

製品コード RR600A
RR600S

研究用

Takara

One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix

説明書

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix は、プローブ検出 (5'-ヌクレアーゼ法) による 1 ステップリアルタイム RT-qPCR の専用試薬です。本製品は 2 × プレミックスとなっており、-20℃の保存条件下でも凍結せず、ターゲットを検出するためのプライマー・プローブ、およびサンプルとなる鋳型を添加するだけで、すぐに反応が行えます。逆転写反応と qPCR を 1 チューブ内で連続的に行えるため、操作が簡便です。逆転写反応には、PrimeScript RTase の特異性や伸長性を維持しつつ、55℃まで耐熱性能を向上させた、新規 PrimeScript III RTase を使用しているため、より複雑な 2 次構造を持つ RNA の cDNA 合成にも威力を発揮します。cDNA 合成後は、連続して *TaKaRa Taq*[™] HS により反応特異性および増幅効率の高い PCR を行い、プローブが発する蛍光をリアルタイムに検出します。さらに本製品は、ヘパリン (血液) やフミン酸 (土壌) といった様々な阻害物質に対して高い抵抗性となるように至適化されているため、広範囲のサンプルに対して安定した 1 ステップリアルタイム RT-qPCR を行うことが可能です。本製品は、遺伝子の発現解析から RNA ウイルスの検出といった様々なアプリケーションに使用できます。

