

製品コード RC805S
RC805A

研究用

Takara

One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Non-treatment)

説明書

One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Non-treatment) は、検体中の RNA ウイルス等をプローブ法 (5'-ヌクレアーゼ法) により対象核酸を検出するための 1 ステップリアルタイム RT-PCR 試薬です。本製品は、ウイルスや細菌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。

【特長】

- ・ 検体*を反応液に直接添加可能
反応液中にて、核酸抽出と逆転写反応、qPCR を連続的に行えます。
- ・ 検体に含まれる RNase 活性を抑制
核酸抽出ステップ後の RNA 分解を大幅に軽減させたことで、安定した PCR 増幅が可能です。
- ・ 高温での逆転写反応 (55 ~ 65°C)
核酸抽出から逆転写反応が温度低下なく連続的に行われるため、複雑な高次構造を持つ RNA ウイルス等の検出においても威力を発揮します。
- ・ PCR 産物のキャリーオーバー対策
Uracil-N-Glycosylase (UNG) が含まれており、PCR 増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性を防止できます。

*：本製品で推奨される検体種は「V. 操作> 1. 推奨検体種の例」をご参照ください。

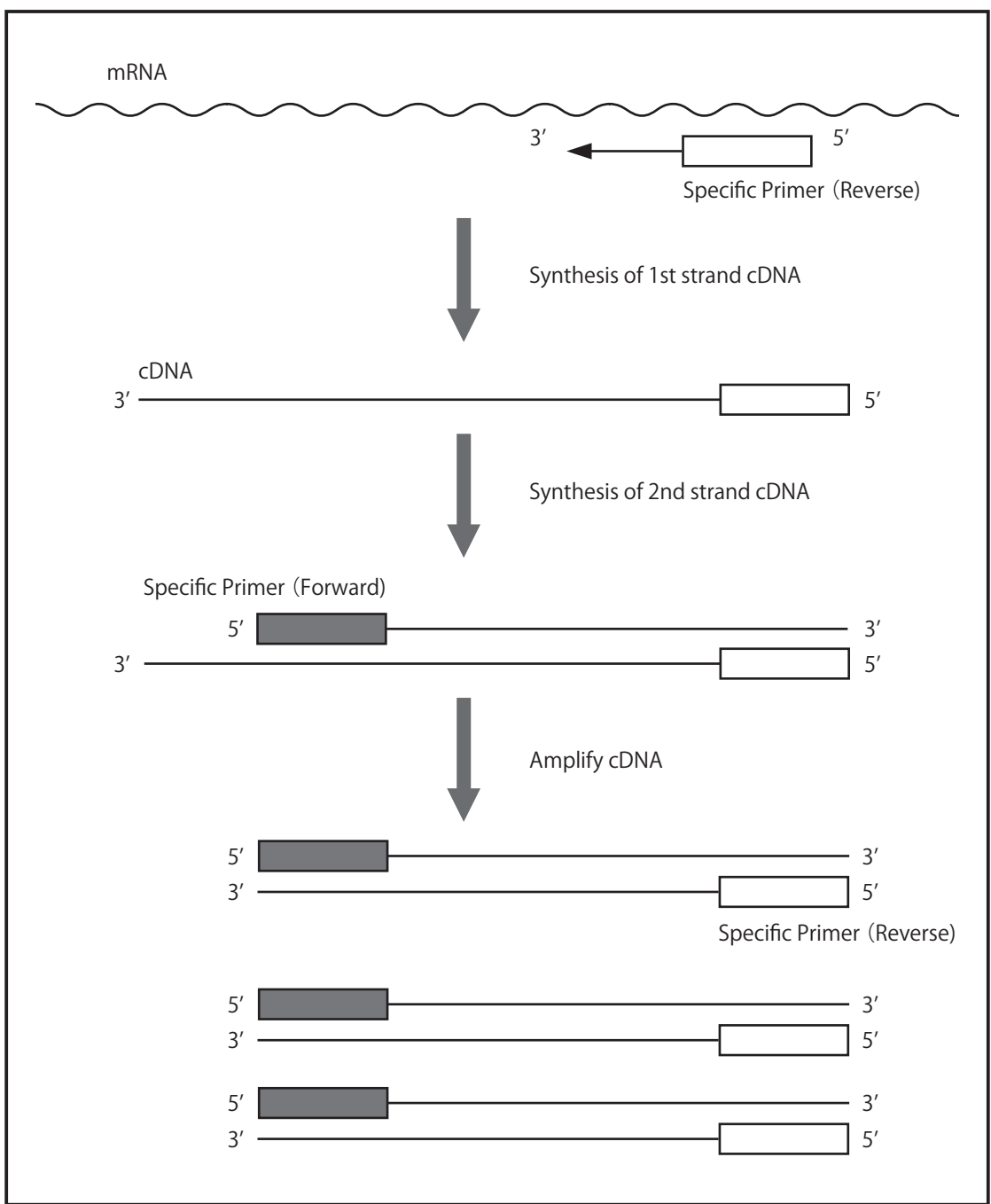
※「Easy Direct シリーズ」は、「Non-treatment」タイプ以外に「Non-heat-treatment」「Heat-treatment」タイプがあります。詳細は弊社ウェブカタログをご覧ください。

