

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

HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase

HotStarTaq *Plus* Master Mix Kit

至適化不要で特異性の高いホットスタート PCR

目次	ページ
プロトコール	
HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase を用いた PCR	2
HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase と Q-Solution を用いた PCR プロトコール	6
HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase を用いたシングルセル PCR	11
HotStarTaq <i>Plus</i> Master Mix を用いた PCR	15
トラブルシューティング	18



# プロトコール： HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase を用いた PCR

## 実験を始める前の重要事項

- HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase は **95 °C で 5 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 を調製する場所あるいは PCR 産物を解析する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抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用してください。
- PCR 産物の精製 (例えば QIAquick® PCR Purification Kit あるいは MinElute® PCR Purification Kit を使用) を行なわずに、蛍光強度や吸光度の測定が必要なダウンストリーム・アプリケーションでは、CoralLoad® PCR Buffer の使用はお勧めしません。

## 実験を始める前の準備事項

- 必要に応じて各 dNTP が 10 mM 入った dNTP ミックスを調製し、少量ずつ -20 °C で保存します。QIAGEN では PCR グレードの高品質な dNTP ミックス (10 mM) をお届けしています (Cat. no. 201900)。

## 操作手順

1. **10x CoralLoad PCR Buffer** あるいは **10x PCR Buffer**、**dNTP ミックス**、**プライマー溶液**、**25 mM MgCl<sub>2</sub>** (必要な場合) を室温あるいは氷上で融解する。

塩濃度が均一になるように使用前に各溶液を完全に混和することが重要です。

2. 表 1 に従ってマスターミックスを調製する。

HotStarTaq *Plus* 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。

マスターミックスにはテンプレート DNA 以外の PCR に必要な成分が全て含まれています。PCR 反応の回数に必要なマスターミックス量よりも 10% 増して調製します。ネガティブコントロール (テンプレート DNA なし) は必ず同時に行ないます。

注：最適な Mg<sup>2+</sup> 濃度は、ほとんどの場合、1x PCR Buffer および 1x CoralLoad PCR Buffer に含まれている濃度で良好な結果が得られます。しかし、表 2 に従って Mg<sup>2+</sup> 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. HotStarTaq Plus DNA Polymerase を用いた反応成分

成分	容量／反応	最終濃度
<b>マスターミックス</b>		
10x CoralLoad PCR Buffer* あるいは 10x PCR Buffer*	10 $\mu$ l	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	適量、表 2 参照	表 2 参照
dNTP ミックス (各 10 mM)	2 $\mu$ l	200 $\mu$ M 各 dNTP
プライマー A	適量	0.1 ~ 0.5 $\mu$ M <sup>†</sup>
プライマー B	適量	0.1 ~ 0.5 $\mu$ M <sup>†</sup>
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	0.5 $\mu$ l	反応当たり 2.5 ユニット
RNase フリー水	適量	-
<b>テンプレート DNA</b>		
テンプレート DNA、 ステップ 4 で添加	適量	反応当たり 1 $\mu$ g 以下
<b>トータル容量</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>	<b>-</b>

注：反応容量を少なくする場合は、各成分を適宜減らします。

\* 15 mM MgCl<sub>2</sub> 含有。

<sup>†</sup> 英語版 Handbook 36 ページ、Table 16 を用いてモル換算を行ないます。

表 2. 最終 Mg<sup>2+</sup> 濃度

反応液中の 最終 Mg <sup>2+</sup> 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 <sub>2</sub> ( $\mu$ l) :	0	2	4	6	8	10	12	14

注：最適な Mg<sup>2+</sup> 濃度は実験ごとに決定すべきですが、ほとんどのケースでは、1x PCR Buffer および 1x CoralLoad PCR Buffer に入っている 1.5 mM で満足できる結果が得られます。

