製品コード RR651A

研究用

TaKaRa

PrimeDirect® Probe RT-qPCR Mix, with UNG

説明書

v202207Da

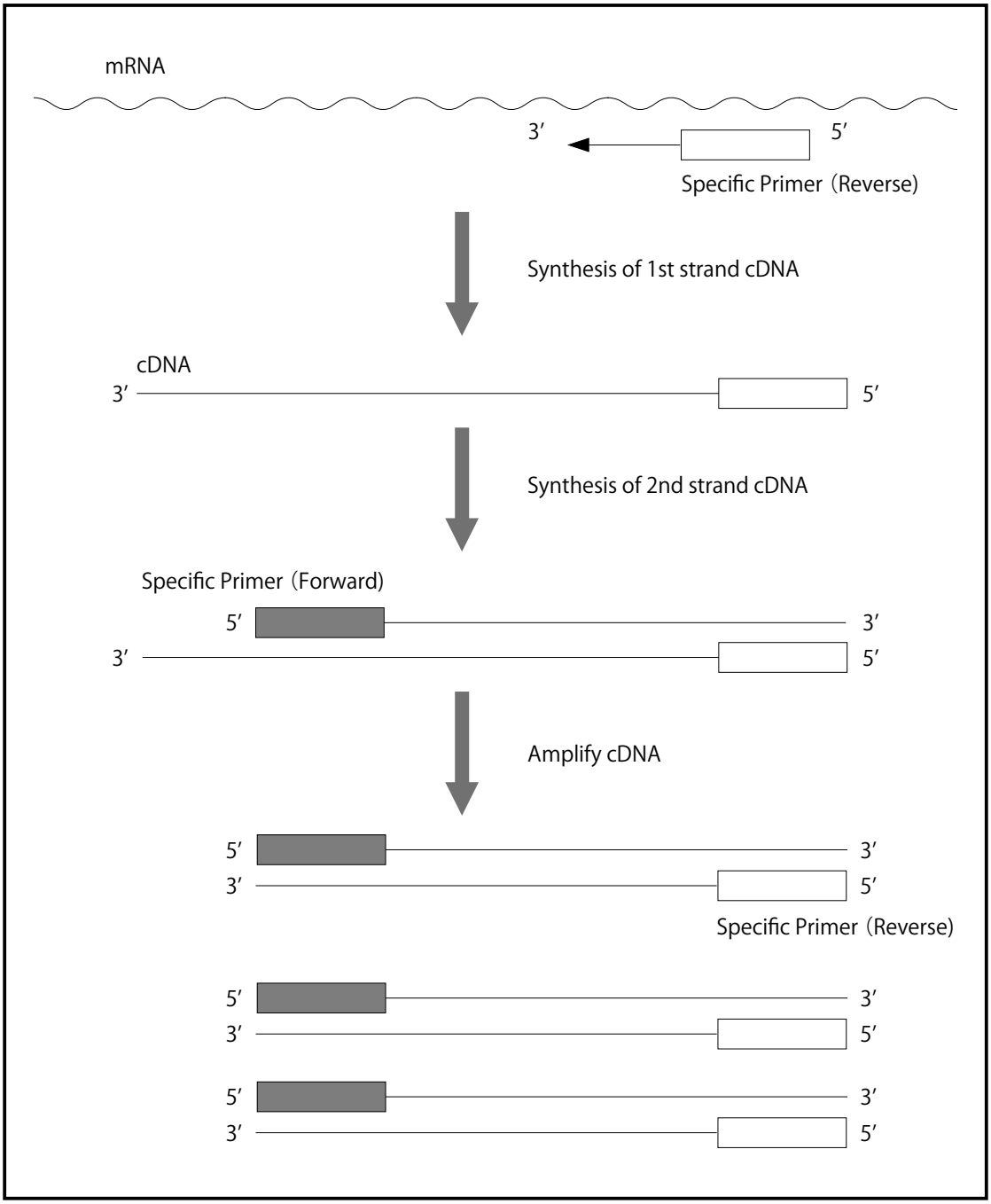
PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG は、プローブ検出（5′- ヌクレアーゼ法）による 1 ステップリアルタイム RT-PCR の専用試薬です。本製品は 2×プレミックスとなっており、ターゲットを検出するためのプライマー・プローブ、および鋳型となるサンプルを添加するだけで反応が行えます。多くの場合、RNA ウイルス等を含む生体試料から核酸を抽出・精製すること無しに、サンプルを直接反応液に加えることができます。反応液中で、核酸抽出から逆転写反応と qPCR を 1 チューブ内で連続的に行えるため、操作性および反応時間が大幅に軽減されます。核酸抽出（90℃）から逆転写反応（55 ～ 65℃）において、温度を下げることなく連続的に行うことは、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。cDNA 合成後は、連続して増幅効率の高い PCR を行い、プローブが発する蛍光をリアルタイムに検出します。検査目的等で特定ターゲットを繰り返し検出する環境下においては、以前の検出反応の増幅産物の持ち込み（キャリーオーバーコンタミネーション）が問題となりますが、本キットには、dUTP を含む PCR 産物を分解する Uracil N-Glycosylase（UNG）が含まれており、本キットを継続して使用することで、キャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性反応を回避できます。
本製品は、ヘパリン（血液）やフミン酸（土壌）といった様々な阻害物質に対して最高レベルの耐性を示すため、様々な生体試料からダイレクトにウイルスや細菌の検出、或いは遺伝子の発現解析といったアプリケーションに使用できます。

