

製品コード CY501

研究用

Takara

CycleavePCR™ Core Kit

説明書

v202204Da

CycleavePCR Core Kit 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その定量、1 塩基多型の検出などを正確かつ簡便に行うことができます。

I. 原理

CycleavePCR Core Kit 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。

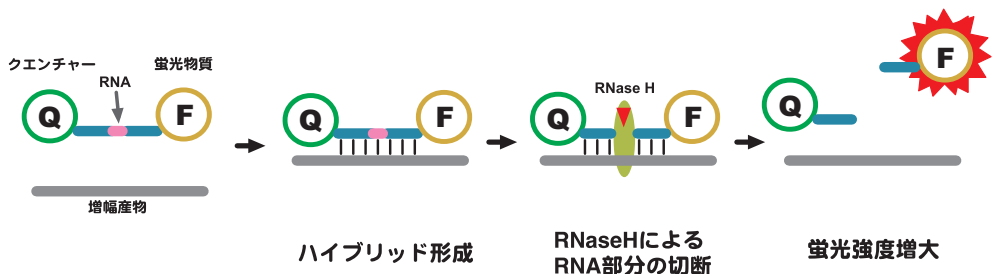
1. PCR

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 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の遺伝子断片を 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 部分で切断されると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。

プローブの RNA 部分もしくは RNA 部分の 1 塩基 5' 側の塩基がミスマッチの場合には RNase H による切断がおこらないことを利用して、1 塩基の違いを識別する特異性の高い検出が可能です。

II. 内容 (50 回反応分)

1. 10 × CycleavePCR Buffer		125 μl
2. dNTP Mixture	2.5 mM each	150 μl
3. Mg solution	25 mM	250 μl
4. <i>TaKaRa Ex Taq</i> HS	5 U/μl	12.5 μl
5. Tli RNaseH II	200 U/μl	25 μl
6. Positive Control	10 ⁴ copies/μl *1	10 μl
7. Positive Control primer mix	10 μM each	10 μl
8. Positive Control probe (FAM) *2	25 ×	10 μl
9. dH ₂ O		700 μl

* 1 : Positive Control はプラスミドであり、コピー数は、OD₂₆₀ から換算した便宜上の指標であって必ずしも実際の分子数を表しているわけではありません。

* 2 : 蛍光標識プローブにつき遮光に留意してください。

キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

- リアルタイム PCR 装置 (authorized instruments)
Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960 : 終売)
Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980)
Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
Smart Cycler II System (Cepheid 社) 他
- Thermal Cycler Dice Real Time 用プレート (製品コード NJ401、NJ904 など)
Smart Cycler 反応チューブ (製品コード SC910A/C) 他
- PCR 用プライマー*3
- サイクリングプローブ*3
- 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)

* 3 : プライマーおよびサイクリングプローブの設計方法は、「VIII. プライマー・プローブの設計について」をご参照ください。プライマーおよびサイクリングプローブのカスタム設計・合成サービスをご案内しています。また、SNPs 解析を行う場合は、SNP 検出用 (1 塩基置換) 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)」をご利用ください。

III. 保存 - 20°C

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、迅速かつ正確に PCR 反応の結果を知ることが可能です。1 塩基の違いを識別する SNP 解析のための検出系を構築することも可能です。
- PCR には、Hot Start 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を用いています。リアルタイム PCR 用に最適化されているため、増幅効率が良く、高感度な検出ができます。

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. 反応液は、Master Mix (dH₂O、Buffer、酵素等の混液) を数回～10回分程度をまとめて調製すると便利です。Master Mix を作ることにより、ピペッティングによるロスや、試薬の分注、攪拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。
2. *TaKaRa Ex Taq HS*、*Tli RNaseH II* 等、酵素類の攪拌は泡立て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。酵素類は50%グリセロール溶液で粘度が高いため、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。
3. 酵素類は使用前まで-20℃で保存し、使用後は直ちに-20℃に保存してください。
4. 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

