

製品コード RC807S
RC807A

研究用

TAKARA

One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Heat-treatment) Ver.2

説明書

One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Heat-treatment) Ver.2 は、検体中の RNA ウイルス等から核酸の簡易抽出を行う前処理液、およびプローブ法 (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。

【特徴】

- 核酸精製不要
検体*と Easy Direct Solution を混合し、熱処理を行うだけで核酸の簡易抽出が可能です。
- PCR 阻害に強い RT-qPCR Mix
さまざまな PCR 阻害物質による影響を軽減し、安定した PCR 増幅を実現します。
- 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。

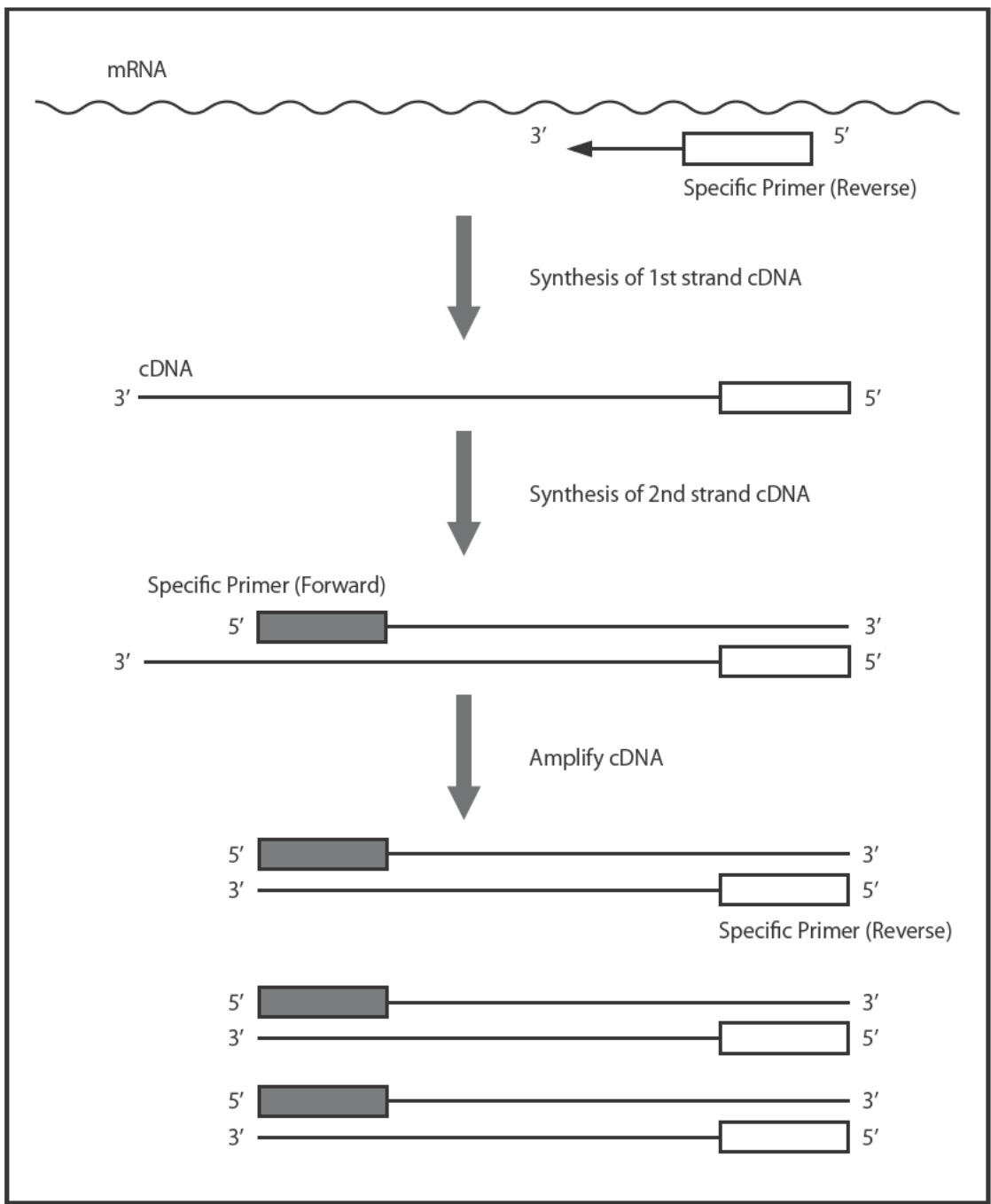
※「Easy Direct シリーズ」は、「Heat-treatment」タイプ以外に「Non-heat-treatment」「Non-treatment」タイプがあります。詳細は弊社ウェブカタログをご覧ください。