3. マスターミックスをよく混和し、適切な量をPCRチューブに分注する。  
 ピペットでマスターミックスを数回アップダウンするなどして、静かに混和します。PCRチューブを氷上に保存する必要はありません。HotStarTaq Plus DNA Polymeraseは不活性状態なので、室温では非特異的なDNA合成は起こりません。
4. マスターミックスの入った個々のチューブにテンプレートDNA（反応あたり1 µg以下）を添加する。  
 RT-PCRの場合には、逆転写反応溶液の一部を添加します。この溶液量は最終PCR溶液量の10%を超えないようにします（英語版 Handbook 40ページ、Appendix E参照）。
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。直ぐにステップ6に進む。それ以外はミネラルオイル約100 µlを溶液の上に重層する。
6. サーマルサイクラーをメーカーの指示に従ってプログラムする。  
 注：熱活性化のために95℃で5分間インキュベートした後に各PCRを始めます。5分以上は加熱しないでください。  
 一般的なサイクリングプログラムを下記に掲載します。収量および特異性を最大にするには、新しいテンプレートあるいはプライマー・ペア毎に温度、サイクル時間を至適化する必要があります。

表3. 最適なPCR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	5分	95℃	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>3ステップのサイクリング</b>			
変性：	0.5～1分	94℃	
アニーリング：	0.5～1分	50～68℃	プライマーの $T_m$ より約5℃低い温度（英語版 Handbook 36ページ、Appendix B参照）。
エクステンション：	1分	72℃	1 kb以上のPCR産物では1 kbのDNAあたり約1分間のエクステンション時間を使用
サイクル数：	25～35		英語版 Handbook 39ページ、Appendix C参照。
最終エクステンション：	10分	72℃	

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. **CoralLoad PCR Buffer**を用いた際は、PCR反応液を直接アガロースゲルにロードできる。ゲルローディング・バッファーおよびマーカー色素を前もって添加する必要がない。

CoralLoad PCR Buffer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4を参照にしてください。

注：溶液の粘度が高い場合には、アガロースゲルの壁に沿って溶液をアプライします。

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： HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase と Q-Solution™ を用いた PCR プロトコール

本プロトコールは PCR アッセイで Q-Solution を使用するために作製されました。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 を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。

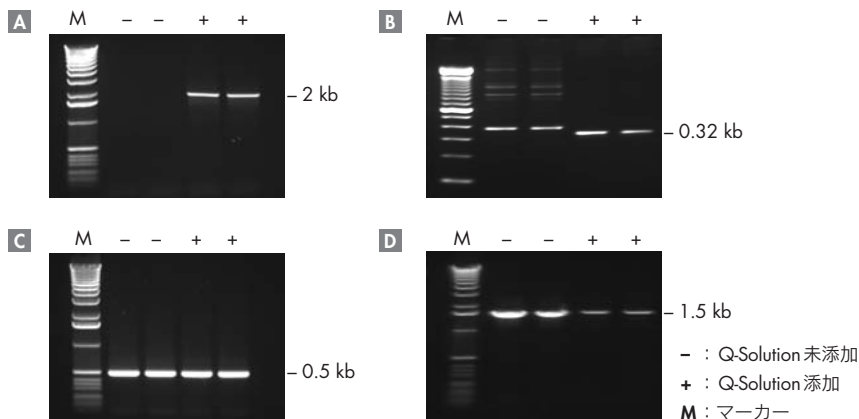
Q-Solution を使用する場合、それぞれの PCR アッセイにより以下のような影響が観察されます：

**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った。

**ケース B：** Q-Solution はある種のプライマー・テンプレートシステムで PCR の特異性を高めた。

**ケース C：** Q-Solution は PCR パフォーマンスに関与しなかった。

**ケース D：** Q-Solution によって成功した増幅反応が失敗したり、増幅効率が減少した。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る。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に初めて使用する際には、Q-Solution を常に使用と未使用の反応を同時に行なってください。



## 実験を始める前の重要事項

- HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase は **95 °C で 5 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)。
- 初めてのプライマー・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。
- DNA を調製する場所あるいは PCR 産物を解析する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抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用してください。
- PCR 産物の精製 (例えば QIAquick PCR Purification Kit あるいは MinElute PCR Purification Kit を使用) を行わずに、蛍光強度や吸光度の測定が必要なダウンストリーム・アプリケーションでは、CoralLoad PCR Buffer の使用はお勧めしません。

## 実験を始める前の準備事項

- 必要に応じて各 dNTP が 10 mM 入った dNTP ミックスを調製し、少量ずつ -20 °C で保存します。QIAGEN では PCR グレードの高品質な dNTP ミックス (10 mM) をお届けしています (Cat. no. 201900)。

