

LightCycler 用反応試薬キット (QIAGEN 社) 試用実験報告

QIAGEN 社の QuantiTect™ SYBR Green PCR キットを試して

QIAGEN 社のご厚意により, QuantiTect™ SYBR Green PCR キットを試す機会を得ました. Roche キットで使用した実績のある、プライマーについて QuantiTect™ SYBR Green PCR キットを使用し、LightCycler にかけてみました。その結果について簡単に報告いたします。

1. はじめに

【QIAGEN キットの特長】

QIAGEN 社の QuantiTect™ SYBR Green PCR キットは下記点を特長としている。

- ・ 高特異性／高感度
- ・ マスターミックスにテンプレートとプライマーを加えるだけの簡便さ
- ・ 条件検討不要

【リアルタイム PCR 用のターゲットについて】

本来、リアルタイムPCRに用いるターゲットは500bpまでとされ、理想的には100～150bpが良いとされているが、Roche 試薬を使用している中にはこれまでの実験の流れで、500bp以上をターゲットとし、うまくいったという経験を持つ人も多いと思われる。そこで、今回は、以下の4種類のプライマーセット(A, B, C, D)について検討した。

PrimerA:110bp Tm:55℃

PrimerB:237bp Tm:54℃

PrimerC:316bp Tm:59℃

PrimerD:573bp Tm:50℃

【手順における違い】

Roche 試薬ではまず「MgCl₂ 濃度条件の最適化」が必要だが、QIAGEN 社の QuantiTect™ SYBR Green PCRキットではこの必要がないということで、プライマーが適したものかどうかを見極め、次には本来の目的である定量の過程に進める（表1）。

Roche	QIAGEN
試薬検 MgCl ₂ 濃度の最適化 プライマーの評価 ゲルによるブダゲの確認 ↓ 本番 目的とするカプルの測定	試薬検 プライマーの評価 ゲルによるブダゲの確認 ↓ 本番 目的とするカプルの測定

表1：手順の違い

【Protocol における設定の違い】

Roche試薬とQIAGEN社のQuantiTect™ SYBR Green PCRキットでのProtocolにおける設定の違いは、初期活性化ステップでの時間が15分に、PCRの変性での温度が94℃に、PCRのアニーリング時間が20秒に、PCRのエクステンションの時間が100bpあたり5秒に、蛍光パラメーターがChannel1:2:3=15:10:10になるところである（表2）。

Roche

Fluorimeter

Channel 1	5
Channel 2	15
Channel 3	30

Denature

温度	インキュベーション時間
95℃	10min

PCR

区1		区2		区3	
温度	インキュベーション時間	温度	インキュベーション時間	温度	インキュベーション時間
95℃	15	プライマーに依存	5	72	産物の長さ / 25秒

QIAGEN

Fluorimeter

Channel 1	15
Channel 2	10
Channel 3	10

Denature

温度	インキュベーション時間
95℃	15min

PCR

区1		区2		区3	
温度	インキュベーション時間	温度	インキュベーション時間	温度	インキュベーション時間
95℃	15	プライマーに依存	20	72	5秒 / 100bp

表2：Protocolにおける設定の比較

2. 実験について

【手順】

テンプレート以外を表3の通り混合し、キャピラリーに分注した後、それぞれにDNAテンプレートを添加し、遠心してサンプルをキャピラリー先端に落とす。

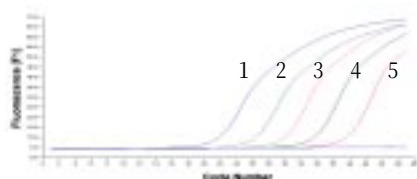
キャピラリーをカセットにセットし、装置にかける。QIAGENのハンドブックに従いプロトコルを設定した後、装置を作動させる。終了後、5%ポリアクリルアミドゲルにて泳動する。