I. 原理

One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Heat-treatment) Ver.2 では、Easy Direct Solution と検体を混合し、熱処理を行うことで前処理（核酸の簡易抽出）を行います。その後、前処理済み検体をリアルタイム RT-PCR 反応液に直接添加し、逆転写反応による 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が、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

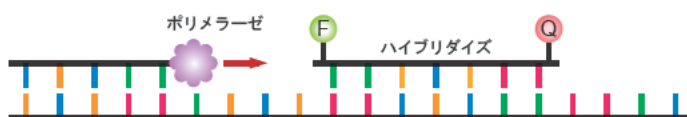
2. 蛍光検出

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。

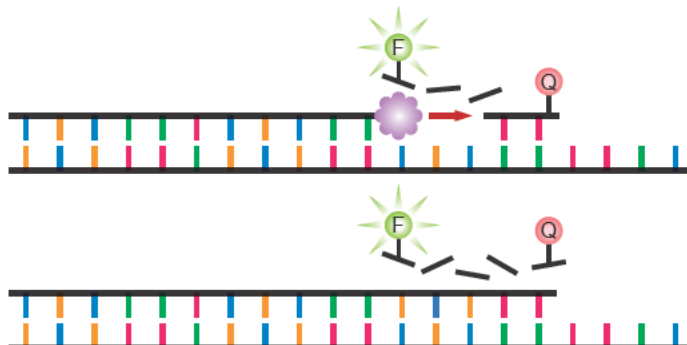
1) 熱変性



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



II. 内容 [50 回 (RC807S) / 200 回 (RC807A)、25 μ l 反応系]

One Step Easy Direct RT-qPCR Kit (Heat-treatment) (製品コード RC803S/RC803A)

	製品コード RC803S	RC803A
● Easy Direct Solution *1	250 μ l	1 ml
● 1-Easy Direct RT-qPCR Mix 1 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.) *2	25 μ l	100 μ l
● ROX Reference Dye II (50 \times conc.) *2	25 μ l	100 μ l

Heat-treatment Buffer for blood (製品コード RC810S/RC810A)

	製品コード RC810S	RC810A
Heat-treatment Buffer for blood	1 ml	1 ml \times 4

* 1：特許出願中です (2024 年 11 月末時点)。

* 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 (Thermo Fisher Scientific 社)
 - Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR System (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)
 - Rotor-Gene Q (QIAGEN 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、Heat-treatment Buffer for blood に沈殿を生じている場合には、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溶解します。1-Easy Direct RT-qPCR Mix 1 w/UNG は保存中に白濁を認めることがありますが、問題なくご使用いただけます。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。
2. 使用中の試薬は以下の通り取り扱ってください。なお、使用後は速やかに-20℃に保管してください。
 - Heat-treatment Buffer for blood 以外の試薬
氷上に置いてください。
 - Heat-treatment Buffer for blood
低温で析出するため、氷上ではなく室温に置いてください。沈殿物が溶解し、溶液が透明になっていることを確認してください。
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	○
血清*3	○
全血*3	○

- * 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、または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を使用してください。
- * 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検体としてください。溶血または濁りが強い検体は、「2. 前処理」の【血清・全血検体の前処理方法について】（次頁）により前処理を実施してください。
- * 3：血清または全血を使用する場合は、「2. 前処理」の【血清・全血検体の前処理方法について】（次頁）をご参照ください。

2. 前処理

- 1) 検体と ● Easy Direct Solution を以下の容量または 9：1 で混合する。ピペッティングまたはタッピングで混合した後、軽くスピンドウンする。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
検体	18 μ l
● Easy Direct Solution	2 μ l
Total	20 μ l