I. 原理

PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG では、生体試料からの核酸抽出、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

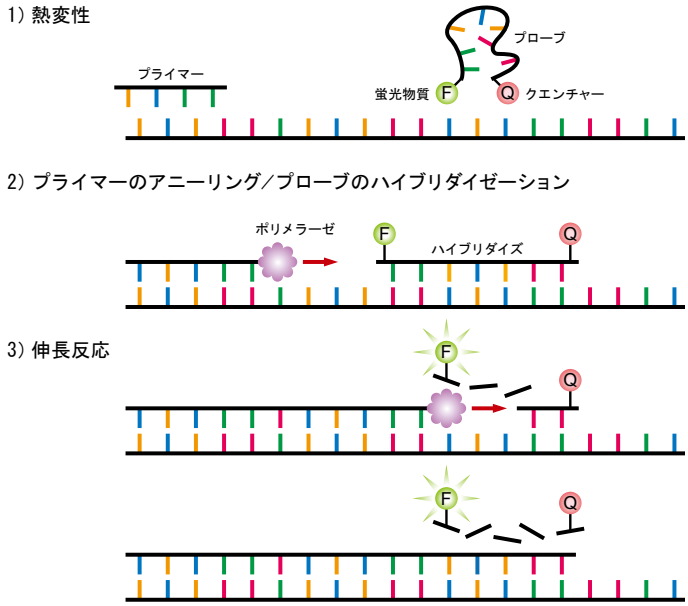
RNA は PCR の直接の鋳型とはなりませんが、逆転写酵素により RNA から cDNA を合成することにより、PCR を RNA 解析に応用することが可能になります。これが RT-PCR であり、高感度な RNA 検出方法です。本製品では、One Step RT-PCR を行います。その原理を次ページに示します。
One Step RT-PCR では、PCR 用の Specific Primer（Reverse）を用いて逆転写反応を行い、次に合成されたそれら cDNA を鋳型として、Specific Primer（Forward、Reverse）による PCR 増幅を、1 チューブ内で連続的に行います。



1 ステップ RT-PCR 法の原理

2. 蛍光検出

本試薬では、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、BHQ1 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。これら原理を組み合わせた方法は、サンプルのリアルタイムでの定量を可能とすることから、One Step RT-q (quantitative) PCR と呼ばれます。



II. 内容（200 回分、25 μl 反応系）

1.	PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG (2X)	625 μl × 4
2.	RNase Free H_2O	1.25 ml × 2
3.	ROX Reference Dye（50 × conc.）＊	100 μl
4.	ROX Reference Dye II（50 × conc.）＊	100 μl

＊：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 0.5 ×で添加してください。

キット以外に必要となる試薬、器具、機器（主なもの）

1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム
   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（製品コード TP800/TP860：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 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）
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）
   検出用プローブ設計サイト
   （https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/index.htm#probe）
5. マイクロピペットおよびチップ

III. 保存

－ 20℃

IV. 特長

1. Probe 検出用 2×ワンステップ RT-qPCR 試薬
2. 反応液中にて生体試料から核酸をダイレクトに熱抽出
3. 高温での逆転写反応（55 ～ 65℃）
4. 様々な阻害物質に対する最高レベルの阻害耐性
5. UNG の作用により、キャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を回避

V. 操作上の注意

本キット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. PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG (2X) は、室温にて融解後、軽く混合したのちスピンダウンして使用してください。使用後は、直ちに－ 20℃に保存してください。
2. 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。
3. 反応液は、必要分＋ α の Master Mix（PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG (2X)、RNase Free H_2O、プライマー・プローブ或いはサンプルの混合液）を調製すると便利です。組成の均等な Master Mix を最少回数分注することで、試薬調製のばらつきを最小限に留めることができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。
4. 本キット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。