## 操作手順

1. **10x CoralLoad PCR Buffer あるいは 10x PCR Buffer、dNTP ミックス、プライマー溶液、Q-Solution を室温あるいは氷上で融解する。**

塩濃度が均一になるように使用前に各溶液を完全に混和します。Q-Solution を使用する際は、通常 MgCl<sub>2</sub> を添加する必要はありません。

2. **8 ページ、表 5 に従って反応ミックスを調製する。**

HotStarTaq *Plus* 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。

マスターミックスにはテンプレート DNA 以外の PCR に必要な成分を全て含まれています。PCR 反応の回数に必要なマスターミックス量よりも 10% 増して調製します。ネガティブコントロール (テンプレート DNA なし) は必ず同時に行ないます。

表 5. HotStarTaq Plus DNA Polymerase と Q-Solution を用いた反応成分

成分	容量/反応	最終濃度
<b>マスターミックス</b>		
10x CoralLoad PCR Buffer* あるいは 10x PCR Buffer*	10 µl	1x
5x Q-Solution	20 µl	1x
dNTP ミックス (各 10 mM)	2 µl	200 µM 各 dNTP
プライマー A	適量	0.1 ~ 0.5 µM†
プライマー B	適量	0.1 ~ 0.5 µM†
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	0.5 µl	反応当たり 2.5 ユニット
RNase フリー水	適量	-
<b>テンプレート DNA</b>		
テンプレート DNA、 ステップ 4 で添加	適量	反応当たり 1 µg 以下
<b>トータル容量</b>	<b>100 µl</b>	<b>-</b>

注：反応容量を増減する場合は、各成分を適宜調節します。

\* 15 mM MgCl<sub>2</sub> 含有。

† 英語版 Handbook 36 ページ、Table 16 を用いてモル換算を行ないます。

### 3. マスターミックスをよく混和し、適切な量を PCR チューブに分注する。

ピペットでマスターミックスを数回アップダウンするなどして、静かに混和します。PCR チューブを氷上に保存する必要はありません。HotStarTaq Plus DNA Polymerase は不活性状態なので、室温では非特異的な DNA 合成は起こりません。

### 4. マスターミックスの入った個々のチューブにテンプレート DNA (反応当たり 1 µg 以下) を添加する。

RT-PCR の場合には、逆転写反応溶液の一部を添加します。この溶液量は最終 PCR 溶液量の 10% を超えないようにします (英語版 Handbook 40 ページ、Appendix E 参照)。



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。それ以外はミネラルオイル約 100  $\mu$ l を溶液の上に重層する。
6. サーマルサイクラーをメーカーの指示に従ってプログラムする。

注：熱活性化のために 95 °C で 5 分間インキュベートした後に各 PCR を始めます。5 分を超えないようにします。

一般的な PCR サイクリングプログラムを表 6 に掲載します。収量および特異性を最大にするには、新しいテンプレートあるいはプライマー・ペア毎に温度、サイクル時間を至適化する必要があります。

表 6. 最適な PCR 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：	5分	95 °C	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>3ステップのサイクリング</b>			
変性：	0.5～1分	94 °C	
アニーリング：	0.5～1分	50～68 °C	プライマーの $T_m$ より約 5 °C 低い 温度（英語版 Handbook 36 ページ、 Appendix B 参照）。
エクステンション：	1分	72 °C	1 kb 以上の PCR 産物では 1 kb の DNA 当たり約 1 分間のエクス テンション時間を使用
サイクル数：	25～35		英語版 Handbook 39 ページ、 Appendix C 参照。
最終エク ステンション：	10分	72 °C	

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 °C で一晩、-20 °C で長期間保存できます。

8. **CoralLoad PCR Buffer**を用いた際は、**PCR反応液**を直接アガロースゲルにロードできます。ゲルローディング・バッファーおよびマーカー色素を前もって添加する必要がありません。

CoralLoad PCR Buffer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を参照にしてください。

注：溶液の粘度が高い場合には、アガロースゲルの壁に沿って溶液をアプライします。

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)