I. 原理

One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Non-treatment) では、検体からの核酸抽出と RNase の抑制、逆転写反応からの cDNA 合成と 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。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 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。

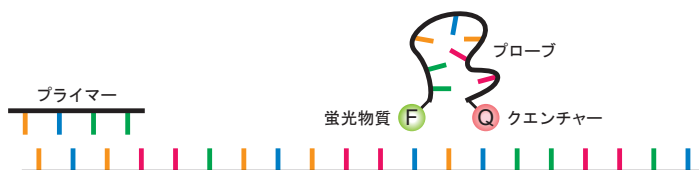


One Step RT-PCR 法の原理

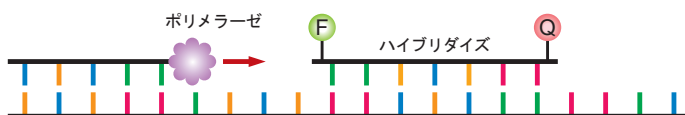
2. 蛍光検出

本製品では、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、BHQ-1 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、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。

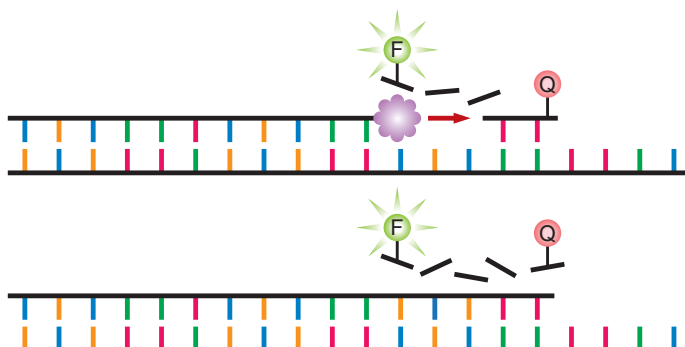
1) 熱変性



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



3. 検体中に含まれる RNase の抑制

検体中に RNase が含まれる場合、核酸の熱抽出から cDNA 合成までのステップにおいて、抽出された RNA が RNase に晒されることで RNA が分解され、検出感度が低下することがあります。本製品では、RNase を核酸の熱抽出ステップにおいて不活化させる機序を組み込むことで、核酸抽出と露出した RNA の保護を両立させました。

II. 内容 [50 回 (RC805S) / 200 回 (RC805A)、25 μ l 反応系]

	製品コード RC805S	RC805A
● 1-Easy Direct RT-qPCR Mix 2 w/UNG (2 \times conc.)	625 μ l	835 μ l \times 3
○ RNase Free H ₂ O	1 ml	1 ml \times 3
● ROX Reference Dye (50 \times conc.) *	25 μ l	100 μ l
● ROX Reference Dye II (50 \times conc.) *	25 μ l	100 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機種を使用する場合に最終濃度 1 \times で添加してください。

本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

- リアルタイム PCR 装置 (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)
 - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
 - QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block) (Thermo Fisher Scientific 社)
 - Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
 - LightCycler 96 System (Roche Diagnostics 社)
 - LightCycler 480 System (Roche Diagnostics 社)
 - CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
 - CFX96 Touch Deep Well 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)
- マイクロピペットおよびチップ

III. 保存 - 20°C

IV. 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. 試薬は使用前に室温で融解させ、泡立えないよう穏やかに転倒混合して均一に混合した後、軽くスピンドウンしてからご使用ください。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、保存中に沈殿を生じた場合には、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。
2. 使用中、試薬は氷上に置いてください。使用後は速やかに -20°C 保管してください。
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防止してください。
4. 本製品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。
5. RNA を取り扱う際には、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。

V. 操作

1. 推奨検体種の例

本製品による検出に対応する検体種の一例を示します。

検体種	適否
便懸濁液、培養液、鼻腔／鼻咽頭ぬぐい液	○
唾液*1、喀痰*1	○
臓器乳剤*2,3	○
血清*3	○
全血*4	△

*1：粘性が高くマイクロピペットでの吸引が難しい場合は、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)または生理食塩水等で懸濁(希釈)した上清を使用してください。スプタザイム等の蛋白質分解酵素による処理を行った検体は本製品では使用できません。当該処理を行った検体については、One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Heat-treatment) (製品コード RC803S/A) をご利用ください。