LightCyclerでの増幅曲線、融解曲線、PCR産物のゲル泳動像などをもとに評価する。

【結果1】：PrimerA:110bp Tm:55°C

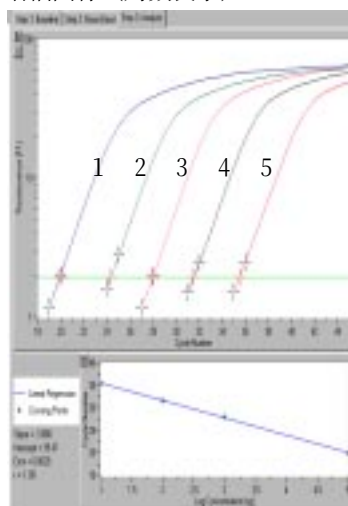
プロトコル通りの設定で、下図のような増幅曲線、融解曲線、ゲル像を得た。

増幅曲線（直線表示）

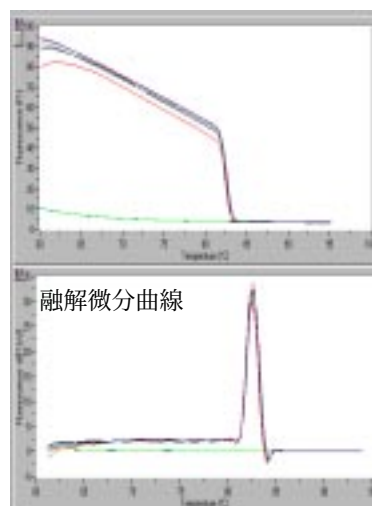


← 110bp

増幅曲線（対数表示）



融解曲線

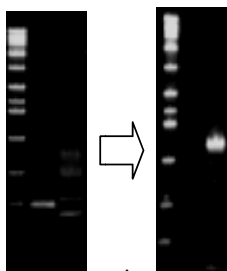


Template 濃度

サンプル1～5は、それぞれ 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 コピーに対応する。

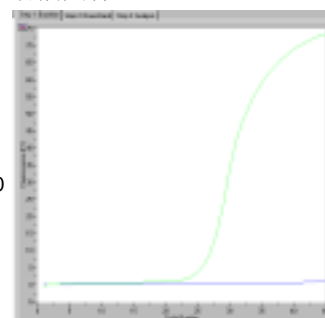
【結果2】 • PrimerB:237bp Tm:54°C

ゲル像は左側がPCRのextension時間をプロトコル通り設定したもので、右側が設定時間を2倍に設定したときのものである。併せて、2倍設定時の増幅曲線を示した。



