

Real-Time qPCR: qPCR 試薬性能比較のためのガイドライン

Sarah Teter, PhD, and Leta Steffen, PhD, Promega Corporation

このガイドは Application Note #AN299
を基に作成しています。

はじめに

既に最適化された qPCR アッセイを新たな qPCR マスターミックスでテストする際には、qPCR 試薬性能を反映する 5 つの要素（アッセイ特異性、繰り返し精度、直線性、感度および効率）を適切に評価するために、注意深く実験をデザインする必要があります。本稿では、qPCR 試薬性能評価における比較実験のセットアップやデータ解析の方法について述べます。

qPCR アッセイプレートのセットアップ (図 1 参照)

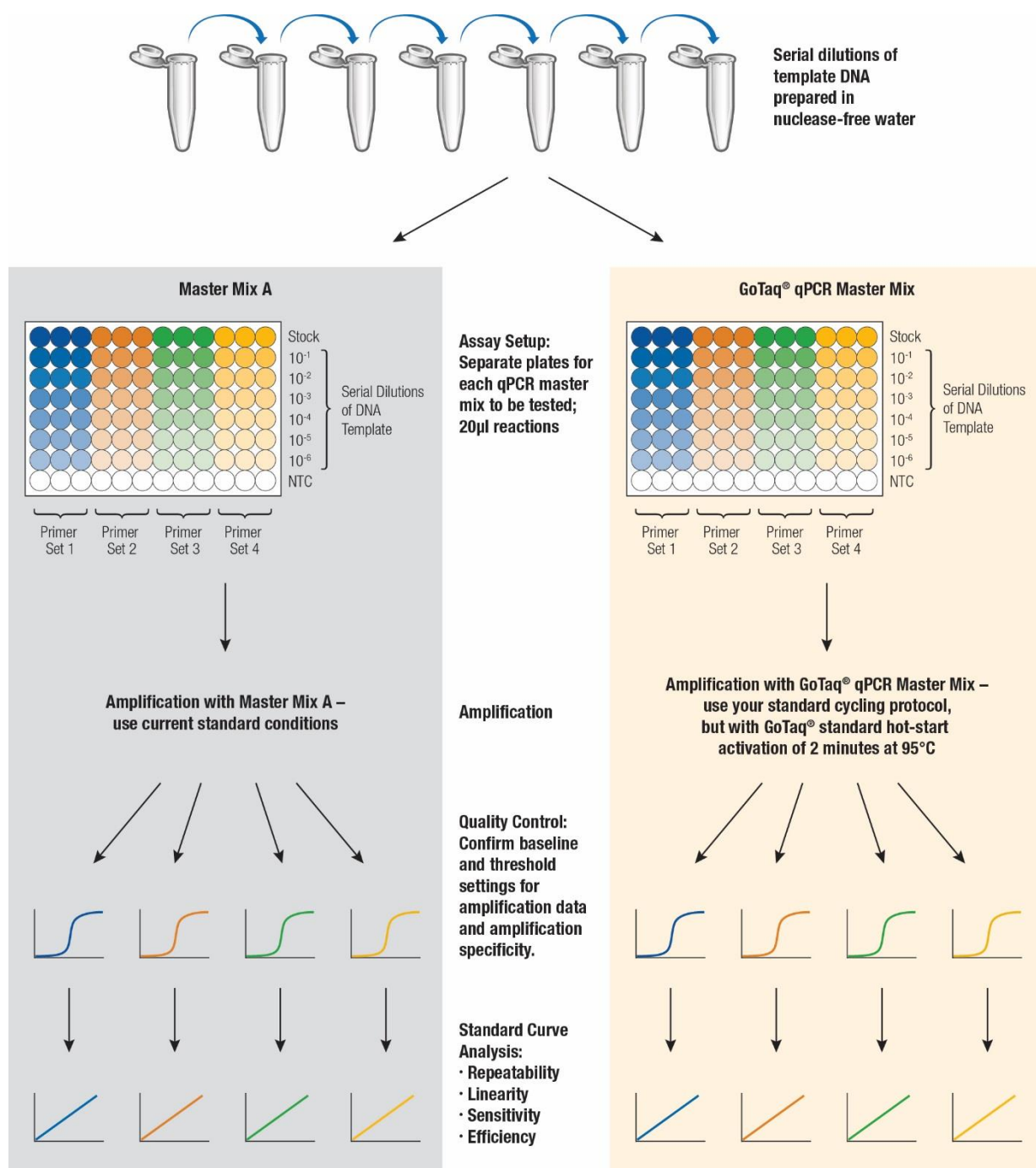
- 1. 希釈系列を調製する** 高純度の DNA テンプレートを出発材料に、6 段階のテンプレート希釈系列を調製してください。1:10 または 1:5 の希釈系列を推奨します。高度に複雑な真核生物の DNA テンプレートでは、100ng DNA/reaction が適切な初期濃度です。
- 2. ご使用中の qPCR 試薬および GoTaq® qPCR Master Mix それぞれを用いて、バルクの反応ミックスを調製する** 2× qPCR マスターミックス、プライマー（およびプローブ）、Nuclease-Free Water を混合し、20 μ l 反応 24 回分 (+10%; ピペッティング誤差用) に十分な量の反応ミックスを調製してください。現在ご使用中の qPCR 試薬に最適化されているプライマー/プローブ濃度を GoTaq® qPCR Master Mix にも適用してください。必要に応じてリファレンス色素を添加してください。
- 3. アッセイプレートをセットアップする** 反応ミックスとテンプレートをプレートに加え、最終反応液量を 20 μ l にしてください（例えば、15 μ l の反応ミックス + 5 μ l のテンプレート）。各テンプレート濃度の反応はトリプリケートで行います。プレートをシールし軽く遠心して液をウェルの底に集めてください。
- 4. 適切な熱サイクル条件で増幅反応を行う** 現在ご使用中の qPCR 試薬に最適化された変性およびアニーリング／伸張サイクル条件を両方の qPCR 試薬に適用してください。ただし、GoTaq® qPCR Master Mix の Hot-Start Activation ステップ（95°C、2 分間）は確実に実施してください。色素ベースの qPCR 反応では、解離／融解曲線分析を行ってください。