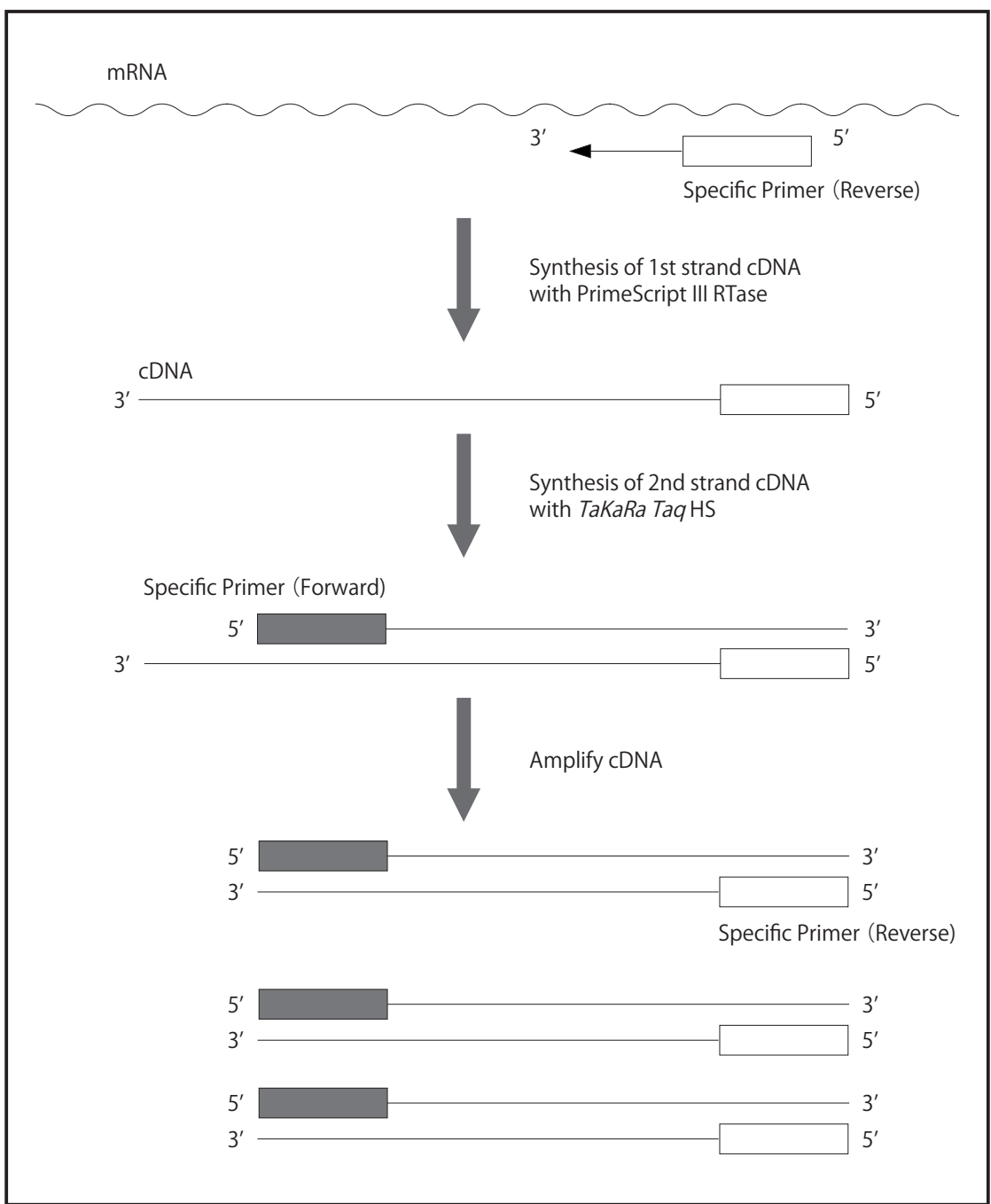
I. 原理

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix では、逆転写酵素 PrimeScript III RTase による RNA からの cDNA 合成と *TaKaRa Taq* HS による PCR 増幅を、1 チューブ内で連続的に行います。PCR 増幅産物は、プローブによりリアルタイムでモニタリングします。

1. RT-PCR

RNA は PCR の直接の鋳型とはなりません、逆転写酵素により RNA から cDNA を合成することにより、PCR を RNA 解析に応用することが可能になります。これが RT-PCR であり、高感度な RNA 検出方法です。本製品では、One Step RT-PCR を行います。その原理を右に示します。

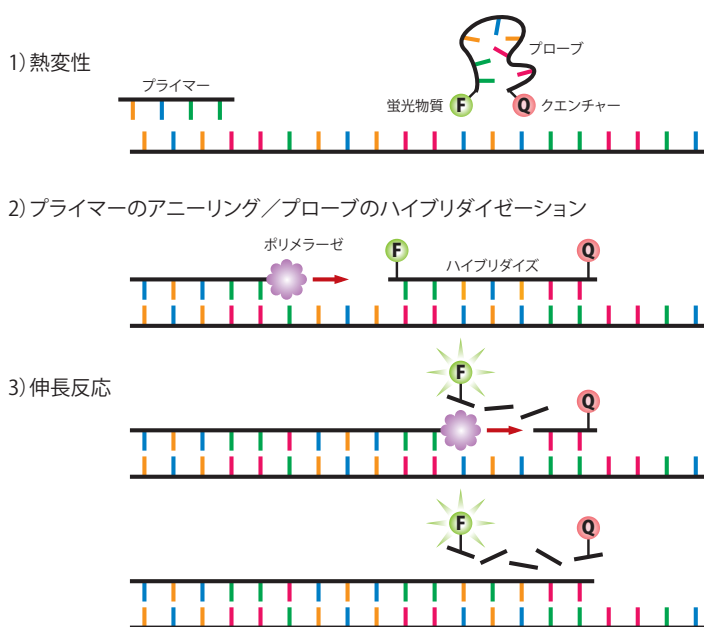
One Step RT-PCR では、PCR 用の Specific Primer (Reverse) を用いて逆転写反応を行い、次に合成されたそれら cDNA を鋳型として、Specific Primer (Forward、Reverse) による PCR 増幅を、1 チューブ内で連続的に行います。



1 ステップ RT-PCR 法の原理

2. 蛍光検出

本試薬では、オリゴヌクレオチドの 5' 側を蛍光物質 (FAM など)、3' 側をクエンチャー物質 (TAMRA、BHQ1 など) で修飾した検出プローブを使用します。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。しかしながら伸長反応時には、*Taq* 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は分解され、クエンチャーによる抑制が失われます。この過程で生じる蛍光をリアルタイム PCR 装置により検出します。これら原理を組み合わせた方法は、サンプルのリアルタイムでの定量を可能とすることから、One Step RT-q (quantitative) PCR と呼ばれます。



II. 内容 (製品コード RR600A; 25 μ l 反応・200 回分、製品コード RR600S; 25 μ l 反応・50 回分)

	製品コード RR600A	RR600S
1. One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2 \times)	625 μ l \times 4	625 μ l
2. RNase Free H ₂ O	1.25 ml \times 2	1.25 ml
3. ROX Reference Dye (50 \times conc.) *	100 μ l	40 μ l
4. ROX Reference Dye II (50 \times conc.) *	100 μ l	40 μ l