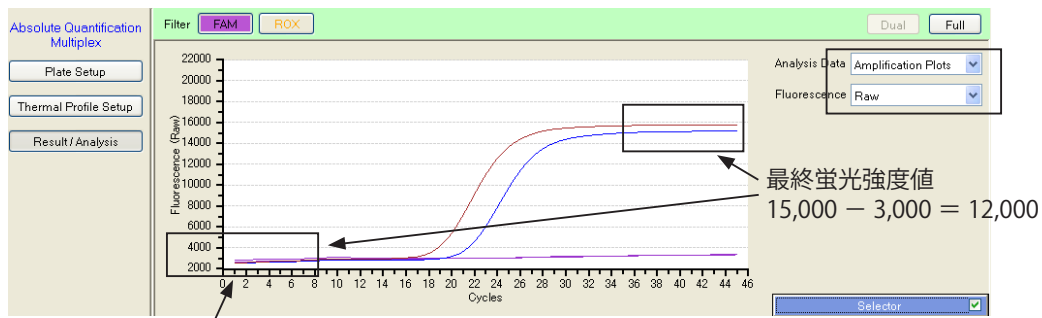
【Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズおよび Applied Biosystems の装置を用いる場合の操作方法】

1. 下記に示す PCR 反応液を氷上で調製する。
以下のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、24 μ l ずつ反応チューブに分注する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度 [または反応系に加える量]
10 × CycleavePCR Buffer	2.5 μ l	1 ×
dNTP Mixture (2.5 mM each)	3 μ l	0.3 mM
Mg solution (25 mM)	5 μ l	5 mM
PCR Forward Primer (20 μ M)	0.25 μ l	5 pmol
PCR Reverse Primer (20 μ M)	0.25 μ l	5 pmol
サイクリングプローブ (5 μ M) *1	1 μ l	
<i>Tli RNase H II</i> (200 U/ μ l)	0.5 μ l	100 U
<i>TaKaRa Ex Taq HS</i> (5 U/ μ l)	0.25 μ l	1.25 U
dH ₂ O	11.25 μ l	
Total	24 μ l	

* 1 : サイクリングプローブは、通常、1 反応あたり 5 pmol 使用しますが、使用量はシグナル強度に応じて加減してください。Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売) では、Result/Analysis Data を Amplification Plots に設定し、Fluorescence を Raw にしたときバックグラウンド (ベースラインの蛍光シグナル強度) が 10,000 以下であり、最終蛍光強度がベースラインより、5,000 以上 30,000 以下程度のシグナル強度となるように調整して使用します。



ベースラインが 10,000 以下

2. 反応液を分注した反応チューブに template を 1 μ l 添加する。
1 μ l 以上の量の template を添加することもできます。その場合には添加量に応じて dH₂O の量を調整してください。
3. 反応チューブを遠心機で軽く遠心後、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始する。反応条件は、次の表を目安に設定する。

ステップ	温度	時間	検出	コメント
初期変性	95°C	10 ~ 30 秒	OFF	鋳型がゲノム DNA の場合は 30 秒程度、場合により 1 分程度の熱変性が必要 (1 分を超える変性条件では反応が安定しない場合がある)。500 bp 以下の鋳型では初期変性の必要がない場合がある。
変性	95°C	5 秒	OFF	リアルタイム PCR のターゲットの増幅サイズは一般的に 500 bp 以下なので、95°C で 3 ~ 10 秒程度でよい。
アニーリング	55°C	10 ~ 20 秒	OFF	非特異的産物が生じる場合や増幅効率が悪い場合は、アニーリング温度の至適化により改善する場合がある。アニーリング時間を長くすると、増幅効率が良くなる場合がある。
伸長*2	72°C	30 秒	ON	増幅サイズが 100 bp 前後の場合、30 秒で十分である。
サイクル数	30 ~ 50 cycles			

* 2 : Applied Biosystems の装置の場合

- 本製品には、ROX Reference Dye が含まれていません。
<<Passive Reference >> を none と設定してください。
- Eclipse など非蛍光クエンチャーを用いる場合、プローブ検出の設定でクエンチャーを none と設定してください。
- 伸長反応ステップで蛍光検出を行います。Applied Biosystems の装置は機種により、蛍光検出に必要な時間が異なります。7300 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定してください。
装置の設定につきましては、各装置の取扱説明書に従ってください。

