

製品コード RR390A

研究用

TAKARA

Premix Ex Taq™
(Probe qPCR)

説明書

v202201Da

Premix Ex Taq (Probe qPCR) は、プローブ検出 (5'-ヌクレアーゼ法) によるリアルタイム PCR (qPCR) 専用の試薬です。2 × 濃度のプレミックスタイプ試薬のため、反応液の調製が簡単で、さらに耐熱性 RNase H である Tli RNaseH があらかじめ 2 × プレミックス試薬中に添加されており、cDNA を鋳型とした場合、残存 mRNA による PCR 反応阻害を極限まで抑制できます。抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq*® HS とリアルタイム PCR 用に最適化されたバッファーの組み合わせにより、非特異的増幅を抑制し、高い増幅効率、高い検出感度でリアルタイム PCR を行うことができます。高速 PCR に適しており、幅広いダイナミックレンジで正確なターゲットの定量、検出が行え、さらに再現性よく信頼性の高いリアルタイム PCR 解析が可能です。

本製品の適応機種

- 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)
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760 : 終売)
- CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
- CronoSTAR Portable Real-Time PCR System (製品コード 640245/640247/640249)
- Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System および StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- LightCycler/LightCycler 480 システム (Roche Diagnostics 社)
- Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid 社)
- CFX96 リアルタイム PCR 解析システム (BIO-RAD 社)

I. 原理

本製品は、*TaKaRa Ex Taq* HS 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出来ます。

本製品では、増幅にホットスタート 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. 蛍光検出

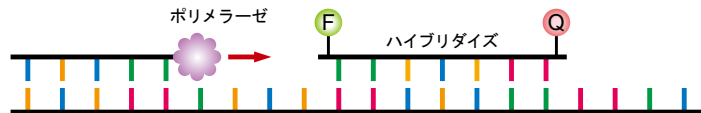
5' 側を蛍光物質 (FAM など) で、3' 側をクエンチャー物質 (TAMRA など) で修飾したオリゴヌクレオチドを反応系に加えます。

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、*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。

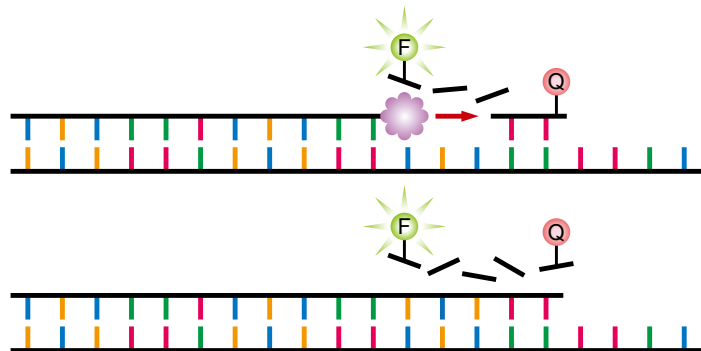
1) 熱変性



2) プライマーのアニール/プローブのハイブリダイゼーション



3) 伸長反応



II. 内容 (200 反応分)

Premix Ex Taq (Probe qPCR) (2 × conc.) *1	1 ml × 5
ROX Reference Dye (50 × conc.) *2	200 μl
ROX Reference Dye II (50 × conc.) *2	200 μl

*1 : TaKaRa Ex Taq HS、dNTP Mixture、Mg²⁺、Tli RNase H を含む。

*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。)
 - ・ 7300 Real-Time PCR System
 - ・ StepOnePlus Real-Time PCR System (以上 Thermo Fisher Scientific 社)
- ◆ ROX Reference Dye II (50 ×) を添加する機種 (最終濃度 0.5 × でご使用ください。)
 - ・ 7500 Real-Time PCR System
 - ・ 7500 Fast Real-Time PCR System (以上 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、TP900/TP960/TP700/TP760:終売)
 - ・ CronoSTAR 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
 - ・ CronoSTAR Portable Real-Time PCR System (製品コード 640245/640247/640249)
 - ・ Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid 社)
 - ・ LightCycler/LightCycler 480 システム (Roche Diagnostics 社)
 - ・ CFX96 リアルタイム PCR 解析システム (BIO-RAD 社)