* : 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を使用する場合に添加する。

- ◆ ROX Reference Dye を添加する機種の場合
 - ・ Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- ◆ ROX Reference Dye II を添加する機種の場合
 - ・ Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- ◆ 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 TP950/TP970/TP980/TP990、TP700/TP760)
 - ・ LightCycler シリーズ (Roche Diagnostics 社)
 - ・ CFX シリーズ (Bio-Rad 社)

キット以外に必要な試薬および機器 (主なもの)

- リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム
本製品の適応機種
 - Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)
 - Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)
 - CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- 専用反応チューブあるいはプレート
- PCR 用プライマー
- 検出用プローブ (TaKaRa qPCR Probe など)
検出用プローブ設計サイト
(<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/index.htm#probe>)
- マイクロピペットおよびチップ

III. 保存 − 20℃

IV. 特長

- Probe 検出用ワンステップ RT-qPCR 試薬
- − 20℃の保存下でも凍結しない 2 × プレミックスで操作が簡便
- 新規耐熱化逆転写酵素 PrimeScript III RTase の採用により、高温 (〜 55℃まで) での逆転写反応が可能
- 高い阻害物質抵抗性
- 高い再現性

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。**

- One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2 ×) は、使用前に軽く混合した後、スピンドウンしてください。使用後は、直ちに − 20℃に保存してください。また、製品受け取り直後は凍結している場合がありますが、品質には問題ありませんので融解してご使用ください。
- 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防止してください。
- 反応液は、必要分 + α の Master Mix (One Step PrimeScript RT-qPCR Mix (2 ×)、RNase Free H₂O、プライマー・プローブあるいは RNA サンプルの混合液) を調製すると便利です。組成の均等な Master Mix を最少回数分注することで、試薬調製のばらつきを最小限に留めることができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。
- 本キットによる逆転写反応には、特異的なプライマーを用います。Random Primer や Oligo dT Primer は使用できません。

VI. 使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Taq* HS 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 用酵素です。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 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95℃ 10 秒で充分です。

VII. 操作

※ 各機種取扱説明書に従って操作してください。RNA 調製方法は、< VIII. Appendix : RNA サンプルの調製について > をご参照ください。

【Thermal Cycler Dice Real Time System III を用いる場合の操作方法】

1. 反応液の調製

下記に示す反応液を氷上で調製する。

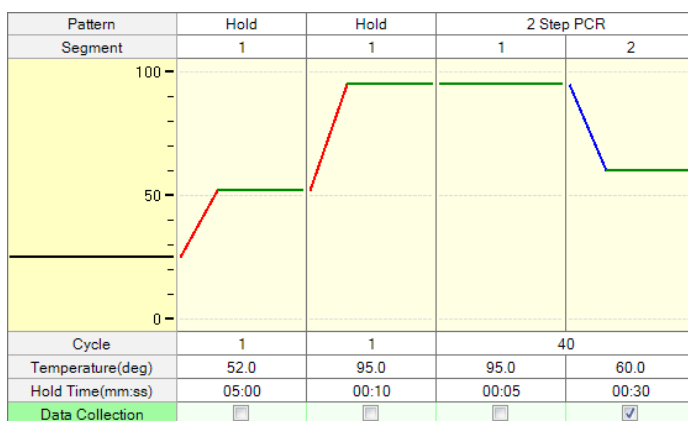
< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
One Step PrimeScript RT-qPCR Mix (2 ×)	12.5 μ l	1 ×
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
プローブ (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M *2
RNA サンプル*3	\leq 2.5 μ l	
RNase Free H ₂ O	X μ l *4	
Total	25 μ l	

2. リアルタイム RT-qPCR 反応

反応チューブまたはプレートを軽くスピンドウンした後、Thermal Cycler Dice Real Time System にセットし、以下の条件で反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください (10 ページの < RT-qPCR 反応条件について > をご参照ください)。



