

製品コード RR830S
RR830A

研究用

TAKARA

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] II
FAST qPCR

説明書

TB Green *Premix Ex Taq II* Fast qPCR は、インターカレーター法によるリアルタイム PCR 専用試薬です。本製品は、高速反応に適した変異型 *Taq* DNA ポリメラーゼと、プライマーダイマーを抑制する因子を組み合わせて反応液組成を最適化しており、究極の特異性を持ちながら、卓越した高速反応と高い蛍光強度による幅広いダイナミックレンジで再現性の高い定量と検出を実現します。本製品には耐熱性 Tli RNaseH と Uracil-N-Glycosylase (UNG) を添加しているため、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て幅広いターゲットに対応し、UNG によりキャリアオーバーコンタミネーションによる増幅を回避します。また、2×プレミックス試薬にはあらかじめユニバーサルリファレンスと可視化色素が含まれており、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置でのリファレンス試薬の添加は不要で、操作のエラーを最小限に抑制できます。

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)
- Applied Biosystems QuantStudio 3/5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
- LightCycler 480 System (Roche Diagnostics 社)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)

I. 原理

本製品では、変異型 *Taq* HS による PCR 増幅を行います。PCR 増幅産物は、TB Green 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できます。

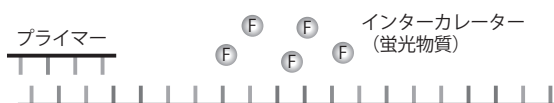
本製品では、増幅にホットスタート PCR 用変異型 *Taq* DNA ポリメラーゼとプライマーダイマーを抑制する反応液組成により、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. 蛍光検出法 (インターカレーター法)

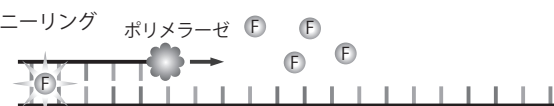
二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬 (インターカレーター: TB Green など) を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。

ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。この蛍光強度を検出することで、定量だけでなく増幅 DNA の融解温度を測定することもできます。

1) 熱変性



2) プライマーのアニーリング



3) 伸長反応



II. 内容 [80 回 (RR830S) / 400 回 (RR830A)、25 μ l 反応系]

	製品コード RR830S	RR830A
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II FAST qPCR (2X) *1	1 ml	1 ml \times 5
EASY Dilution II (for Real Time PCR) *2,3	1 ml	1 ml \times 3

- * 1 : 変異型 *Taq* HS、dNTP Mixture、Mg²⁺、Tli RNaseH、Uracil DNA Glycosylase (UNG)、heat-labile、ユニバーサルリファレンス、可視化色素および TB Green を含みます。
- * 2 : total RNA や cDNA を段階希釈する際に、希釈溶液として使用します。水や TE で希釈すると正確な希釈ができない場合がありますが、この EASY Dilution II (for Real Time PCR) を用いると低濃度までの正確な希釈ができ、幅広いレンジで検量線の作成ができます。なお、このバッファーが逆転写や PCR の反応性に影響をおよぼすことはありません。希釈した鋳型溶液をそのまま逆転写反応や PCR 反応の鋳型として使用できます。
- * 3 : 単品でも購入できます。EASY Dilution II (for Real Time PCR) (製品コード 9451)

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
 - 専用反応チューブあるいはプレート
 - PCR 用プライマー *4
 - 滅菌精製水
 - マイクロピペットおよびチップ
- * 4 : リアルタイム PCR 用プライマーの設計方法は、「VII. Appendix : プライマー設計について」をご参照ください。ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、弊社のオンライン検索 & 注文システム「Perfect Real Time サポートシステム for インターカレーター」のご利用を推奨します。詳細は弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