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

4°C保存 : 6 ヶ月安定

コンタミネーションには十分注意してください。

1. 使用時には、穏やかな転倒混合により、必ず完全に溶解し、均一に混合してからご使用ください。
2. 長期保存の場合、- 20°Cで凍結保存することが可能です。いったん融解したものは4°C保存し、6 ヶ月を目途にご使用ください。

IV. 特長

1. リアルタイム PCR により、遺伝子の検出、定量を迅速かつ正確に行うことが可能です。
2. 2 倍濃度のプレミックス試薬のためピペッティング操作が簡便です。
3. PCR には、ホットスタート PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq HS* を用いています。バッファー系はリアルタイム PCR 用に至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。
4. 2 × プレミックス試薬中に、耐熱性 RNase H である Tli RNaseH をあらかじめ添加しています。cDNA を鋳型とした場合の、残存 mRNA による PCR 反応阻害を極限まで抑制します。

V. 操作上の注意

本製品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. 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、*Premix Ex Taq* (Probe qPCR) (2 × conc.) を -20°C で凍結保存した場合、保存中に沈殿を生じることがあります。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。

VI. 操作

【Thermal Cycler Dice Real Time System III (// および Lite : 終売) を用いる場合の操作方法】

※ Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

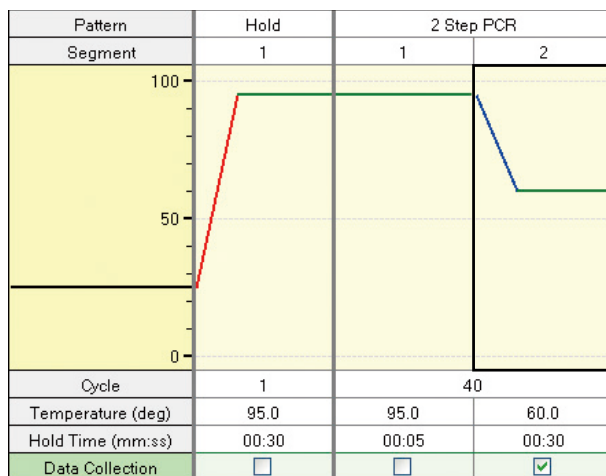
< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
<i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (2 × conc.)	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*1
プローブ*2	1 μl	
template*3	2 μl	
滅菌精製水	8.5 μl	
Total	25 μl	

- *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。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する。Thermal Cycler Dice Real Time System III (// および Lite : 終売) の場合、通常、最終濃度 0.1 ~ 0.5 μM の範囲で検討する。
- *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る。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA (RT 反応液) を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

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。アニーリング／伸長時間は 20 ～ 30 秒に設定できますが、より安定した結果が得られる 30 秒で、まずお試しください。（16 ページの「PCR 反応条件について」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)

Cycle : 1

95°C 30 秒

2 Step PCR

Cycles : 40

95°C 5 秒

60°C 30 秒

※ 使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Ex 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°C (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 反応前に鑄型の初期変性を行う場合でも、通常 95°C 30 秒で充分です。

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 III (// および Lite : 終売) の取扱説明書をご参照ください。

【 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System、 StepOnePlus Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法 】

※各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	使用量	最終濃度
<i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (2 × conc.)	10 μ l	25 μ l	1 ×
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	1 μ l	0.2 μ M* ¹
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	1 μ l	0.2 μ M* ¹
プローブ* ²	0.8 μ l	2 μ l	
ROX Reference Dye (50 ×)* ³	0.4 μ l	1 μ l	1 ×
template* ⁴	2 μ l	4 μ l	
滅菌精製水	6 μ l	16 μ l	
Total	20 μ l* ⁵	50 μ l* ⁵	

*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。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する。