- 2) リアルタイム PCR 装置またはサーマルサイクラーにて以下の熱処理を行う。

95°C 5 分 (→ 4 ~ 10°C*4)

- * 4：熱処理後は、速やかにリアルタイム RT-PCR 反応液に添加し、反応を開始してください。前処理済みの溶液を一時保存する場合は、氷上または 4°C で保存してください。

【血清・全血検体の前処理方法について】

[1] 前処理試薬と検体の混合

- (1) PCR用チューブ*5に● Easy Direct Solutionを2 μ l、Heat-treatment Buffer for bloodを18 μ l添加する。または、あらかじめ別の1.5 mlチューブ等に必要数+ α 分の● Easy Direct SolutionとHeat-treatment Buffer for bloodをまとめて調製(用時調製)し、よく混合後、PCR用チューブに20 μ lずつ分注する。
- (2) (1)のPCR用チューブに検体を20 μ l添加し、速やかに15回以上ピペティングして十分混合する。混合時に泡立たないように注意すること。*6
- (3) 軽くスピンドウンする。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
● Easy Direct Solution	2 μ l
Heat-treatment Buffer for blood	18 μ l
検体	20 μ l
Total	40 μ l

※ 検体は必ず最後に添加してください。検体に● Easy Direct Solution原液を添加するとゲル化することがあります。

- * 5 : 熱処理に用いるリアルタイムPCR装置またはサーマルサイクラーに適合するチューブをご使用ください。形が適合していないと、熱処理時の温度不足により前処理が失敗することがあります(<前処理失敗例(全血)>および<前処理失敗例(血清)>参照)。
- * 6 : タッピングやボルテックスで混合すると、スピンドウン後もチューブ壁面に検体が付着したままとなり、熱処理後に上清が取りにくくなる場合があります。また、検体を添加する際にはチップをチューブの底付近に密着させ、ゆっくりとピペティングすることで泡立てずに混和することができます。

[2] リアルタイムPCR装置またはサーマルサイクラーにて以下の熱処理を行う。

- (1) ブロック温度を98℃まで上昇させ、保温状態にする。*7
 - (2) 混合液の入ったPCR用チューブをセットし、98℃3分間の熱処理を行う。
 - (3) 熱処理後、温度を40℃以下に下げってからPCR用チューブを取り出す。*8
- * 7 : 急速に加熱することが重要です。50~90℃で長く保持すると、前処理が失敗することがあります(<前処理失敗例(全血)>および<前処理失敗例(血清)>参照)。ブロックを98℃の保温状態にしておくことができない場合は、昇温速度が約2℃/秒以上の装置を使用してください。
 - * 8 : 98℃の熱処理完了直後にチューブを取り出すとチューブのフタが勢いよく開き、内容物が飛び出すことがあります。飛散リスクを防止するため、この工程を実施ください。

- [3] 卓上遠心機 ($\geq 1,200 \times g$ 、簡易型の卓上遠心機でも良い) にて2分間遠心する。遠心後、沈殿成分と透明な液体上清に分離していることを確認し*⁹、使用するまで氷上で静置する*¹⁰。

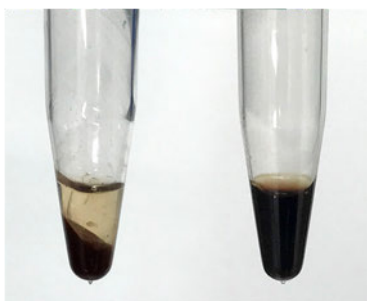
* 9：全血検体は下記の<前処理成功例(全血)>の写真のように、上清に若干色味(黄または赤色)が残っていても、透明感があれば検査に支障はありません。<前処理失敗例(全血)>の写真のように、全体が固形化して上清が分取できない場合や上清が黒色で透明感がない場合は、熱処理時の加熱不足等の原因が考えられます。血清検体は、<前処理失敗例(血清)>の写真のように、固形成分が十分に沈殿せず上清の透明度が低い場合は、熱処理時の加熱不足等の原因が考えられます。