qPCR 増幅データ品質の分析

- 1. NTC (no template control) 反応において増幅が無いことを確認する** NTC 反応ウェルにおいて、 C_q 値が決定されていないことを確認してください。もしくは、NTC の C_q 値が 38 サイクル以上であり、かつ最低テンプレート濃度の C_q 値がその 3 サイクル以内に無ければ、NTC の非常に高い C_q 値は許容範囲として取り扱って差し支えありません。
- 2. 各アッセイに対するデータを個別に解析する** 異なるアッセイを実施したウェルは除外し、同一のアッセイからなる 1 組のウェルから得られたデータセットを用いてデータ解析してください。また、NTC を含むウェルもデータ解析から除いてください。
- 3. 自動のベースライン設定および閾値設定を使用する** qPCR 試薬性能比較の際には、自動ベースラインウィンドウと閾値設定のオプションを選択しデータ解析してください（普段マニュアル閾値で実験している場合でも）。

4. データに対して適切なベースラインウィンドウが設定されたことを確認する サイクル数に対する蛍光信号のリニアプロット上で、解析ソフトウェアが規定したベースラインウィンドウ内のシグナルがフラットであることを確認してください。
5. データに対して適切な閾値が設定されたことを確認する アッセイの全ての反応にわたって、閾値が指数関数的増幅期にあることを確認してください。片対数プロット（サイクル数に対する蛍光値の対数プロット）では、閾値は各増幅曲線の直線部分内になければなりません。

図 1 : qPCR 試薬性能比較の概要



最適な qPCR Master Mix の決定

得られた増幅データの品質に問題がないことが確認できれば、テストした qPCR マスターミックスとプライマー/プローブの組み合わせにおけるアッセイの特異性、繰り返し精度、直線性、感度および効率を評価することができます。

1. **反応特異性** 色素ベースの qPCR マスターミックスを使用した場合、融解曲線分析における単一ピークは、その反応が特異的であることを意味しています。プローブベースの qPCR アッセイでは、プローブが対象となる増幅産物に特異性を与えています。NTC 反応は、増幅なし、サイクル後半での増幅、もしくはプライマーによるアーティファクトの増幅、のいずれかを示します。
2. **アッセイの繰り返し精度** 繰り返し精度は各テンプレート濃度から得られた C_q 値に対する標準偏差から評価できます。 ± 0.5 C_q は高い標準偏差に対し妥当なカットオフ値です。 C_q の標準偏差が 0.5 を超えるようなデータポイントは、試薬性能評価から除外してください。
3. **アッセイの直線性** インプットしたテンプレート濃度の対数値に対して C_q 値をプロットした回帰直線から求められた相関係数 (r^2) は 0.98 以上であることが望ましい。最も低いテンプレート濃度および最も高いテンプレート濃度の C_q 値が、回帰直線から大きく外れている場合（それらを含めると r^2 が 0.98 以下となる）には、これらのポイントを解析から除外してください。
4. **アッセイの感度** 信頼性のある C_q 値を決定できる最も低いテンプレート濃度が、アッセイの感度に相当します。アッセイ感度は線形回帰式の検量線に適合した最も低いテンプレート濃度から評価できます。
5. **反応効率** qPCR アッセイの効率は、回帰直線の傾きを用いて次の式から計算することができます； $\text{Efficiency} = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$ 。ほとんどの解析ソフトウェアでは、反応効率は自動計算されます。

qPCR 試薬比較のためのツール

下の表は qPCR 試薬のアッセイ性能を、特異性、繰り返し精度、直線性、感度および効率に基づいて評価するための成績表です。各欄に示された基準に合致した qPCR 試薬にチェックマークを入れてください。最も多いチェックマークがある qPCR 試薬がアッセイに最も適しています。

特異性、繰り返し精度、直線性、感度および効率の基準に合致した qPCR 試薬にチェックマークを入れてください。2 つの qPCR 試薬が同等の場合には、両方にチェックマークを入れてください。		GoTaq® qPCR 試薬	他社 qPCR 試薬
ターゲット名：	特異性 NTC 反応ウェルでの増幅は無かったか、またはあっても非常に遅い増幅だったか？色素ベースの qPCR を使用している場合、融解曲線分析に単一ピークを確認できたか？		
	繰り返し精度 スタンダードカーブ中で、高い標準偏差 ($\geq 0.5C_q$) により除外されたポイントが少ないのはどちらの試薬か？		
	直線性 線形回帰式での r^2 は ≥ 0.98 か？		
	感度 アッセイ感度が良い製品はどちらか？ (r^2 に負の影響がなく、 C_q の標準偏差が ≤ 0.5 を満たす最低 DNA 濃度)		
	効率 qPCR のアッセイ効率は 90–110% の間にあるか？		
		GoTaq® qPCR 試薬	他社 qPCR 試薬
チェックマークの合計数			

参考文献

1. Bustin, S.A. *et. al.* (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* **55**, 1-12.

その他資料

GoTaq® Master Mix テクニカルマニュアル (TM318)、GoTaq® Probe qPCR Master Mix テクニカルマニュアル (TM378)、Guidelines for a Successful qPCR Master Mix Comparison (TM498) でより詳細をご覧ください。