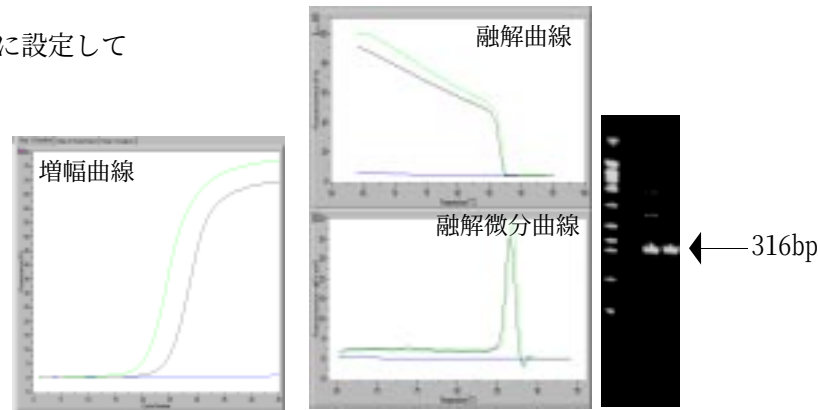
extension time
12sec 24sec

増幅曲線



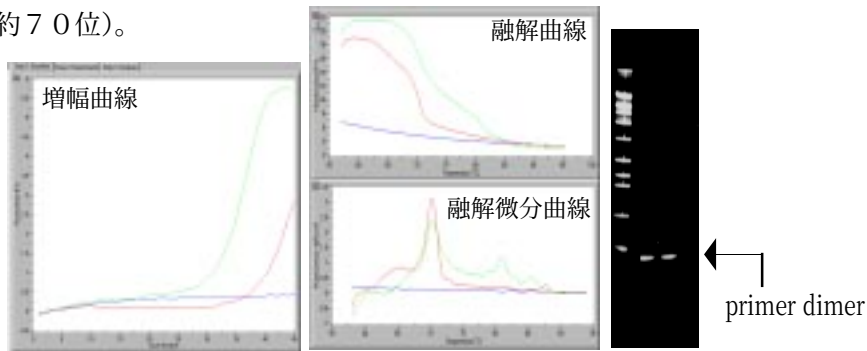
【結果 3】・PrimerC:316bp Tm:59℃

PCRのextention時間を2倍に設定して得られた結果を示した。



【結果 4】・PrimerD:573bp Tm:50℃

PCRのextention時間を2倍に設定しても、うまく増幅されなかった（増幅曲線のY軸の最高値は6。通常は約70位）。



3. 終わりに

【まとめ】

異なった Temmplate 長についての増幅可能条件の比較

	primerA(110bp)		primerB(237bp)		primerC(316bp)		primerD(573bp)	
extention time	×1	×2	×1	×2	×1	×2	×1	×2
Roche	○	—	○	—	○	—	○	—
QIAGEN	○	○	×	○	—	○	×	×

表 4：結果のまとめ

extention time × 1 は各メーカーの初期設定値で、Roche では7° ロタ° 外(bp)／25 秒、QIAGEN では7° ロタ° 外(bp)／20 秒とした。× 2 は、各メーカーの初期設定値を 2 倍設定したものをさす。
○は増幅、7° ロタ° 外ができたもの、×は増幅されなかったもの、—は試していないものを各々示している。

コストの比較

	消耗品費 (1サンプル当たり)		
	キャピラリー	薬	合計
Roche	約10円	約20円	約30円
QIAGEN	約10円	約10円	約20円

表 5：1サンプル当たりの消耗品費比較

- ・ ターゲットが100～150bpの場合はプロトコル通りにPCRの区分3 (extention)の時間を設定する事で良好な結果が得られた。
- ・ ターゲットが150～500bpの場合はPCRの区分3 (extention)の値をプロトコルに示された初期設置値の2倍とすることでうまく増幅された。
- ・ ターゲットが500bp以上の場合はPCRの区分3 (extention)の時間を初期設定値の2倍としてもうまくいかない。MgCl₂濃度を変えてみるようにというメーカーからの指示に従って検討したが、今回のプライマーではうまくいかなかった。MgCl₂濃度を変えるのと、設定の時間を2倍、2.5倍に設定した組み合わせを検討する余地があるかもしれない。
- ・ LightCyclerで増幅測定後のサンプルをアクリルアミドゲル電気泳動で確認すると、非特異的増幅バンドの出現が少ないように思われた。
- ・ Roche試薬で最適結果を与えたMgCl₂濃度3 mMについて精査した。primerAの実験について2.5～5mMの範囲でMgCl₂濃度を変えてみたところ、2.5mMが最適濃度だった。

以上まとめると、ターゲットが150bp以下の場合はもちろん、500bpまでであれば時間が従来より少々長くなるというところはあるがMgCl₂濃度を検討しなくてよく、非特異的バンドも少なくなるという利点があり、試薬コストが単純に比較して1／3になるということを考えれば、コストパフォーマンスが高い。ただし、キャピラリーのコストを加えると約1／2差に縮まる。選択は使用者の判断によるべきでしょう。

今回の結果をみなさまがお使いになるときの参考にしていただけたら幸いです。