

研究用

---

**TAKARA**

***Premix Ex Taq™***  
**(Probe qPCR), ROX plus**

---

説明書

---

*Premix Ex Taq* (Probe qPCR), ROX plus 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。

ROX Reference Dye を混合済みの 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 もあらかじめ試薬中に添加されており、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、検出を行うことができ、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

- ◆ ROX Reference Dye による補正を必要とする装置\*
  - ・ StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
  
- ◆ ROX Reference Dye による補正の必要がない装置でも、使用可能。
  - ・ 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)
  - ・ Smart Cycler II System (Cepheid 社) など

\* : ROX Reference Dye II で補正を行う Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) には、ROX Reference Dye を別添付している *Premix Ex Taq* (Probe qPCR), Bulk (製品コード RR390L/W) の使用を推奨します。

## I. 原理

本製品は、*TaKaRa Ex Taq* HS による 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するための試薬です。

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。

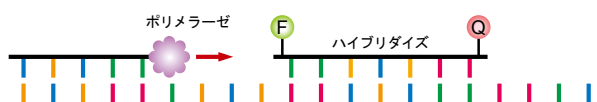
## プローブ法による蛍光検出

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。

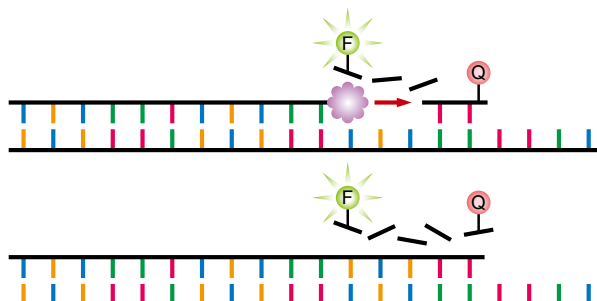
### 1) 熱変性



### 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 回、50 $\mu$ l 反応系)

*Premix Ex Taq* (2  $\times$ ) (Probe qPCR), ROX plus\* 5 ml

\* : *TaKaRa Ex Taq* HS, dNTP Mixture, Mg<sup>2+</sup>, Tli RNaseH および ROX Reference Dye を含む。

## III. 本製品以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

- リアルタイム PCR 装置 (authorized instruments)
- 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)
- 滅菌精製水
- マイクロピペットおよびチップ (滅菌処理したもの。フィルター付きが望ましい。)

---

## IV. 保存

4℃保存：6 ヶ月安定

必ず遮光してください。コンタミネーションには十分注意してください。

※ 長期保存の場合、-20℃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℃保存し、6 ヶ月を目途にご使用ください。

## 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、泡立てないよう緩やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬組成に偏りがあると十分な反応性が得られなくなります。ボルトックスによる混合は行わないでください。  
なお、*Premix Ex Taq* (2 ×) (Probe qPCR), ROX plus を-20℃保存した場合、保存中に沈殿を生じることがあります。室温 (~30℃程度) 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。沈殿が生じたままでは、試薬組成に偏りができますので、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. 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 酵素に必要な 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恐れがあります。PCR 反応前に鑄型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃、30 秒で十分です。

## VI. 操作

### 【 StepOnePlus Real-Time PCR System の場合 】

※ StepOnePlus Real-Time PCR 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 (2 ×) (Probe qPCR), ROX plus	10 $\mu$ l	1 ×
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M* <sup>1</sup>
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M* <sup>1</sup>
プローブ* <sup>2</sup>	0.8 $\mu$ l	
template (< 100 ng) * <sup>3</sup>	2 $\mu$ l	
滅菌精製水	6.4 $\mu$ l	
Total	20 $\mu$ l	

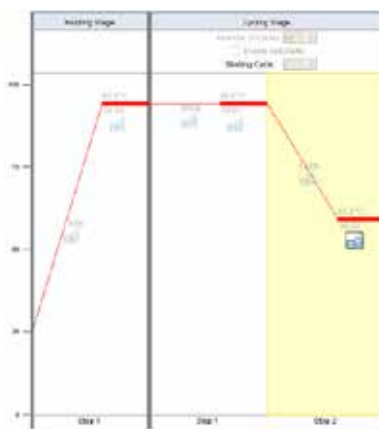
\*1：最終プライマー濃度は 0.2  $\mu$ M で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ~ 1.0  $\mu$ M の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

