

製品コード CY510

研究用

Takara

CycleavePCR™ Reaction Mix SP

説明書

v201811Da

CycleavePCR Reaction Mix SP は、検出にサイクリングプローブを用いるリアルタイム PCR 専用のキットです。迅速性と定量性に優れたリアルタイム PCR 法と非常に特異性の高い検出法であるサイクリングプローブ法との組み合わせにより、ターゲットの検出や定量を正確かつ簡便に行うことができます。本製品は、Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズ（製品コード TP700、TP900 等）、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）などで使用できます。

※ タカラバイオウェブサイトで公開している SNP（1 塩基置換）検出用プライマー・サイクリングプローブ設計／注文システム「CycleavePCR Assay Designer (SNPs)」のプライマーとサイクリングプローブで解析を行う際には、CycleavePCR Reaction Mix（製品コード CY505A/B）をご使用ください。

I. 原理

CycleavePCR Reaction Mix SP では、*TaKaRa Ex Taq*® HS による PCR 増幅を行い、増幅産物をサイクリングプローブ法によりリアルタイムでモニタリングします。

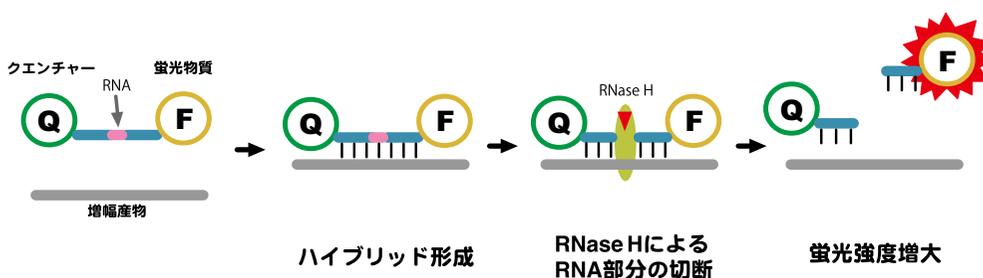
1. PCR

PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることができます。

本製品では、増幅に Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. サイクリングプローブ法

サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することができます。その検出原理を以下の図に示します。



プローブは、RNA 部を挟んで一方に蛍光物質が、他方にその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）が標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、増幅産物中の相補的な配列とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されて、強い蛍光を発するようになります。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることができます。

II. キットの内容 (50 回反応分)

(1) 2 × CycleavePCR Reaction Mix SP	625 μl
(2) RNase Free dH ₂ O	500 μl
(3) ROX Reference Dye (50 × conc.)	25 μl
(4) ROX Reference Dye II (50 × conc.)	25 μl

【コンポーネントの説明】

2 × CycleavePCR Reaction Mix SP :

酵素、Buffer、dNTP mixture を含む PCR 反応試薬です。酵素が含まれていますので、融解させる際、vortex で攪拌しないようにしてください。

RNase Free dH₂O : RNase Free の滅菌水です。

ROX Reference Dye、ROX Reference Dye II :

Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye を添加する機種

- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System
- StepOne/StepOnePlus Real-Time System

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種

- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

◆ 添加の必要がない機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ

【キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)】

1. リアルタイム PCR 装置 (authorized instruments)
2. 使用機器に応じた反应用チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー
4. サイクリングプローブ
5. マイクロピペットおよびチップ (オートクレーブ処理したもの)

III. 保存

− 20℃

IV. 特長

リアルタイム PCR とサイクリングプローブ法により、遺伝子の検出、定量を迅速かつ正確に行うことが可能です。

V. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

- (1) 反応液の攪拌は泡立えないようにゆるやかに行ってください。また、ピペッティングの前に試薬を軽く遠心して、チューブの底に落としてください。
- (2) 本試薬は使用直前まで − 20℃ で保存し、使用後は直ちに − 20℃ に保存してください。
- (3) 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

VI. 操作

- (1) 下記の反応液を氷上で調製する。
検体サンプル以外のコンポーネントを必要本数+ α 分調製し、各反応チューブに 20 μ l ずつ分注して軽く蓋をする。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System の場合 】

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × CycleavePCR Reaction Mix SP	12.5 μ l	1 ×
サイクリングプローブおよび Primer	5 μ l	
RNase Free dH ₂ O	2.5 μ l	
検体サンプル or 滅菌精製水	(5 μ l) * ¹	
Total	25 μ l	

【 Thermo Fisher Scientific 社のリアルタイム PCR 装置の場合 】

試薬	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × CycleavePCR Reaction Mix SP	12.5 μ l	1 ×
サイクリングプローブおよび Primer	5 μ l	
RNase Free dH ₂ O	2 μ l	
検体サンプル or 滅菌精製水	(5 μ l) * ¹	
ROX Reference Dye/ROX Reference Dye II* ²	0.5 μ l	
Total	25 μ l	

* 1 : 検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。

* 2 : Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System や StepOne/StepOnePlus Real Time System には ROX Reference Dye、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を、1 反応 (25 μ l) あたり 0.5 μ l を用いる。

- (2) ネガティブコントロールとして、滅菌精製水 5 μ l を (1) で分注した反応液 1 本に添加し、しっかり蓋をする。
- (3) サンプルを (1) で分注した反応液にそれぞれ添加し、しっかり蓋をする。
- (4) 反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心して、リアルタイム PCR 装置にセットする。

【 注意 】

反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始する。

- (5) 反応条件設定画面で、PCR 条件の入力および検出する蛍光物質に適したフィルターの選択を行い反応を開始する

反応条件例：初期変性 (Hold)

Cycle : 1
95°C 10 秒

2 step PCR
Cycle : 40
95°C 5 秒
64°C 30 秒

- (6) 反応終了後、解析を行う。増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法はリアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

VI. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System // (製品コード TP900/TP960)
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)
96well Hi-Plate for Real Time (製品コード NJ400)
Sealing Film for Real Time (Adhesive) Ver.2 (製品コード NJ502)
Sealing Film for Real Time (製品コード NJ500)
Plate Sealing Pads (製品コード 9090)
48 well snap plate (製品コード NJ700)
Flat cap for snap plate (製品コード NJ720)
0.2 ml Hi-8-Tube (製品コード NJ300)
0.2 ml Hi-8-Flat Cap (製品コード NJ302)
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps (製品コード NJ600)

VII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・Thermal Cycler Dice、*TaKaRa Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。CycleavePCR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社