

製品コード RR393S
RR393A

研究用

TAKARA

**Probe qPCR Mix
MultiPlus**

説明書

Probe qPCR Mix MultiPlus は、5'-ヌクレアーゼ法によるプローブ検出専用のリアルタイム PCR (qPCR) 試薬です。この試薬は、高速で特異性の高い増幅を幅広いダイナミックレンジで実現するために、抗体を利用したホットスタート PCR 酵素とリアルタイム PCR 用バッファーをそれぞれ最適化しています。さらに複数ターゲットの同時検出反応 (multiplex) にも対応し、高感度な検出と高い定量性を再現性高く実現します。

2×濃度のプレミックスタ입試薬には、耐熱性 RNase H (Tli RNaseH) と Uracil-N-Glycosylase (UNG) が添加されています。cDNA を鋳型とした場合、残存 mRNA による PCR 反応阻害を Tli RNaseH により極限まで抑制できます。また、UNG 反応を実施することで、本製品の増幅産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を回避できます。

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice® Real Time System IV (製品コード TP1000/TP1010/TP1030)
- Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960：終売)
- CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.1/0.2 mL block) (Thermo Fisher Scientific 社)
- Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)

I. 原理

本製品は、耐熱性 DNA ポリメラーゼにより PCR 増幅を行い、PCR 増幅産物をプローブにより、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 3 ステップからなる工程を 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。

2. 蛍光検出

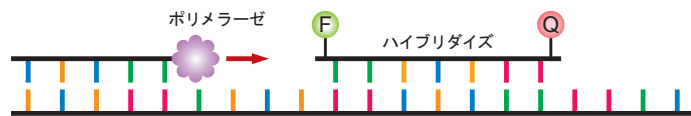
5' 側を蛍光物質 (FAM など) で、3' 側をクエンチャー物質 (TAMRA など) で修飾したオリゴヌクレオチドを反応系に加えます。

アニール条件下では、プローブはテンプレート DNA に特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されています。伸長反応時、耐熱性 DNA ポリメラーゼの持つ 5'→3' exonuclease 活性により、テンプレートにハイブリダイズしたプローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されることで発する蛍光を検出する方法です。

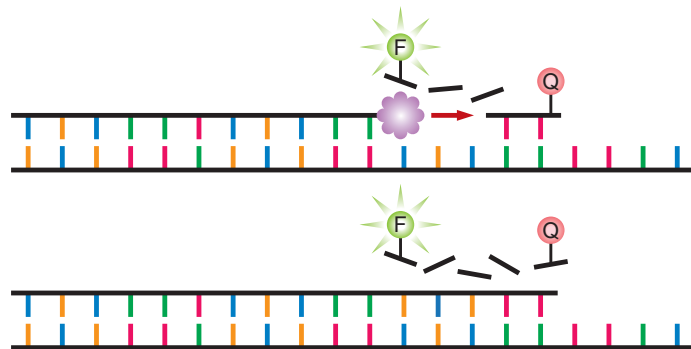
1) 熱変性



2) プライマーのアニールリング/プローブのハイブリダイゼーション



3) 伸長反応



II. 内容 [80 回 (RR393S) / 400 回 (RR393A)、25 µl 反応系]

	製品コード RR393S	RR393A
Probe qPCR Mix MultiPlus (2× conc.) *1	1 ml	1 ml × 5
ROX Reference Dye (50× conc.) *2	200 µl	200 µl
ROX Reference Dye II for RR393 (100× conc.) *2	200 µl	200 µl

* 1 : PCR 酵素、dNTP Mixture、Mg²⁺、Tli RNaseH、UNG を含みます。

* 2 : 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 (50×) を添加する機種 (最終濃度 1× でご使用ください)
 - StepOnePlus Real-Time PCR System
- ◆ ROX Reference Dye II for RR393 (100×) を添加する機種 (最終濃度 1× でご使用ください)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System
 - 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 (製品コード TP1000/TP950/TP900 等)
 - CronoSTAR 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
 - CFX96 Real-Time PCR Detection System

本製品以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

1. リアルタイム PCR 装置 (authorized instruments)
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー
4. 検出用プローブ (TaKaRa qPCR Probe など)
5. 滅菌精製水
6. 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

1. Probe 検出用 2× プレミックス qPCR 試薬
2. ホットスタート PCR 酵素と改良 PCR 用バッファーによる高速反応
3. 複数ターゲットの同時検出反応に対応
4. Tli RNaseH と UNG により PCR 反応阻害と偽陽性を回避