Pattern 1 : 逆転写反応

52°C 5分

95°C 10秒

Pattern 2 : PCR 反応

Cycle : 40

95°C 5秒

60°C 30秒

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。

解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System 取扱説明書をご参照ください。

* 1 ~ 4 : 10 ページの < RT-qPCR 反応条件について > をご確認ください。

【 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法 】

1. 反応液の調製

下記に示す反応液を氷上で調製する。

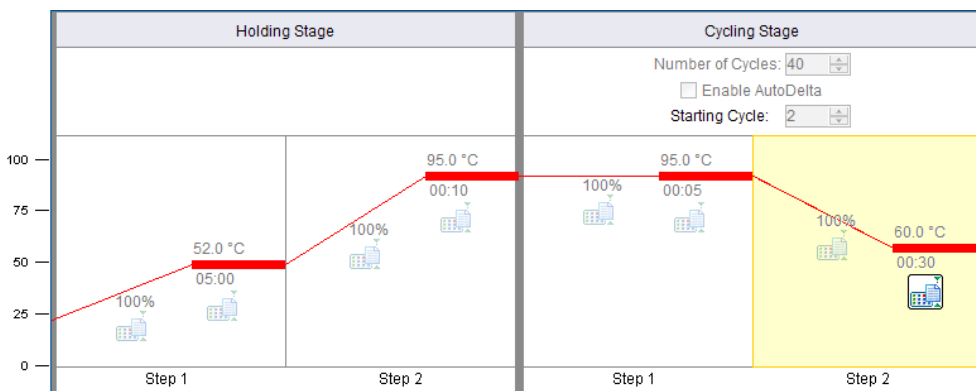
< 1 反応あたり >

試薬	使用量	使用量	最終濃度
One Step PrimeScript RT-qPCR Mix (2 ×)	10 μl	25 μl	1 ×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	1 μl	0.2 μM *1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	1 μl	0.2 μM *1
プローブ (10 μM)	0.4 μl	1 μl	0.2 μM *2
ROX Reference Dye or Dye II (50 ×) *6	0.4 μl	1 μl	
RNA サンプル *3	≤ 2 μl	≤ 5 μl	
RNase Free H ₂ O	X μl *4	X μl *4	
Total	20 μl	50 μl	

2. リアルタイム RT-qPCR 反応

反応チューブまたはプレートを軽くスピンドウンした後、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System にセットし、以下の条件で反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください (10 ページの < RT-qPCR 反応条件について > をご参照ください)。



Holding Stage : 逆転写反応

52 °C 5 分

95 °C 10 秒

Cycling Stage : PCR 反応

Number of Cycles : 40

95 °C 5 秒

60 °C 30 秒 *5

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。

解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

* 1 ~ 6 : 10 ページの < RT-qPCR 反応条件について > をご確認ください。

【LightCycler 96 System を用いる場合の操作方法】

1. 反応液の調整

下記に示す反応液を氷上で調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
One Step PrimeScript RT-qPCR Mix (2 ×)	10 μ l	1 ×
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M *1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M *1
プローブ (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M *2
RNA サンプル*3	\leq 2 μ l	
RNase Free H ₂ O	X μ l *4	
Total	20 μ l	

2. リアルタイム RT-qPCR 反応

反応チューブまたはプレートを軽くスピンドウンした後、LightCycler にセットし、以下の条件で反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください (10 ページの < RT-qPCR 反応条件について > をご参照ください)。

Preincubation

Cycle : 1

52°C 5 分

↓

95°C 10 秒

2 Step Amplification

Cycle : 40

95°C 5 秒

↓

60°C 30 秒 *5

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。
解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

*** 1 ~ 5 : 10 ページの < RT-qPCR 反応条件について > をご確認ください。**

【CFX96 real-time PCR detection system を用いる場合の操作方法】

1. 反応液の調製

下記に示す反応液を氷上で調製する。

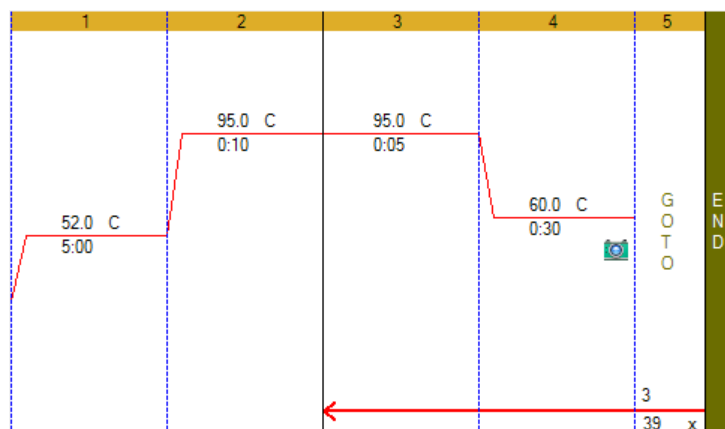
< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
One Step PrimeScript RT-qPCR Mix (2 ×)	10 μ l	1 ×
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M *1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M *1
プローブ (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M *2
RNA サンプル*3	\leq 2 μ l	
RNase Free H ₂ O	X μ l *4	
Total	20 μ l	

