

製品コード RR392A/S

研究用

TAKARA

**Probe qPCR Mix,
with UNG**

説明書

v201904Da

Probe qPCR Mix 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。抗体を利用したホットスタート PCR 酵素とリアルタイム PCR 用バッファーをそれぞれ改良することにより、PCR 阻害物質に対する高い抵抗性、特異性の高い増幅、高い検出感度を実現しています。また、高速 PCR にも適しており、幅広いダイナミックレンジで正確なターゲットの定量、検出を再現性よく行うことができるため、信頼性の高いリアルタイム PCR 解析が可能です。2×濃度のプレミックスタイプ試薬には、耐熱性 RNase H である Tli RNaseH および、以前にこのキットで増幅された PCR 産物を分解する Uracil N-Glycosylase (UNG) が添加されています。cDNA を鋳型とした場合、Tli RNaseH により、残存 mRNA による PCR 反応阻害を極限まで抑制できます。また、UNG 反応を実施することで、キャリアーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を回避できます。

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)
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)
- Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System および StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)

I. 原理

本製品は、耐熱性 DNA ポリメラーゼにより 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。

2. 蛍光検出

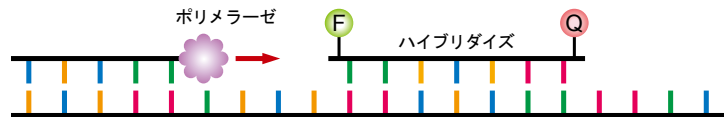
5' 側を蛍光物質 (FAM など) で、3' 側をクエンチャー物質 (TAMRA など) で修飾したオリゴヌクレオチドを反応系に加えます。

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、耐熱性 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。

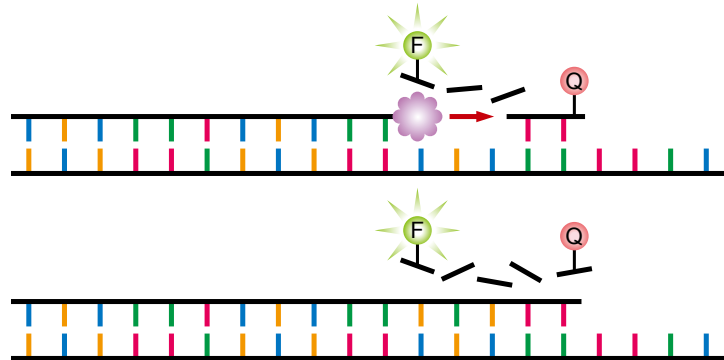
1) 熱変性



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 (200 反応分)

	製品コード RR392A	RR392S
Probe qPCR Mix, with UNG (2×conc.) *1	1 ml ×5	1 ml
ROX Reference Dye (50×conc.) *2	200 μl	40 μl
ROX Reference Dye II (50×conc.) *2	200 μl	40 μl

* 1 : PCR 酵素、dNTP Mixture、Mg²⁺、Tli RNase H、UNG 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)
 - ・ CFX96 Real-Time PCR Detection System (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 - 20℃

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 阻害物質に高い抵抗性を示すため、前処理方法の簡便化など使用用途が広がります。
4. 2×プレミックス試薬中に、耐熱性 RNase H である Tli RNaseH 及び UNG 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。また、UNG の働きにより、キャリアーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を回避します。

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、泡立て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、Probe qPCR Mix (2×conc.) の保存中に沈殿することがあります。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。
5. 万一、サンプルやプライマーが核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋着脱およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。
6. 反応液の調製から検体サンプルの添加まで、次の3つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します (IX. 補足：エリア分けについてを参照)。どのエリアにおいても、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。
 - エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
 - エリア 2：検体の調製を行います。
 - エリア 3：反応液へ検体の添加を行います。本キットでは反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。実験室内の核酸のコンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。
7. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。解析ソフトウェアの補正機能などが適切でない場合、誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、解析パラメーターの Manual 設定を行ってください。

VI. 使用上の注意

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。通常コンタミネーションがない場合は、特に 25℃ 10 分のステップを入れる必要はありません。
本製品に使用している DNA ポリメラーゼ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 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 反応前に鑄型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

VII. 操作

【 Thermal Cycler Dice Real Time System III、// および Lite 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。

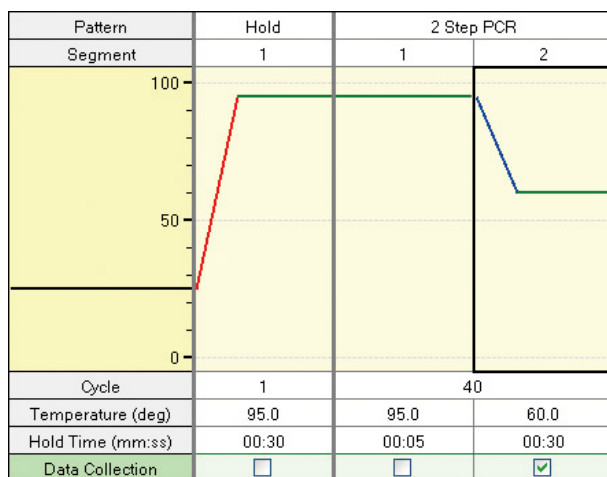
1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix, with UNG (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*2	1 μ l	
template*3	2 μ l	
滅菌精製水	8.5 μ l	
Total	25 μ l	