4. 反応終了後、増幅曲線を確認し、解析を行う。
Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売) での解析方法は、機器に添付されている取扱説明書をご参照ください。

【 Smart Cycler II System を用いる場合の操作方法 】

1. 下記に示す PCR 反応液を氷上で調製する。
以下のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、24 μ l ずつ Smart Cycler 用チューブに分注する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度 [または反応系に加える量]
10 × CycleavePCR Buffer	2.5 μ l	1 ×
dNTP Mixture (2.5 mM each)	3 μ l	0.3 mM
Mg solution (25 mM)	5 μ l	5 mM
PCR Forward Primer (20 μ M)	0.25 μ l	5 pmol
PCR Reverse Primer (20 μ M)	0.25 μ l	5 pmol
サイクリングプローブ (5 μ M) *1	1 μ l	
Tli RNase H II (200 U/ μ l)	0.5 μ l	100 U
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ l)	0.25 μ l	1.25 U
dH ₂ O	11.25 μ l	
Total	24 μ l	

* 1 : サイクリングプローブは、通常、1 反応あたり 5 pmol 使用しますが、使用量はシグナル強度に応じて加減してください。Smart Cycler では、蛍光強度が 300 ~ 500 程度になるように調整して使用します。

2. 反応液を分注した Smart Cycler 用チューブに template を 1 μ l 添加する。
1 μ l 以上の量の template を添加することもできます。その場合には添加量に応じて dH₂O の量を調整してください。
3. 反応チューブを Smart Cycler 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler にセットし、反応を開始する。反応条件は、次の表を目安に設定する。

ステップ	温度	時間	検出	コメント
初期変性	95°C	10 ~ 30 秒	OFF	鋳型がゲノム DNA の場合は 30 秒程度、場合により 1 分程度の熱変性が必要 (1 分を超える変性条件では反応が安定しない場合がある)。500 bp 以下の鋳型では初期変性の必要がない場合がある。
変性	95°C	5 秒	OFF	リアルタイム PCR のターゲットの増幅サイズは一般的に 500 bp 以下なので、95°C で 3 ~ 10 秒程度でよい。
アニーリング	55°C	10 ~ 20 秒	OFF	非特異的産物が生じる場合や増幅効率が悪い場合は、アニーリング温度の至適化により改善する場合がある。アニーリング時間を長くすると、増幅効率が良くなる場合がある。
伸長	72°C	10 ~ 15 秒	ON	増幅サイズが 100 bp 前後の場合、10 ~ 15 秒で十分である。それより長い場合は、100 bp あたり 5 秒程度時間を伸ばす。
サイクル数	30 ~ 50 cycles			Smart Cycler では、増幅産物を検出した時点で反応を終了する機能がある。この機能を利用すれば、より迅速な解析が可能である。*2

* 2 : Smart Cycler Software Version 2.0 で使用できる機能です。

4. 反応終了後、増幅曲線を確認し、解析を行う。
Smart Cycler での解析方法は、Smart Cycler 取扱説明書と以下の実験例をご参照ください。

VII. 実験例

Positive Control による CycleavePCR 反応の確認 (Smart Cycler II 使用)

本製品に添付されている Positive Control で実験操作の確認を行うことができます。

1. PCR 反応

Positive Control primer mix と Positive Control probe 各 1 μ l を用い、「VI. 操作」に記載されている方法に従って反応液を調製する。

試薬	使用量
10 × CycleavePCR Buffer	2.5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	3 μ l
Mg solution (25 mM)	5 μ l
Positive Control primer mix	1 μ l
Positive Control probe	1 μ l
Tli RNase H II (200 U/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ l)	0.25 μ l
Positive Control	1 μ l
dH ₂ O	10.75 μ l
Total	25 μ l