左：<前処理成功例(全血)>

沈殿成分と透明な液体上清に分離

右：<前処理失敗例(全血)>

全体が固形化し上清の回収が困難な事例、上清の透明度が低い事例

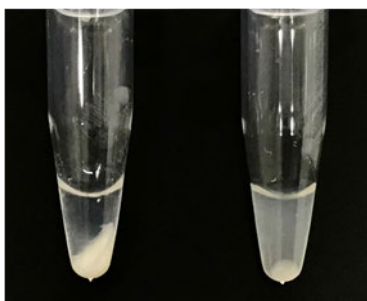


左：<前処理成功例(血清)>

沈殿成分と透明な液体上清に分離

右：<前処理失敗例(血清)>

固形成分が十分に沈殿せず上清の透明度が低い事例



* 10：長時間静置すると、沈殿成分が液体上清に溶け出し、濁りが発生することがあります。遠心後は長時間の静置を避け、リアルタイム PCR 反応に進んでください。

[4] 沈殿成分を分取しないよう注意し、上清 2 μ l をリアルタイム RT-PCR の鑄型として使用する。*11

* 11：遠心操作後に上清が少ない場合には、以下の方法をお試しください。

- 遠心力や遠心時間を変更する。
(e.g., 10,000 $\times g$ 、5 分)
- ● Easy Direct Solution：Heat-treatment Buffer for blood：検体の混合比を 1：9：10 のまま、全体の量を増やす。
(e.g., ● Easy Direct Solution 2.5 μ l + Heat-treatment Buffer for blood 22.5 μ l + 検体 25 μ l)

(注意) 検体や検出系の性質等により、まれに Heat-treatment Buffer for blood がリアルタイム PCR 反応に持ち込まれることで阻害が生じる可能性があります。阻害が認められる場合、まずは以下の A の方法をお試しください。検体中の鑄型量が少ない場合は B をお試しください。

A. 遠心後の上清を分取し、生理食塩水で希釈したものをリアルタイム RT-PCR の鑄型として使用する。

e.g.,

- (1) 上清 10 μ l を分取し、生理食塩水 10 μ l と混合する。
- (2) 2 μ l をリアルタイム RT-PCR の鑄型として使用する。

B. Heat-treatment Buffer for blood を、生理食塩水で希釈して前処理を行う。

e.g., < 1 反応あたり >

試薬	使用量
● Easy Direct Solution	2 μ l
Heat-treatment Buffer for blood	9 μ l
生理食塩水	9 μ l
検体	20 μ l
Total	40 μ l

3. 反応液の調製

下記に示す反応液を室温で調製する。

【ROX Reference Dye の添加の必要がない機種を用いる場合】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
● 1-Easy Direct RT-qPCR Mix 1 w/UNG	12.5 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*12
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*12
Probe (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*13
前処理済み検体	2.0 μ l	
○ RNase Free H ₂ O	9.0 μ l	
Total	25 μ l*14	

◆ ROX Reference Dye の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 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)
- Rotor-Gene Q (QIAGEN 社)

【ROX Reference Dye の添加の必要がある機種を用いる場合】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
● 1-Easy Direct RT-qPCR Mix 1 w/UNG	12.5 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*12
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*12
Probe (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*13
● ROX Reference Dye or ● Dye II (50 \times)	0.5 μ l	1 \times
前処理済み検体	2.0 μ l	
○ RNase Free H ₂ O	8.5 μ l	
Total	25 μ l*14	

◆ 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
- Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR System (ともに Thermo Fisher Scientific 社)

* 12: 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。

* 13: 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。

* 14: 各機種の推奨容量に従って調整してください。

4. 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（下記の【RT-qPCR 反応条件について】をご参照ください）。

<逆転写反応>

(25℃ 10分)*15

52℃ 5分

95℃ 10秒

<PCR: 45 サイクル>

95℃ 5秒

60℃ 30秒 (蛍光検出)*16

- 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】

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℃	20～60秒*16	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。

* 15：PCR 産物によるコンタミネーションが疑われる場合には、25℃ 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想定されない場合は、特に 25℃ 10 分のステップを入れる必要はありません。

* 16：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）。

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 (Non-treatment) (製品コード RC805S/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