*3：ROX Reference Dye (50 ×)は最終濃度 1 ×で使用する。

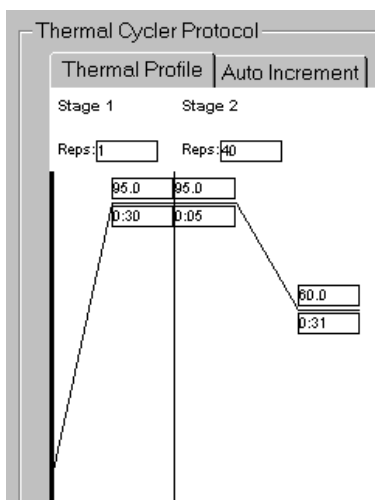
*4：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。20 μ l あたり DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA (RT 反応液) を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

*5：各装置の推奨容量に従って調整する。

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、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。(16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。)

< 7300 Real-Time PCR System >



シャトル PCR 標準プロトコール

- Stage 1 : 初期変性
Reps : 1
95°C 30 秒
- Stage 2 : PCR 反応
Reps : 40
95°C 5 秒
60°C 31 秒

< StepOnePlus Real-Time PCR System >



Fast プロトコール

- Holding Stage
Reps : 1
95°C 20 秒
- Cycling Stage
Number of Cycles : 40
95°C 1 秒
60°C 20 秒

※ 使用上の注意
 本製品に使用している *TaKaRa Ex 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°C (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 反応前に鑄型の初期変性を行う場合でも、通常 95°C 30 秒で充分です。

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。

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

※各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	使用量	最終濃度
<i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (2 × conc.)	10 μ l	25 μ l	1 ×
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	1 μ l	0.2 μ M* ¹
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	1 μ l	0.2 μ M* ¹
プローブ* ²	0.8 μ l	2 μ l	
ROX Reference Dye II (50 ×)	0.2 μ l	0.5 μ l	0.5 ×* ³
template* ⁴	2 μ l	4 μ l	
滅菌精製水	6.2 μ l	16.5 μ l	
Total	20 μ l* ⁵	50 μ l* ⁵	

*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。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する。

*3：ROX Reference Dye II (50 ×)は最終濃度 0.5 ×で使用する。

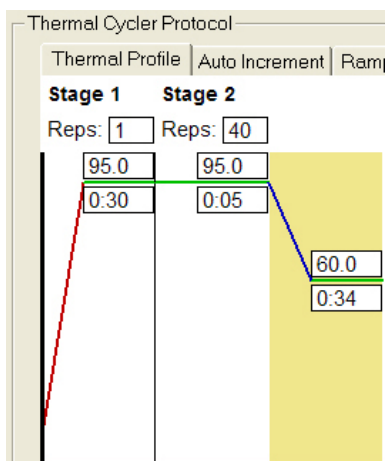
*4：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。20 μ l あたり DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA (RT 反応液) を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

*5：各装置の推奨容量に従って調整する。

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、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。(16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。)

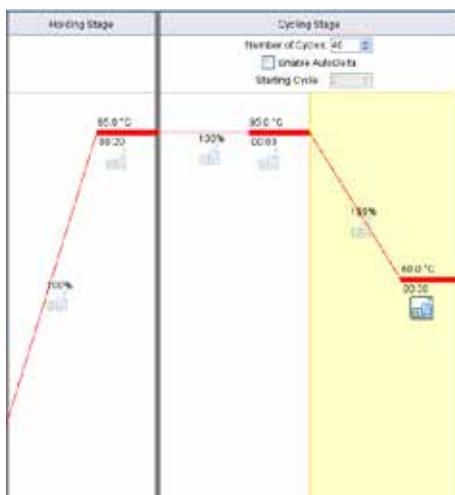
< 7500 Real-Time PCR System >



シヤトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
Reps：1
95°C 30 秒
Stage 2：PCR 反応
Reps：40
95°C 5 秒
60°C 34 秒

< 7500 Fast Real-Time PCR System >



Fast プロトコール

Holding Stage
Reps：1
95°C 20 秒
Cycling Stage
Number of Cycles：40
95°C 3 秒
60°C 30 秒