2. リアルタイム RT-qPCR 反応

反応チューブまたはプレートを軽くスピンドウンした後、CFX96 にセットし、反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください (10 ページの < RT-qPCR 反応条件について > をご参照ください)。



- 1, 2 : 逆転写反応
 52°C 5分
 95°C 10秒
- 3, 4, 5 : PCR 反応 (40 cycles)
 95°C 5秒
 60°C 30秒 *5
 GO TO 3, 39 cycles

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。
 解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

* 1 ~ 5 : 10 ページの < RT-qPCR 反応条件について > をご確認ください。

< RT-qPCR 反応条件について >

逆転写反応

ステップ	温度	時間	検出	コメント
逆転写	42～55℃	5分	OFF	ターゲットにより温度調整すると改善が見られる場合がある。
変性	95℃	10秒	OFF	逆転写酵素の熱失活を行うには、通常95℃ 10秒で充分である。

PCR 反応 30～45 サイクル

ステップ	温度	時間	検出	コメント
変性	95℃	3～5秒	OFF	リアルタイム PCR の増幅サイズは一般的に 300 bp 以下なので、95℃で3～5秒程度でよい。
アニーリング／伸長	56～64℃	20～30秒*5	ON	まずは取扱説明書に記載した各装置での推奨条件を試す。反応条件の至適化を行う場合には、56～64℃の範囲で検討する。反応性が悪いときは、このステップの時間を延ばすと改善する場合がある。

- * 1： 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1～1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。
- * 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る。プローブの添付データシート等を参考に添加量を検討する。Thermal Cycler Dice Real Time System の場合、通常、最終濃度 0.1～0.5 μM の範囲で検討する。
- * 3： RNA サンプルは反応液容量の 1/10 量以下で、10 pg～1 μg の範囲で使用する事が望ましい。目的の RNA 濃度が低い場合には反応液容量の 1/10 以上使用することも可能だが、RT-qPCR 反応に阻害が出る場合があるので注意する。
- * 4： 各装置の推奨容量に従って調整する。
- * 5： 使用装置によっては、検出ステップを 30 秒以内に設定できない場合がある。その場合、当該機種で設定可能な秒数を設定する (31 秒、34 秒など)。
- * 6： ROX Reference Dye の使用については下記表を参照。

ROX Reference Dye (50 ×)	ROX Reference Dye II (50 ×)
StepOne、StepOnePlus ABI 7300/7700/7900HT	ABI 7500、ABI 7500 Fast

ROX Reference Dye を使用しない機種
Takara Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ、CFX96、CFX384、Roche Lightcycler

VII. 実験例

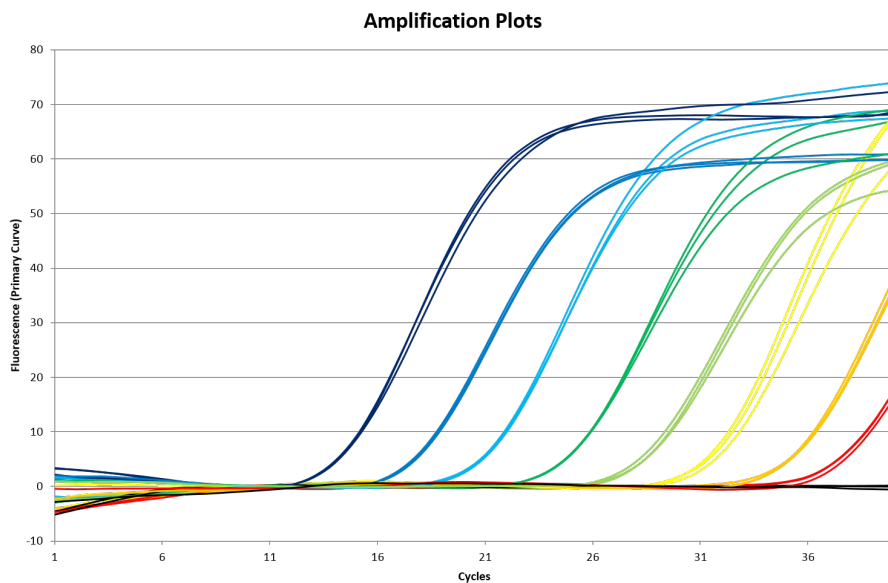
Human ACTB 遺伝子の発現解析における日差再現性 (Thermal Cycler Dice Real Time System III を使用)