V. 操作上の注意

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用時には、泡立でないよう穏やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混合されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。
なお、Probe qPCR Mix MultiPlus の保存中に沈殿することがあります。軽く手で暖めるか室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。必ず均一に混合してからご使用ください。
2. 融解した試薬はただちに氷上に置いてください。
3. 本製品はプローブを含んでいません。別途、準備してください。
4. 反応液の調製、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。
5. 万一、サンプルやプライマーが核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋着脱およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。
6. 反応液の調製から鋳型 DNA の添加まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (X. 補足：エリア分けについてを参照)。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：鋳型 DNA の調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ鋳型 DNA の添加を行います。

本製品では反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。また、実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。
7. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。解析ソフトウェアの補正機能などが適切でない場合、誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、解析パラメーターの Manual 設定を行ってください。

VI. 使用上の注意

PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、反応前に 25℃ 2 分のステップを実施してください。UNG の作用により PCR 産物が分解されます。通常コンタミネーションがない場合は、このステップを入れる必要はありません。
本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 Taq 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃ (5 ~) 15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 20 秒で充分です。

VII. 操作

※ 各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix MultiPlus	12.5 μ l	1 \times
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*1
Probe*2	1.0 μ l	
template	2.0 μ l*3	
滅菌精製水	8.5 μ l	
Total	25.0 μ l	

【 ROX Reference Dye を使用する場合 】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix MultiPlus	12.5 μ l	1 \times
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*1
Probe*2	1.0 μ l	
ROX Reference Dye (50 \times)	0.5 μ l	1 \times
template	2.0 μ l*3	
滅菌精製水	8.0 μ l	
Total	25.0 μ l	

【 ROX Reference Dye II for RR393 を使用する場合 】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix MultiPlus	12.5 μ l	1 \times
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*1
Probe*2	1.0 μ l	
ROX Reference Dye II for RR393 (100 \times)	0.25 μ l	1 \times
template	2.0 μ l*3	
滅菌精製水	8.25 μ l	
Total	25.0 μ l	

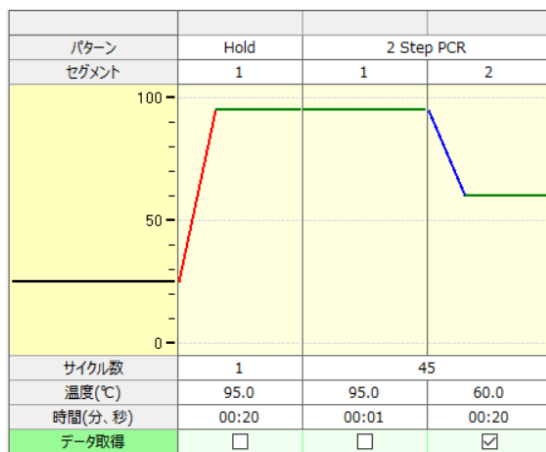
* 1 : 最終プライマー濃度は 0.2 μ M で良い結果が得られる場合が多いですが、反応性に問題があるときは 0.1 ~ 1.0 μ M の範囲で最適な濃度を検討してください。2 つ以上のプライマーセットを使用する際も、初期検討では各プライマーの最終濃度が 0.2 μ M となるように調製してください。

* 2 : プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なります。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討してください。2 つ以上のプローブを使用する際は、他のフィルターへのクロストークが起きないことや、クロス反応が生じないことを確認してください。なお、Thermal Cycler Dice Real Time System III の場合、通常、最終濃度 0.1 ~ 0.5 μ M の範囲で検討を推奨します。

* 3 : template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なります。段階希釈して適当な添加量を検討してください。DNA template は 100 ng 以下を用いることが望ましいです。また、RT-PCR で cDNA (逆転写反応液) を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにしてください。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください (9 ページの【PCR 条件の検討】をご参照ください)。



シャトル PCR 標準プロトコール

Hold (初期変性) *4

Cycle : 1

95℃ 20 秒

2 Step PCR

Cycles : 45

95℃ 1 秒

60℃ 20 秒 *5

* 4 : PCR 産物 (dUTP を含む) によるコンタミネーションが疑われる場合には、初期変性の前に 25℃ 2 分のステップを実施してください。UNG の作用により前回の実験からキャリーオーバーした PCR 産物が分解されます。

* 5 : 設定可能な場合、まずは 20 秒でお試してください。装置によっては複数波長で検出の際、伸長時間を 20 秒に設定できない場合があります。その場合は、設定可能な最短時間で設定してください。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