※ 使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Ex 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°C (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 反応前に鑄型の初期変性を行う場合でも、通常 95°C 30 秒で充分です。

- 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。

【LightCycler/LightCycler 480 システムを用いる場合の操作方法】

※ LightCycler/LightCycler 480 システム (Roche Diagnostics 社) の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq (Probe qPCR) (2 × conc.)	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* ²	0.8 μ l	
template* ³	2 μ l	
滅菌精製水	6.4 μ l	
Total	20 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。

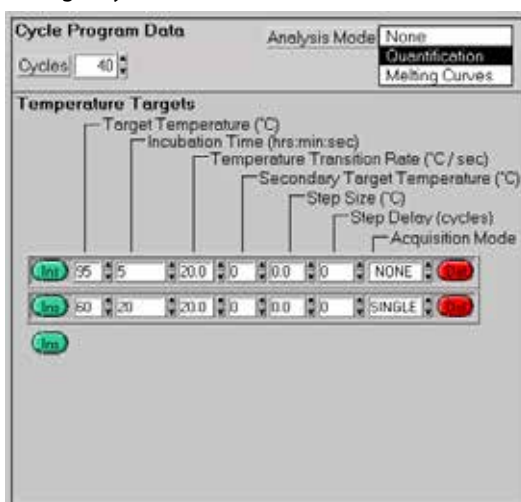
*2: プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

*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る。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA (RT 反応液) を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. PCR キャピラリーを遠心機で軽く遠心後、LightCycler にセットし、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、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。(16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。)

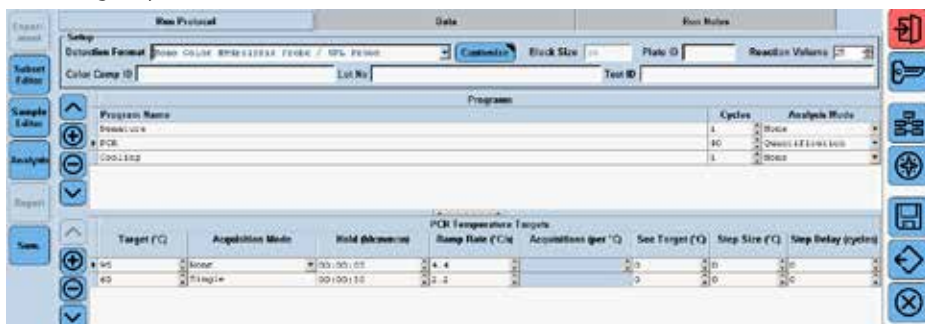
< LightCycler >



シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1 : 初期変性
95°C 30 秒 20°C/秒
1 サイクル
Stage 2 : PCR 反応
95°C 5 秒 20°C/秒
60°C 20 秒 20°C/秒
40 サイクル

< LightCycler 480 システム >



シャトル PCR 標準プロトコール

Denature

95°C 30 秒 (Ramp Rate 4.4°C/s)

1 サイクル

PCR

Analysis Mode : Quantification

95°C 5 秒 (Ramp Rate 4.4°C/s)

60°C 30 秒 (Ramp Rate 2.2°C/s, Acquisition Mode : Single)

40 サイクル

Cooling

50°C 30 秒 (Ramp Rate 2.2°C/s)

1 サイクル

※ 使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Ex 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°C (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 反応前に鑄型の初期変性を行う場合でも、通常 95°C 30 秒で充分です。

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、LightCycler の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 】

※ Smart Cycler System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq (Probe qPCR) (2 × conc.)	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*1
プローブ*2	1 μl	
template*3	2 μl	
滅菌精製水	8.5 μl	
Total	25 μl	

*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。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する。Smart Cycler System/Smart Cycler II System の場合、通常、最終濃度 0.1 ~ 0.5 μM の範囲で検討する。

*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る。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA (RT 反応液) を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 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。

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、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。(16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。)



シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
Hold
95°C 30 秒
Stage 2：PCR 反応
Repeat：40 times
95°C 5 秒
60°C 20 秒