1. 方法

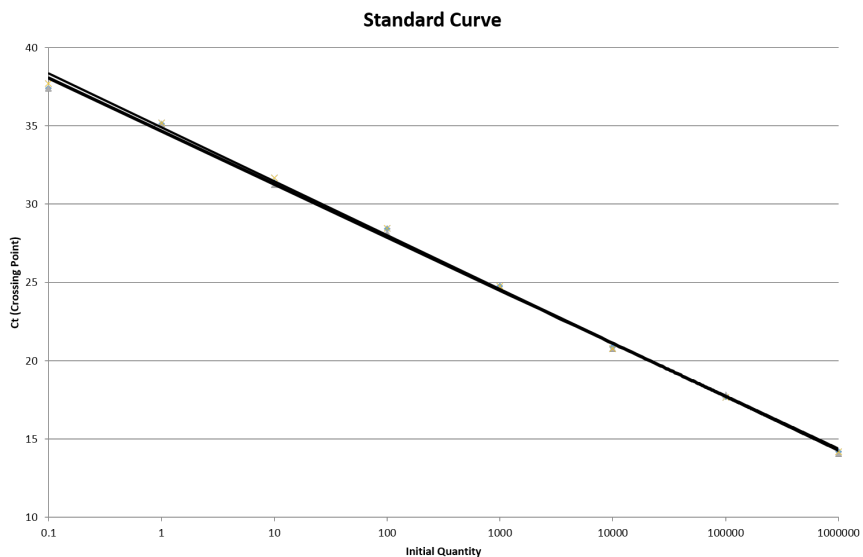
Human HeLa Cell Total RNA (製品コード 636543)、0.1 pg ~ 1 μg を鋳型として、1 ステップリアルタイム RT-qPCR 反応により、ACTB 遺伝子の発現解析を 3 日間に分けて行い、検量線を作成した。

2. 結果

増幅曲線



各検量線は以下のようになり、高い直線性 (Rsq: 1) と安定した増幅効率 (Eff. \geq 95.1%) を示した。



	検量線 1 日目	検量線 2 日目	検量線 3 日目
Rs _q	1	1	1
Eff.	96.7%	96.8%	95.1%

また検量線間の各 RNA 量における Ct 値の最大差は以下の表の通りであり、10 pg における 0.38 が最大であった。

サンプル RNA 量 (pg)	Log	検量線 1 日目	検量線 2 日目	検量線 3 日目	最大差
1,000,000	6	14.80	14.69	14.71	0.11
100,000	5	18.33	18.41	18.18	0.23
10,000	4	21.53	21.40	21.34	0.19
1,000	3	25.42	25.36	25.33	0.09
100	2	29.09	28.83	29.03	0.26
10	1	32.02	31.85	32.23	0.38
1	0	35.84	35.77	35.77	0.07
0.1	-1	38.12	38.15	38.29	0.17
0	-	ND	ND	ND	-

* ND=Not Detected

3. 結論

これらの結果より、One Step PrimeScript RT-qPCR Mix (2 ×) を使用して、10 の 7 乗 (total RNA 0.1 pg ~ 1 μg) という広範囲な鋳型サンプルの希釈系列において、高い日差再現性が得られることを確認した。

VIII. Appendix : RNA サンプルの調製について

本キットは RNA から cDNA 合成、PCR 増幅を行うキットです。cDNA 合成を成功させるためには、サンプルに含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

【器具】

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。

【溶液】

用いる溶液、滅菌精製水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

【RNA サンプルの調製法】

本製品は様々な反応阻害物質に対して高い抵抗性を示すため、多くの場合、簡易核酸抽出試薬による粗抽出 RNA サンプルからの検出が可能です。ただし、検出不能であった場合、あるいは、より精度の高い、安定した解析結果を必要とする場合は、純度の高い RNA サンプルを用いることをお勧めします。培養細胞や組織サンプルからの高純度 total RNA の調製には、スピニングタイプの NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) や AGPC 法の簡便化試薬である RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) が便利です。

IX. 関連製品

RNase-free Water (製品コード 9012)
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
NucleoSpin RNA Plus (製品コード 740984.10/.50/.250)
NucleoSpin RNA Virus (製品コード 740956.10/.50/.250)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)

X. 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、*Takara Taq* 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