRですから、反応のセットアップ中、あるいはリアルタイム・サイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上に保存する必要はありません。

注：2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mixに添加済みのMg<sup>2+</sup>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 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
テンプレートDNAまたは cDNA (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	
<b>トータル量</b>	<b>25 µl</b>	<b>20 µl</b>	<b>10 µl</b>	

\* 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。
4. **DNA**あるいは**cDNA**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。  
2ステップRT-PCRには、テンプレートとして加えるcDNA（未希釈のRT反応液から）の量が最終PCR容量の10%を超えないようにします。
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
PCR最初の活性化	5分	95℃	最高/ 高速モード	HotStarTaq <i>Plus</i> 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DNA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。

- 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。
- オプション：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。
- オプション：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

### PCR産物がない、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  
が短かすぎる 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)  $Mg^{2+}$ 濃度を変更した 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mixに添加済みの $Mg^{2+}$ 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℃、5分）が含まれていることを確認する。
- d) 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 21 ページ、Appendix Bを参照する。PCRをもう一度行なう。
- e) 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。
- f) 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  $\mu M$ 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 21 ページの Appendix Bを参照）。
- g) 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  $\mu l$ 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  $\mu l$ 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  $\mu l$ にすることを強く推奨。
- h) 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）。  
  
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。これを用いて PCRを再度行なう。

## コメント

- 
- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| i) 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。  |
| j) 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。  |
| k) PCR産物が長すぎる                         | 最適な結果には、PCR産物は60～200 bpの長さにする。PCR産物の長さは300 bp以上にならないようにする。  |
| l) プライマー・デザインが適切でない                   | 融解曲線（英語版Handbook 30ページ、Appendix E参照）あるいはゲル電気泳動解析によりPCR産物を確認する。特異的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 21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 38ページ、ordering information参照）。 |
| m) 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。  |
| n) 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。   |
| o) <b>RT-PCRのみ</b><br>添加したRT反応液量が多すぎる | PCRに添加したRT反応液の量が多すぎると、増幅効率と反応の直線性は低下する。通常添加するRT反応液量（未希釈）は、最終PCR量の10%を超えてはならない。  |

### 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。 |
|--------------------------------|--|

### プライマー・ダイマーおよび／あるいは非特異的PCR産物

- |                             |   |
|-----------------------------|---|
| a) Mg <sup>2+</sup> 濃度を変更した | 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mixに添加済みのMg <sup>2+</sup> 濃度を変更しない。 |
|-----------------------------|---|

## コメント

- b) プライマー・デザインが適切でない 融解曲線（英語版 Handbook 30 ページ、Appendix E 参照）あるいはゲル電気泳動解析により PCR 産物を確認する。特異的 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 21 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 38 ページ、ordering information 参照）。
- c) PCR 産物が長すぎる 最適な結果には、PCR 産物は 60 ~ 200 bp の長さにする。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 38 ページ、ordering information 参照）。
- ゲノム DNA の除去と cDNA 合成を一緒に行なえる QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて逆転写反応を行なう。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・サイクラーで可能な場合）か、テンプレート量を減らす。

### LightCycler システムのみ：

- g) 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 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).  
© 2009 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