※ 使用上の注意

本製品に使用している TaKaRa Ex 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°C (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 反応前に鑄型の初期変性を行う場合でも、通常 95°C 30 秒で充分です。

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、Smart Cycler System 取扱説明書をご参照ください。

【CFX96 リアルタイム PCR 解析システムの場合】

※ CFX96 リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad 社) の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
Premix Ex Taq (2 ×) (Probe qPCR), Bulk	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* ²	1 μ l	
template* ³	2 μ l	
滅菌精製水	8.5 μ l	
Total	25 μ l	

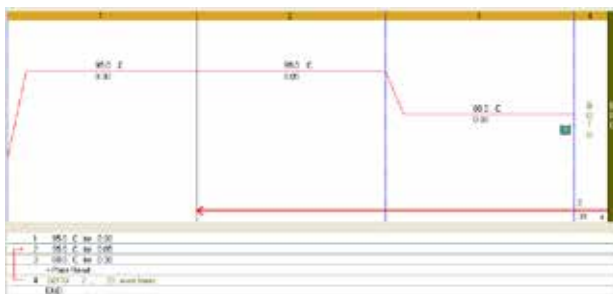
*1：最終プライマー濃度は 0.2 μ M で良い結果が得られることが多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ~ 1.0 μ M の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

*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。装置の取扱い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する。

*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る。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。RT-PCR で cDNA (RT 反応液) を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコルで行うことをお勧めします。まず、このプロトコルを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。(16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。)



シャトル PCR 標準プロトコル

Sample volume : 25 μ l
Step 1 : 95°C 30 秒
Step 2 : PCR 反応
GOTO : 39 (40 サイクル)
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、CFX96 リアルタイム PCR 解析システムの取扱説明書をご参照ください。

< PCR 反応条件について >

初期変性

ステップ	温度	時間	検出	コメント
初期変性	95℃	30 秒	OFF	初期変性は通常 95℃ 30 秒で十分である。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鑄型でもこの条件で良好に反応できることが多い。鑄型の状態によっては、95℃ 1～2 分程度に延長することが可能だが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがあるため、2 分以上の条件は推奨しない。

シャトル PCR (2 ステップ PCR)

サイクル数：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 (31、34 秒)*	ON	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。

*： Applied Biosystems の装置では、検出ステップを 30 秒以内に設定できない機種があります。
7300 Real-Time PCR System は 31 秒以上、
7500 Real-Time PCR System は 34 秒以上で設定します。

VII. 備考：リアルタイム RT-PCR を行う場合

2ステップ RT-PCR を行う場合、PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A) との組み合わせをお勧めします。下記のプロンプアッセイ用のプロトコールで逆転写反応を行ってください。

1. 下記に示す逆転写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
5 × PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μ l	1 ×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μ l	
Oligo dT Primer (50 μ M) *1	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M) *1	2 μ l	200 pmol
total RNA		
RNase Free dH ₂ O		
Total	10 μ l *2	

*1： Oligo dT Primer と Random 6 mers の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率よく cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer の場合の使用量は以下の通りです。

プライマー	使用量	添加量
Oligo dT Primer (50 μ M)	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M)	2 μ l	200 pmol
Gene Specific Primer (2 μ M)	0.5 μ l	1 pmol

*2： 逆転写反応は、必要に応じてスケールアップしてください。10 μ l の反応液で逆転写出来るのは、およそ 1 μ g までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。

37°C 15分*3 (逆転写反応)
85°C 5秒 (逆転写酵素を熱失活させる)
4°C

*3： Gene Specific Primer を用いる場合：
逆転写反応を 42°C 15分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50°Cに変更すると改善される場合があります。

3. PCR 反応を行う。

6～15ページの「VI. 操作」に記載されている方法に従って、PCR を行う。

VIII. 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

IX. 関連製品

Probe qPCR Mix (製品コード RR391A/B)
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)
One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR064A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
TB Green® Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B)

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)
CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR System (製品コード 640245/640247/640249)

リアルタイム PCR 用プライマー・プローブ合成 (TaKaRa qPCR Probe)

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