# プロトコール：HotStarTaq Plus DNA Polymerase を用いたシングルセルPCR

本プロトコールは、単一細胞からのシングルコピーのDNA配列を増幅するためにデザインされています。

## 実験を始める前の重要事項

- HotStarTaq Plus DNA Polymeraseは95℃で5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5参照）。
- キャリア核酸が通常必要です（例； *E. coli* 5S rRNA）。
- ポリアクリルアミド・ゲルあるいはHPLCで精製したプライマーのみを使用します。
- DNAを調製する場所あるいはPCR産物を解析する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抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用してください。
- PCR産物の精製（例えばQIAquick PCR Purification KitあるいはMinElute PCR Purification Kitを使用）を行わずに、蛍光強度や吸光度の測定が必要なダウンストリーム・アプリケーションでは、CoralLoad PCR Bufferの使用はお薦めしません。

## 細胞を取り扱う際の注意事項

- 単一細胞は様々な方法（フローサイトメトリーあるいはマイクロマニピュレーションなど）により分離されます。
- DNA分解を避けるために、細胞分離操作中はサンプルを冷却保存します。
- 20 µlの1x PCR Bufferが入ったPCRチューブに単一細胞を移します。サンプルは迅速にドライアイスで凍結します。
- PCR解析まで-80℃で保存します。

## 実験を始める前の準備事項

- 必要に応じて各dNTPが10 mM入ったdNTPミックスを調製し、少量ずつ-20℃で保存します。QIAGENではPCRグレードの高品質なdNTPミックス（10 mM）をお届けしています（Cat. no. 201900）。

## 操作手順

1. **10x CoralLoad PCR Buffer**あるいは**10x PCR Buffer**、**dNTP**ミックス、**プライマー**溶液、**25 mM MgCl<sub>2</sub>**（必要な場合）を室温あるいは氷上で解凍する。**PCR**チューブ中の細胞を氷上で解凍する。

塩濃度が均一になるように使用前に各溶液を完全に混和します。

2. 表8に従ってマスターミックスを調製する。

マスターミックスにはテンプレートDNA（単一細胞）以外のPCRに必要な成分が全て含まれています。PCR反応の回数に必要なマスターミックス量よりも10%増しで調製します。ネガティブコントロール（テンプレートDNAなし）は必ず同時に行ないます。

注：最適なMg<sup>2+</sup>濃度は、ほとんどの場合、1x PCR Bufferおよび1x CoralLoad PCR Bufferに含まれている濃度で良好な結果が得られます。しかし、表9に従ってMg<sup>2+</sup>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8. HotStarTaq Plus DNA Polymeraseを用いた反応成分

成分	容量/反応	最終濃度
<b>マスターミックス</b>		
10x CoralLoad PCR Buffer* あるいは10x PCR Buffer*	5 µl	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	適量、表9参照	表9参照
dNTP ミックス (各 10 mM)	1 µl	200 µM各 dNTP
プライマーA	適量	0.2 µM <sup>†</sup>
プライマーB	適量	0.2 µM <sup>†</sup>
キャリアRNA	適量	(各反応当たり 50 ng)
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	1 µl	反応当たり 5 ユニット
RNase フリー水	適量	-
<b>テンプレート</b>		
1 x PCR Buffer 20 µl にシングル細胞		
<b>トータル容量</b>	<b>50 µl</b>	<b>-</b>

\* 15 mM MgCl<sub>2</sub>含有

<sup>†</sup> 英語版 Handbook 36 ページ、Table 16 を用いてモル換算を行ないます。

表9. 最終Mg<sup>2+</sup>濃度

反応液中の最終 Mg <sup>2+</sup> 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 <sub>2</sub> (μl) :	0	2	4	6	8	10	12	14

注：最適なMg<sup>2+</sup>濃度は実験ごとに決定すべきですが、ほとんどのケースでは、1x PCR Bufferおよび1x Coraload PCR Bufferに入っている1.5 mMで満足できる結果が得られます。