VI. 操作

※ 各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 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 】＊6

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG (2X)＊1	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊2
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊2
プローブ（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊3
サンプル	≦ 2.5 μl ＊4	
RNase Free Water	X μl	
Total	25 μl ＊5	

【 ROX Reference Dye の添加の必要がある機種を用いる場合 】＊6

＜ 1 反応あたり＞

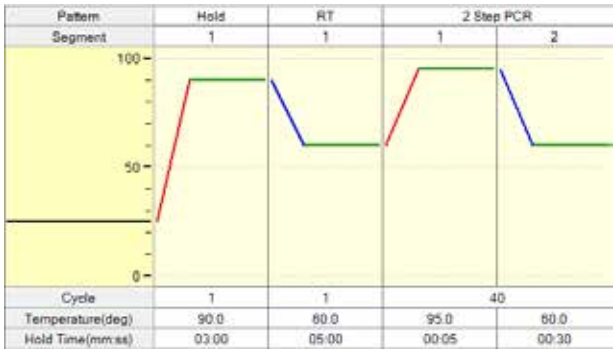
試薬	使用量	最終濃度
PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG (2X)＊1	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊2
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊2
プローブ（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM ＊3
ROX Reference Dye or Dye II (50×)＊6	0.25 μl	0.5×
サンプル	≦ 2.5 μl ＊4	
RNase Free Water	X μl	
Total	25 μl ＊5	

＊ 1 ～ 6：8、9 ページの＜ RT-qPCR 反応条件について＞をご確認ください。

2. リアルタイム RT-qPCR 反応

反応チューブまたはプレートを軽くスピンダウンした後、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（8、9 ページの <RT-qPCR 反応条件について > をご参照ください）。



Pattern 1：逆転写反応
（37℃　10 分 ）＊7
90℃　 3 分（ウイルスを含む生体試料等）または 95℃ 30 秒（粗抽出・精製核酸）＊8
60℃　 5 分
Pattern 2：PCR 反応
Cycle：40
95℃　 5 秒
60℃ 30 秒 ＊9

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。

＊ 7 ～ 9：8、9 ページの＜ RT-qPCR 反応条件について＞をご確認ください。

＜ RT-qPCR 反応条件について ＞

最初に、取扱説明書に記載した標準プロトコールをお試しください。

核酸熱抽出・変性

ステップ	温度	時間	検出	コメント
変性 （粗抽出・精製核酸）	95 ～ 98℃	30 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。

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 ～ 30 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。

＊ 1： 室温にて試薬を融解し、反応液を調製します。氷上で融解すると析出が見られる場合があります。

＊ 2： 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ですが、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の検討を推奨します。

＊ 3： 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。プローブの添付データシート等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 μM の範囲で検討してください。

＊ 4： サンプルは 1/10 量以下、或いは 10 pg ～ 1 μg の範囲での使用を推奨します。目的の核酸濃度が低い場合には 1/10 量以上使用することも可能ですが、RT-qPCR 反応に阻害が出る場合があるので注意してください。

＊ 5： 各機種の推奨容量に従って調整してください。

＊6： ROX Reference Dye の使用については下記をご参照ください。

ROX Reference Dye（50×）を使用する機種
◆ ROX Reference Dye を添加（最終濃度 0.5×） ・ ABI StepOnePlus ◆ ROX Reference Dye II を添加（最終濃度 0.5×） ・ ABI 7500 Fast
ROX Reference Dye を使用しない機種
・ Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ ・ CronoSTAR シリーズ ・ Bio-Rad CFX シリーズ ・ Roche Lightcycler シリーズ

＊7： キャリーオーバーコンタミネーションが疑われる場合に実施してください。UNG の作用により、キャリーオーバーした PCR 産物（dUTP を含む）が分解されます。

＊8： このステップは必須なので、必ず 90℃ 3 分または 95℃ 30 秒の変性を行ってください。

＊9： 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）。

VII. Appendix：RNA サンプルの調製について

本キットは RNA から cDNA 合成、PCR 増幅を行うキットです。cDNA 合成を成功させるためには、サンプルに含まれる RNase の作用を極力抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、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。

【器具】

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。

【溶液】

用いる溶液、蒸留水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

VIII. 関連製品

RNase-free Water（製品コード 9012）
Thermal Cycler Dice® Real Time System III（製品コード TP950 など）
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）

IX. 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。
- PrimeDirect、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

v202207Da