*2：培養液、PBS または生理食塩水等で調製した乳剤の遠心上清を使用してください。

*3：新鮮かつ着色の少ない検体を使用してください。溶血または濁りが強い検体は、One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Heat-treatment) をご利用ください。

*4：色素の影響で蛍光検出が阻害されます。全血を使用する場合は、反応液への持ち込み量が $\sim 0.1 \mu\text{l}$ となるよう、あらかじめ滅菌精製水等で希釈した検体をお使いください (e.g., 全血を 20 倍希釈して反応液へ $2.0 \mu\text{l}$ 添加)。

※ 検体の性状によっては、本製品での検出が難しい場合があります。その場合は、検出原理の異なる One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Heat-treatment) や One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Non-heat-treatment) (製品コード RC801S/A) をお試しください。

2. 反応液の調製

下記に示す反応液を調製する。

【ROX Reference Dye の添加の必要がない機種を用いる場合】*5

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
● 1-Easy Direct RT-qPCR Mix 2 w/UNG	12.5 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*6
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*6
Probe (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*7
検体	2.0 μ l*8	
○ RNase Free H ₂ O	9.0 μ l	
Total	25 μ l*9	

【ROX Reference Dye の添加の必要がある機種を用いる場合】*5

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
● 1-Easy Direct RT-qPCR Mix 2 w/UNG	12.5 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*6
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*6
Probe (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*7
● ROX Reference Dye or ● Dye II (50 \times)*9	0.5 μ l	1 \times
検体	2.0 μ l*8	
○ RNase Free H ₂ O	8.5 μ l	
Total	25 μ l*9	

* 5 : ROX Reference Dye の添加については下記をご参照ください。

◆ ROX Reference Dye を添加しない機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ (製品コード TP1000/TP950 等)
- CronoSTAR 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
- LightCycler シリーズ (Roche Diagnostics 社)
- CFX シリーズ (Bio-Rad 社)

◆ ROX Reference Dye (50 \times) を添加する機種

ROX Reference Dye を添加

- Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

ROX Reference Dye II を添加

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block) (Thermo Fisher Scientific 社)

* 6 : 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。

* 7 : 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データシートを参考に添加量を検討してください。Thermal Cycler Dice Real Time System の場合、通常、最終濃度 0.1 ~ 0.5 μ M の範囲で検討してください。

* 8 : 持ち込み量を上げることで感度向上を図ることも可能ですが、検体による阻害性の増加に注意してください。

* 9 : 各機種の推奨容量に従って調整してください。

3. リアルタイム RT-qPCR 反応

※ 各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1) 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、リアルタイム PCR 装置にセットし、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（次頁の【RT-qPCR 反応条件について】をご参照ください）。

<逆転写反応>

(37°C 10分)*10

90°C 3分*11

60°C 5分

<PCR: 45 サイクル>

95°C 5秒

60°C 30秒 (蛍光検出)*12

* 10: PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、37°C 10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。コンタミネーションがない場合は、特に 37°C 10分のステップを入れる必要はありません。

* 11: このステップは酵素の活性化に必須なので、必ず実施してください。なお、鋳型として粗抽出液や精製核酸を用いる場合には、95°C 30秒に変更してください。

* 12: 機種によっては、検出ステップを 30 秒以内に設定できない場合があります。その場合、当該機種で設定可能な秒数を設定してください (31 秒、34 秒など)。

2) 反応終了後、増幅曲線を確認する。

※ 解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

【 RT-qPCR 反応条件について 】

核酸熱抽出・変性

ステップ	温度	時間	検出	コメント
熱抽出・変性	90℃	3分	OFF	検体等から直接ターゲットの核酸を抽出する場合。
	95℃	30秒	OFF	粗抽出あるいは核酸精製済みの検体を使用する場合。

逆転写反応

ステップ	温度	時間	検出	コメント
逆転写	55～65℃	2～5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。ターゲットによっては時間短縮も可能な場合がある。

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	95～98℃	3～5秒	OFF	機種およびターゲットにより最適な変性温度が異なる。95℃で反応性が悪い時は、96～98℃の範囲で検討する。リアルタイム PCR の増幅サイズが一般的に 300 bp 以下なので、時間は 3～5 秒程度でよい。
アニーリング／伸長	55～65℃	15～60秒	ON	至適化を行う場合には、55～65℃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 (>30 秒) と改善する場合がある。ターゲットによっては時間短縮も可能な場合がある。

VI. 関連製品

One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Non-heat-treatment) (製品コード RC801S/A)
One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Heat-treatment) (製品コード RC803S/A)
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)

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 はタカラバイオ株式会社の登録商標です。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