**3. マスターミックスをよく混和し、30 μlをPCRチューブに分注する。**

ピペットでマスターミックスを数回アップダウンするなどして、静かに混和します。

**4. 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。直ぐにステップ5に進む。それ以外はミネラルオイル約50 μlを溶液の上に重層する。**

**5. サーマルサイクラーをメーカーの指示に従ってプログラムする。**

注：熱活性化のために95℃で5分間インキュベートした後に各PCRを始めます。5分以上は加熱しないでください。

一般的なサイクリングプログラムを下記に掲載します。収量および特異性を最大にするには、新しいテンプレートあるいはプライマー・ペア毎に温度、サイクル時間を至適化する必要があります。

表10. 最適なPCR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	5分	95℃	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>3ステップのサイクリング</b>			
変性：	0.5～1分	94℃	
アニーリング：	0.5～1分	50～68℃	プライマーのT <sub>m</sub> より約5℃低い温度（英語版 Handbook 36 ページ、Appendix B 参照）。
エクステンション：	1分	72℃	1 kb以上のPCR産物では1 kbのDNA当たり約1分間のエクステンション時間を使用
サイクル数：	45～50		英語版 Handbook 39 ページ、Appendix C 参照。
最終エクステンション：	10分	72℃	

6. 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。

7. CoralLoad PCR Bufferを用いた際は、PCR反応液を直接アガロースゲルにロードできる。ゲルローディング・バッファーおよびマーカー色素を前もって添加する必要がない。

CoralLoad PCR Buffer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11を参照にしてください。

注：溶液の粘度が高い場合には、アガロースゲルの壁に沿って溶液をアプライします。

表11. 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：HotStarTaq *Plus* Master Mix を用いた PCR

## 実験を始める前の重要事項

- HotStarTaq *Plus* Master Mix は **95 °C で 5 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）。
- HotStarTaq *Plus* Master Mix では、最終反応ミックスの  $MgCl_2$  の最終濃度は 1.5 mM です。これによりほとんどのケースで満足できる結果が得られます。より高濃度の  $Mg^{2+}$  が必要な場合は、25 mM の  $MgCl_2$  を含むストック溶液を準備してください。
- PCR 産物の精製（例えば QIAquick PCR Purification Kit あるいは MinElute PCR Purification Kit を使用）を行わずに、蛍光強度や吸光度の測定が必要なダウンストリーム・アプリケーションでは、Coraload Concentrate の使用はお勧めしません。
- DNA を調製する場所あるいは PCR 産物を解析する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抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用してください。

## 操作手順

1. **プライマー溶液とテンプレート核酸を解凍する。**  
使用前によく混和します。
2. **HotStarTaq *Plus* Master Mix をボルテックスにより簡単に混和し、表 12 に従って各 PCR チューブに 10  $\mu$ l ずつ分注する。**  
塩濃度が均一になるように使用前に HotStarTaq *Plus* Master Mix を完全に混和します。HotStarTaq *Plus* 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。
3. **Master Mix が入った PCR チューブに、希釈した適切な量のプライマー・ミックスを分注する。**
4. **各 PCR チューブにテンプレート DNA（20  $\mu$ l 反応液当たり 200 ng 以下）を添加する。**  
RT-PCR の場合には、逆転写反応溶液の一部を添加します。この溶液量は最終 PCR 溶液量の 10% を超えないようにします（英語版 Handbook 40 ページ、Appendix E 参照）。

表 12. HotStarTaq Plus Master Mix を用いた反応成分

成分	容量/反応	最終濃度
HotStarTaq Plus Master Mix、2 x	10 $\mu$ l	1 unit HotStarTaq Plus DNA Polymerase 1 x PCR Buffer* 200 $\mu$ M 各 dNTP
<b>希釈したプライマーミックス</b>		
プライマー A	適量	0.1 ~ 0.5 $\mu$ M
プライマー B	適量	0.1 ~ 0.5 $\mu$ M
オプション: CoralLoad Concentrate、10x	2 $\mu$ l	1x CoralLoad Concentrate
RNase フリー水	適量	-
<b>テンプレート DNA</b>		
テンプレート DNA、 ステップ 4 で添加	適量	20 $\mu$ l 反応液あたり 200 ng 以下
<b>トータル容量</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	-