実験条件の選び方

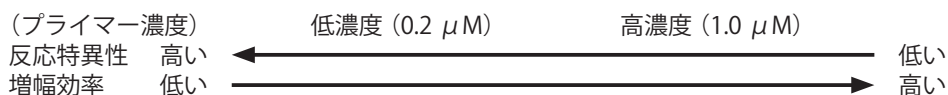
推奨条件（シャトル PCR 標準プロトコール）で良好な反応性が得られない場合には、下記の要領でプライマー濃度や PCR 条件の検討を行ってください。

実験条件を選ぶ際には、反応特異性と増幅効率の両方を考慮して総合的に判断します。両方のバランスが取れた実験系では広い濃度範囲で正確な定量が可能です。

- 反応特異性が高い実験系
 - ・ 低濃度鑄型の Ct 値が安定している。
 - ・ 低濃度鑄型検出の際の蛍光値低下が小さい。
- 増幅効率が高い実験系
 - ・ 増幅産物がより早いサイクルで検出される (Ct 値が小さい)。
 - ・ PCR 増幅効率が高い (理論値である 100%に近い)。

【プライマー濃度の検討】

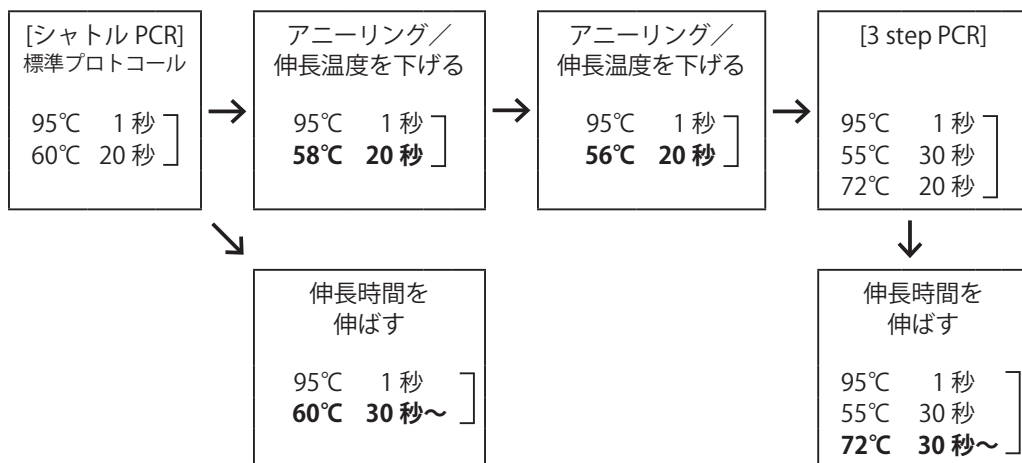
プライマー濃度と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。反応特異性を上げるにはプライマー濃度を下げ、増幅効率を上げるにはプライマー濃度を上げます。



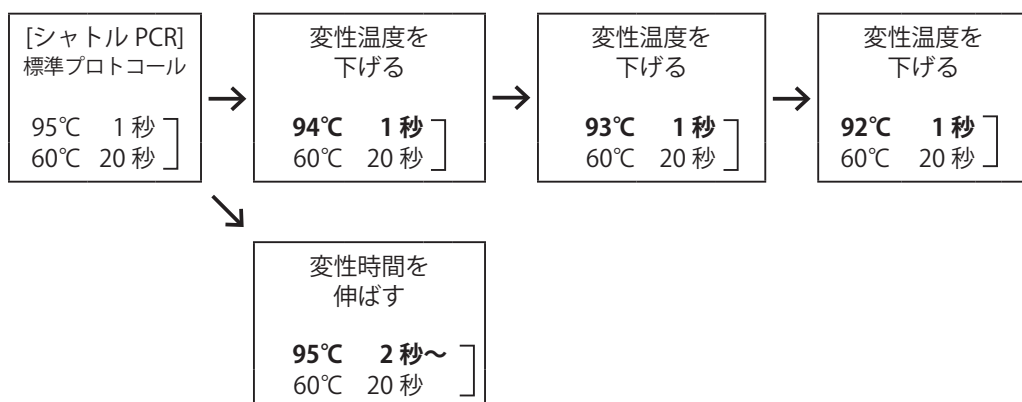
【PCR 条件の検討】

○ 増幅効率を上げるには—

- (1) アニーリング／伸長温度を下げるか 3 step PCR に変更、または伸長時間を伸ばすことにより、増幅効率が改善することがあります。以下の手順で検討を行ってください。