2. 反応条件は、下図のように設定する。

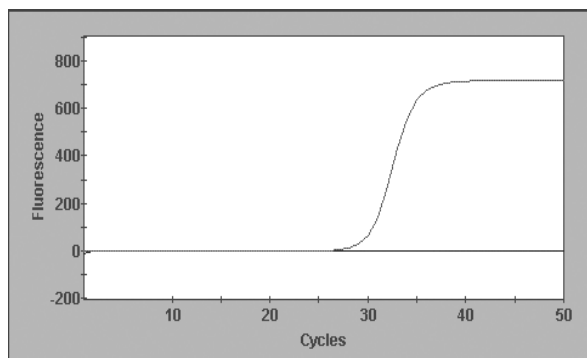
The screenshot displays the software interface for setting PCR stages. Stage 1 is configured with a 'Repeat' of 50 times and a '3-Temperature Cycle'. The cycle parameters are as follows:

Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
NA	95.0	5	Off
NA	55.0	10	Off
NA	72.0	10	On

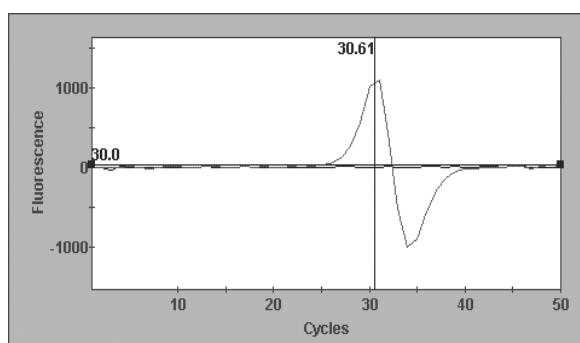
Below the table, there is a checkbox labeled 'Advance to Next Stage' which is currently unchecked. Stage 2 is currently set to 'Unused'.

3. Positive Control 反応例

Positive Control を用いた反応では、下図のような結果が得られる。



増幅曲線



2nd derivative

VIII. プライマー・プローブ設計について

1. SNPs 解析用プライマー・サイクリングプローブの設計について

タカラバイオウェブサイトで公開している【CycleavePCR Assay Designer (SNPs)】をご利用ください。

CycleavePCR用のプライマー・サイクリングプローブの設計には、いくつかの条件があります。【CycleavePCR Assay Designer (SNPs)】には設計のノウハウを反映させたプログラムが搭載されており、目的遺伝子の塩基配列、検出対象塩基を指定するだけで、プライマー、プローブ候補を最大3種類設計し、配列、Tm値、増幅サイズ等の情報を開示します。配列確認後はそのままシームレスに注文が可能です。

<注意>

- ・ 目的遺伝子の配列によっては設計できない場合があります。
- ・ 候補として提示されるプライマー・プローブは実験的な確認を行ったものではありませんので、反応性や特異性を保証するものではないことをご了承ください。

2. 発現解析用プライマー・サイクリングプローブの設計について

タカラバイオウェブサイトで公開している【CycleavePCR Assay Designer】をご利用ください。

【CycleavePCR Assay Designer】は、お持ちのプライマー増幅領域内に CycleavePCR法に適したプローブを設計・オンライン注文するためのシステムです。

目的遺伝子の塩基配列、プライマー配列を指定するだけで、プローブ候補を最大10種類設計し、配列、Tm値等の情報を開示します。配列確認後はそのままシームレスに注文が可能です。

<注意>

候補として提示されるプローブは実験的な確認を行ったものではありませんので、反応性や特異性を保証するものではないことをご了承ください。

IX. 参考文献

- 1) 山本純子, 向井博之 蛋白質・核酸・酵素 (1999) **44**: 189-193.
- 2) 川上文清, 石田由和 細胞工学別冊「PCR Tips」(1997) 94-99.
- 3) F. Bekkaoui, *et al.* *BioTechniques*. (1996) **20**: 240-248.

X. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980)
CycleavePCR™ Reaction Mix (製品コード CY505A/B)
Probe qPCR Mix (製品コード RR391A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)

XI. 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*、TB Green はタカラバイオ株式会社の登録商標です。CycleavePCR、*Premix Ex 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