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。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。(10 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

(Hold (UNG)) *4
 Cycle : 1
 25°C 10 分
 Hold (初期変性)
 Cycle : 1
 95°C 30 秒
 2 Step PCR
 Cycles : 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 III、// および Lite の取扱説明書をご参照ください。

* 1 ~ 4 : 10 ページの < PCR 反応条件 > についてをご参照ください。

【 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
Probe qPCR Mix1, with UNG (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*2	0.8 μl	2 μl	
ROX Reference Dye (50×)*5	0.4 μl	1 μl	1×
template*3	2 μl	4 μl	
滅菌精製水	6 μl	16 μl	
Total	20 μl*7	50 μl*7	

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。(10 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

[<Hold>
25°C 10 分]*4

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*8

< StepOnePlus Real-Time PCR System >

Fast プロトコール

[<Hold>
25°C 10 分]*4

Holding Stage

Reps : 1

95°C 20 秒

Cycling Stage

Number of Cycles : 40

95°C 1 秒

60°C 20 秒*8

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 ~ 8 : 10 ページの < PCR 反応条件 > についてをご参照ください。

【 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
Probe qPCR Mix, with UNG (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*2	0.8 μl	2 μl	
ROX Reference Dye II (50×)	0.2 μl	0.5 μl	0.5×*6
template*3	2 μl	4 μl	
滅菌精製水	6.2 μl	16.5 μl	
Total	20 μl*7	50 μl*7	

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。(10 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 >

シャトル PCR 標準プロトコール

[<Hold>
25°C 10 分]*4

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*8

< 7500 Fast Real-Time PCR System >

Fast プロトコール

[<Hold>
25°C 10 分]*4

Holding Stage

Reps : 1

95°C 20 秒

Cycling Stage

Number of Cycles : 40

95°C 3 秒

60°C 30 秒*8

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 ~ 8 : 10 ページの < PCR 反応条件 > についてをご参照ください。

【CFX96 Real-Time PCR Detection System を用いる場合の操作方法】

※ CFX96 Real-Time PCR Detection 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
Probe qPCR Mix, with UNG (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* ²	0.8 μ l	
template* ³	2 μ l	
滅菌精製水	6.4 μ l	
Total	20 μ l	

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。(10 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
25°C 10 分]*⁴

Hold (初期変性)

Cycle : 1

95°C 30 秒

2 Step PCR

Cycles : 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、CFX96 Real-Time PCR Detection System の取扱説明書をご参照ください。

* 1 ~ 4 : 10 ページの < PCR 反応条件 > についてをご参照ください。

< PCR 反応条件について >

ステップ	温度	時間	検出	コメント
初期変性	95°C	30 秒	OFF	初期変性は通常 95°C 30 秒で充分である。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°C 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

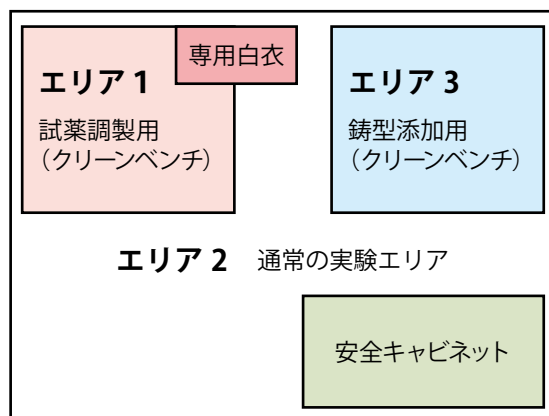
ステップ	温度	時間	検出	コメント
変性	95°C	3～5 秒	OFF	リアルタイム PCR の増幅サイズは一般的に 300 bp 以下なので、95°C で 3～5 秒程度でよい。
アニーリング ／伸長	56～64°C	20～30 秒 (31、34 秒)*	ON	反応条件の至適化を行う場合には、56～64°C の範囲で検討する。反応性が悪いときは、このステップの時間を延ばすと改善する場合がある。

- * 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。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、II および Lite 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。
- * 4： PCR 産物 (dUTP を含む) によるコンタミネーションが疑われる場合には、25°C 10 分のステップを実施する。UNG の作用により前回の実験からキャリアオーバーした PCR 産物が分解される。
- * 5： ROX Reference Dye (50 \times) は最終濃度 1 \times で使用する。
- * 6： ROX Reference Dye II (50 \times) は最終濃度 0.5 \times で使用する。
- * 7： 各装置の推奨容量に従って調整する。
- * 8： 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。

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. 補足：エリア分けについて



- エリア 1：反応試薬のみを扱うエリア
リアルタイム PCR 反応液の調製、分注を行う。
(鋳型となる DNA は一切持ち込まない)
- エリア 2：通常の実験エリア
検体の取扱いや DNA 調製を行う。
必要に応じて安全キャビネットを設置する。
- エリア 3：高濃度 DNA を扱うエリア
分注済みの反応液への鋳型 DNA の添加を行う。
標準サンプルの希釈もここで行う。

X. 関連製品

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)
Probe qPCR Mix (製品コード RR391A/B)
One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (製品コード RR601S/A)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)

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

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 はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeScript 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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社