注: 反応容量を増減する場合は、各成分を適宜調節します。

\* 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 含有

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 50  $\mu$ l のミネラルオイルを重層する。

6. サーマルサイクラーをメーカーの指示に従ってプログラムする。

注: 熱活性化のために 95 °C で 5 分間インキュベートした後に各 PCR を始めます。5 分以上は加熱しないでください。

一般的なサイクリング条件を表 13 (17 ページ) に掲載します。収量および特異性を最大にするには、新しいテンプレートあるいはプライマー・ペア毎に温度、サイクル時間を至適化する必要があります。



表 13. 最適なPCR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:	5分	95°C	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>3ステップのサイクリング</b>			
変性:	0.5~1分	94°C	
アニーリング:	0.5~1分	50~68°C	プライマーの $T_m$ より約5°C低い温 度 (英語版 Handbook 36 ページ、 Appendix B 参照)。
エクステンション:	1分	72°C	1 kb 以上のPCR 産物では1 kbの DNA 当たり約1分間のエクステ ンション時間を使用。
サイクル数:	25~35		英語版 Handbook 39 ページ、 Appendix C 参照。
最終エク ステンション:	10分	72°C	

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°Cで一晩、-20°Cで長期間保存できます。

8. CoralLoad Concentrate を用いた際は、PCR 反応液を直接アガロースゲルにロードできる。ゲルローディング・バッファーおよびマーカー色素を前もって添加する必要がない。

CoralLoad PCR Buffer 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 14 を参照にしてください。

注：溶液の粘度が高い場合には、アガロースゲルの壁に沿って溶液をアプライします。

表 14. マーカー色素の移動距離

%TAE (TBE)	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ガイド

## コメント

### 増幅産物が皆無あるいは少ない

- a) HotStarTaq Plus DNA Polymeraseが活性化されていない  
95°Cで5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。  
15分間活性化するとプライマー・ダイマー形成や複数のバンドを持つ産物が生じることがある。
- b) ピペッティング・エラー、あるいは試薬の入れ忘れ  
PCRをもう一度行なう。プライマーやdNTPs試薬を含む試薬の濃度および保存条件をチェックする。HotStarTaq Plus Master Mixを使用した際は、HotStarTaq Plus Master Mixとプライマー・テンプレート溶液の比率が1:1であることを確認する。
- c) PCR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。
- d) 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  
各プライマー濃度を0.1~0.5 μM (0.1 μMずつ)でPCRを再度行なう。特に高感度なPCRを行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲル\*でプライマーが分解していないかをチェックする。
- e) 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 35ページ、Appendix A参照)。ストック溶液からテンプレート核酸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。  
シングルセルPCRでは、nested PCR法を用いて2回目のPCRを実施する。(英語版Handbook 39ページ、Appendix D参照)
- f) Mg<sup>2+</sup>濃度が最適でない  
添付の25 mM MgCl<sub>2</sub>溶液を用いて0.5 mM間隔で1.5~5.0 mMまでのMg<sup>2+</sup>最終濃度の範囲でPCRを行なう(3ページの表2参照)。
- g) 酵素濃度が低すぎる  
100 μl反応液当たり2.5ユニットのHotStarTaq Plus DNA Polymeraseを使用する。必要な場合は、0.5ユニット単位でHotStarTaq Plus DNA Polymeraseの量を増加する。HotStarTaq Plus Master Mixを用いた際は20 μl反応液当たり10 μlを使用する。
- h) サイクル数が少ない  
5サイクルずつサイクル数を増加する(英語版Handbook 39ページ、Appendix C参照)

\* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

## コメント

- i) アニーリング温度  
あるいは時間が正確で  
はない
- 2℃ずつアニーリング温度を下げる。アニーリング時間は30～60秒の間にする。最適なアニーリング温度の決定は難しいが、タッチダウンPCRにより多くの場合には解決できる（英語版 Handbook 42 ページ、Appendix F を参照）。
- j) 変性温度あるいは時間が  
正確でない
- 変性は94℃で30～60秒間行なう。PCRプロトコールのステップ6（4、9ページ）あるいはシングルセル・プロトコールのステップ5（13ページ）に記載されているように、最初に95℃で5分間のインキュベーションを行なう。
- k) エクステンション時間が  
短い
- エクステンション時間を1分単位で延長する。ゲノムDNAを用いたPCRには、下の“o) ゲノムDNAからのロングフラグメントのPCR”を参照する。
- l) 最初のテンプレート量が  
不十分
- Nested PCRを用いて2回目のPCRを行なう（英語版 Handbook 39 ページ、Appendix D 参照）。
- m) プライマー・デザインが  
適切でない
- プライマー・デザインを再考する（英語版 Handbook 36 ページ、Appendix B 参照）。
- n) RT 反応が間違っている
- RT-PCRでは逆転写反応効率の平均値が10～30%であることを考慮しなければならない。逆転写反応液の添加量は最終PCR溶液量の10%を超えてはならない（英語版 Handbook 40 ページ、Appendix E）。
- o) ゲノムDNAからの  
ロングフラグメントの  
PCR
- ゲノムDNAから4 kb以上の産物を増幅する際は、反応液中のゲノムDNA量を増やす（英語版 Handbook 35 ページ、Appendix A 参照）。あるいはQIAGEN *Taq* DNA PolymeraseとHotStar HiFidelity Polymeraseを用いてロングPCR産物の増幅用プロトコールを用いる（英語版 *Taq* PCR HandbookあるいはHotStar HiFidelity PCR Handbook 参照）。または、QIAGEN Long Range PCR Kitを使用する。
- p) 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。
- q) サーマルサイクラーに  
問題がある
- 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たかチェックする。

## コメント

### 増幅産物が多数検出

- a) HotStarTaq Plus DNA Polymeraseの活性時間が長過ぎる 95℃で5分間のみ最初の活性化を行なったことを確認する。
- b) 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。
- c) アニーリング温度が低すぎる 2℃ごとにアニーリング温度を上げる。アニーリング時間は30～60秒の間にする。最適なアニーリング温度の決定は難しいが、タッチダウンPCRにより多くの場合には解決できる（英語版 Handbook 42ページ、Appendix Fを参照）。
- d) 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 各プライマー濃度を0.1～0.5 μM（0.1 μMずつ）でPCRを再度行なう。特に高感度PCRを行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲル\*でプライマーが分解していないかをチェックする。
- e) プライマー・デザインが適切でない プライマー・デザインを再考する（英語版 Handbook 36ページ、Appendix B参照）。

### スメア状の産物

- a) 最初の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 35ページ、Appendix A参照）。ストック溶液からテンプレート核酸の連続希釈溶液を調製する。  
この連続希釈溶液を用いてPCRを行なう。PCR産物を再増幅する際は、最初のPCR産物を $10^3 \sim 10^4$ 倍に希釈、1 μlを再増幅反応に用いる。Nested PCRを用いると高い感度と特異性のある再増幅結果が得られることが多い（英語版 Handbook 39ページ、Appendix D参照）。
- b) コンタミネーションがある ネガティブコントロールのPCR（テンプレートDNAなし）でPCR産物あるいはスメア状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抑えるために、疎水性フィルターを装着したチップを使用。DNAを調製する場所あるいはPCR産物を解析する場所から離れたところで反応液のセットアップを行なう。

\* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS（material safety data sheet）をご覧ください。

## コメント

---

- c) 酵素濃度が高すぎる 100  $\mu$ l 反応液当たり 2.5 ユニットの HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase を使用する。HotStarTaq *Plus* Master Mix を用いる際は 20  $\mu$ l 反応液当たり 10  $\mu$ l を使用する。
- d) HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase の活性時間が長過ぎる 95°C で 5 分間のみ最初の活性化を行なったことを確認する。
- e) サイクル数が多すぎる 3 サイクルずつサイクル数を減らす。
- f)  $Mg^{2+}$  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 までの  $MgCl_2$  最終濃度で PCR を行なう (3 ページ、表 2)。
- g) 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 各プライマー濃度を 0.1 ~ 0.5  $\mu$ M (0.1  $\mu$ M ずつ) で PCR を再度行なう。特に、高感度 PCR を行なう際は、変性ポリアクリルアミドゲルでプライマーが分解していないかをチェックする。
- h) プライマー・デザインが最適でない プライマー・デザインを再考する (英語版 Handbook 36 ページ、Appendix B 参照)。





Trademarks: QIAGEN®, QIAquick®, CoralLoad®, HotStarTaq®, MinElute®, ProofStart®, Q-Solution™ (QIAGEN Group).

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。

© 2007–2008 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