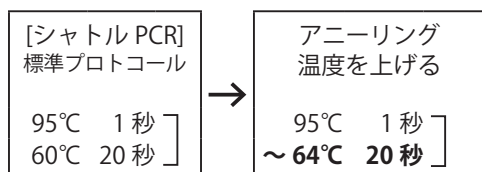


- (2) 変性温度を 95°C から 1°C ずつ 92°C まで下げる、または変性時間を伸ばすことにより、増幅効率が改善することがあります。



○ 反応特異性を上げるには—

アニーリング温度を上げると反応特異性が改善することがあります。増幅効率とのバランスを確認しながら、検討を行ってください。



○ 初期変性について

初期変性は通常 95°C、20 秒で充分です。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鑄型でも、ほとんどの場合、この条件で良好に反応できます。鑄型の状態によっては、95°C、1~2 分程度に延長することが可能ですが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがありますので、2 分以上の条件は推奨しません。

VIII. Appendix：プライマーおよびプローブの設計について

リアルタイム PCR を効率的に行うには、反応性の良いプライマーおよびプローブを設計することが重要です。特に、Multiplex 反応の場合、複数のプライマーとプローブが反応液中に存在するため、目的外の領域が増幅・検出されてしまう非特異反応や、適切な増幅産物であってもプローブの蛍光が隣接する蛍光フィルターで検出されてしまうクロストークが起きる恐れがあります。そのため、以下の点に注意してプライマーとプローブの設計および濃度検出を行うようにしてください。

1. プライマーセット間の Tm 値が同程度となるように設計してください。
2. プライマーセット間で、dimer が起きないように設計してください。
3. プローブの蛍光色素の蛍光波長が、互いに重なりが小さい組み合わせを選択してください。

なお、Single 反応の場合は、ヒト、マウス、ラットの遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成が可能である、弊社オンライン検索 & 注文システム「Perfect Real Time サポートシステム for プローブ」* のご利用を推奨致します。

詳細は弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

*：ヒト、マウス、ラットの RefSeq 登録遺伝子に対してリアルタイム RT-PCR 用のプライマーとプローブのセットが設計済みです (ご注文によりカスタム合成してお届けします)。本製品と組み合わせて、プローブ検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

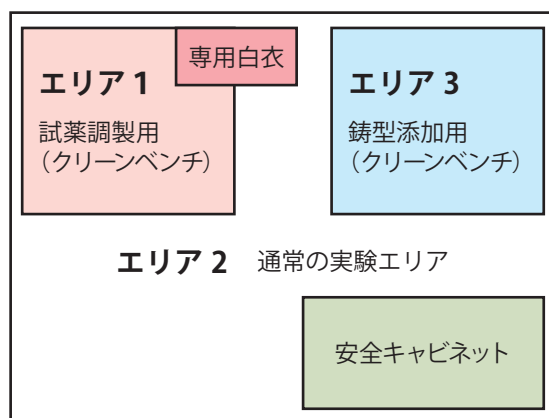
本システムを利用して RT-PCR プライマーを設計・合成された場合には、シャトル PCR 標準プロトコールで反応できます。

※ タカラバイオでは、「Perfect Real Time サポートシステム for プローブ」に対応していない遺伝子についても、プライマーのカスタム設計・合成サービスを行っております。弊社ウェブサイトにてご注文を承ります。

IX. 参考文献

- 1) 吉崎美和、向井博之 実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」第3章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ (2005) p120-126
- 2) 吉崎美和、向井博之 実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1) リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 (2008) p39-43

X. 補足：エリア分けについて



- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
試薬の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
標準サンプルの希釈もここで行う。

XI. 関連製品

PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B)
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (製品コード RR047A/B)
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A/B)
PrimeScript™ FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser (製品コード RR092S/A/B)
Probe qPCR Mix (製品コード RR391S/A/B)
Probe qPCR Mix, with UNG (製品コード RR392S/A/B)
One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601A/B)
Thermal Cycler Dice® Real Time System IV (製品コード TP1000/TP1010/TP1030)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)

Perfect Real Time サポートシステム for プローブ*

- *：ヒト、マウス、ラットの RefSeq 登録遺伝子に対してリアルタイム RT-PCR 用のプライマーとプローブのセットが設計済みです（ご注文によりカスタム合成してお届けします）。本製品と組み合わせて、プローブ検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。
詳細は弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

XII. 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 はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeScript、CronoSTAR 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社