\*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. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のチャトル 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。(8 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

<Fast Mode>

Holding Stage

Step1 : 95°C 20 秒

Cycling Stage

Number of Cycles : 40

Step1 : 95°C 1 秒

Step2 : 60°C 20 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、StepOnePlus Real-Time PCR System の取扱説明書をご参照ください。

## 【 Thermal Cycler Dice Real Time System III (// および Lite : 終売) の場合 】

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), ROX plus	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 (< 100 ng) *3	2 μl	
滅菌精製水	8.5 μl	
Total	25 μl	

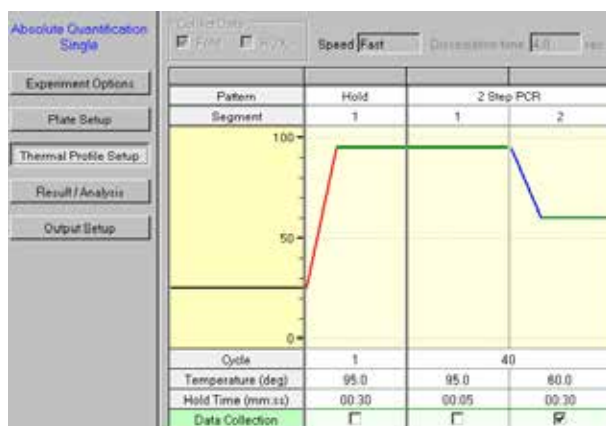
\*1 : 最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ~ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

\*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、添加量を PCR 反応液容量の 10% 以下とする。

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。アニーリング/伸長時間は 20 ~ 30 秒に設定できますが、まずは、より安定した結果が得られる 30 秒でお試しく下さい。(8 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 (初期変性)

Cycle : 1

95°C 30 秒

2 Step PCR

Cycle : 40

95°C 5 秒

60°C 30 秒

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、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。

## 【 Smart Cycler II System の場合 】

### 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), ROX plus	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM* <sup>1</sup>
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM* <sup>1</sup>
プローブ* <sup>2</sup>	1 μl	
template (< 100 ng) * <sup>3</sup>	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 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。(8 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。)

Stage 1				Stage 2			
Hold				Repeat 40 times.			
Temp	Secs	Optics		2-Temperature Cycle			
95.0	30	Off		Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
				NA	95.0	5	Off
				NA	60.0	20	On
				<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage			

#### シャトル PCR 標準プロトコル

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

### 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 II System 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	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。



## VII. 備考；リアルタイム RT-PCR を行う場合

リアルタイム RT-PCR の逆転写反応には

- PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B)
- PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A/B)
- PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (製品コード RR047A/B)

の使用をお勧めします。本製品と合わせて使用することにより、信頼性の高い結果を得ることができます。

例) PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B) を使用した場合の「プローブアッセイ用プロトコール」を以下に示します。

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 $\mu$ l	1 ×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 $\mu$ l	
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M) *1	2 $\mu$ l	200 pmol
total RNA		
RNase Free dH <sub>2</sub> O		
Total	10 $\mu$ 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 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	200 pmol
Gene Specific Primer (2 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ 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  $\mu$ l の反応液で逆転写出来るのは、およそ 1  $\mu$ g までの total RNA です。

2. 逆転写反応を行う。

37°C 15 分 (逆転写反応) \*3  
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。

「VI. 操作」に記載されている方法に従う。

## 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)  
*Premix Ex Taq*<sup>™</sup> (Probe qPCR) (製品コード RR390A/B)  
*Premix Ex Taq*<sup>™</sup> (Probe qPCR), Bulk (製品コード RR390L/W)  
PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B)  
PrimeScript<sup>™</sup> RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A/B)  
PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (製品コード RR047A/B)  
One Step PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR064A/B)  
TB Green<sup>®</sup> *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)  
TB Green<sup>®</sup> Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/B)  
TB Green<sup>®</sup> *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)

Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)  
CronoSTAR<sup>™</sup> 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)  
CronoSTAR<sup>™</sup> 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。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice、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**