III. 保存

4°C保存：3ヵ月安定

必ず遮光してください。また、コンタミネーションには十分注意してください。

- ※ Easy Dilution II は、使用後 - 20°C で保存してください。
- ※ 長期保存の場合は、- 20°C で保存してください。一度使用を開始したチューブは 4°C 保存し、3ヵ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. TB Green があらかじめミックスしてある 2× conc. のプレミックス試薬です。プライマーとテンプレートと滅菌精製水を加えるだけでインターカレーター法によるリアルタイム PCR を行うことができます。
3. PCR には、高速反応が可能となる変異型 *Taq* HS を用いています。バッファー系はプライマーダイマー抑制因子を組み合わせてリアルタイム PCR 用に最適化されています。プライマーダイマー形成が極限まで抑制され、短い伸長時間で高感度に高い S/N 比で検出ができます。
4. 本製品には、耐熱性 Tli RNaseH および UNG が含まれています。Tli RNaseH により 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し、UNG によりキャリアオーバーコンタミネーションによる増幅を回避します。
5. ユニバーサルリファレンスと可視化色素をあらかじめ 2× プレミックス試薬に添加しています。ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置でのリファレンス試薬の添加は不要です。

V. 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. リアルタイム RT-PCR を行う際の逆転写反応には以下の試薬の使用を推奨します。本製品と組み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。
 - 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)
2. 使用時には、泡立てないように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。ボルテックスによる混合は行わないでください。

なお、TB Green *Premix Ex Taq* II FAST qPCR (2X) を -20℃ 保存した場合、保存中に白色～黄白色の沈殿を生じることがあります。軽く手で温めるか、遮光して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。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。
3. 反応液調製時には、試薬を氷上に置いてください。
4. 本製品はインターカレーター TB Green を含んでいます。反応液調製時に強い光をあてないように注意してください。使用した TB Green *Premix Ex Taq* II FAST qPCR (2X) は速やかに遮光保存してください
5. 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

※ 各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. PCR 反応液の調製

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II Fast qPCR (2X)	12.5 μ l	1×
PCR Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*1
template (< 100 ng)*2	\leq 2.5 μ l	
滅菌精製水	x μ l	
Total	25 μ l	

* 1 : 最終プライマー濃度は 0.4 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 0.2 ~ 1.0 μ M の範囲で最適な濃度をご検討ください。

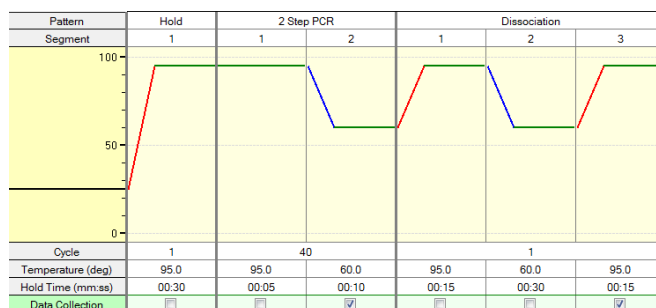
* 2 : DNA template の場合は、100 ng 以下を用いることを推奨します。cDNA template (RT 反応液) の場合は、添加量を PCR 反応液容量の 10% 以下にしてください。

2. 反応開始

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推奨します。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。

Tm 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。

シャトル PCR 標準プロトコール



Hold (初期変性)*3

Cycle : 1

95°C 30 秒

2 Step PCR*4

Cycles : 40

95°C 5 秒

60°C 10 秒

Dissociation

* 3 : 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、初期変性の前に 25°C 2 ~ 10 分のステップを実施してください。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 産物が分解されます。

* 4 : PCR 条件を至適化する場合は、6 ページの「実験条件の選び方」をご確認ください。

※ 使用上の注意

本製品に使用している変異型 *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 反応前に鋳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

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。

実験条件の選び方

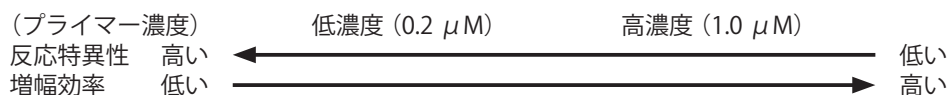
推奨条件（シャトル PCR 標準プロトコール）で良好な反応性が得られない場合には、下記の要領でプライマー濃度や PCR 条件の検討を行ってください。

実験条件を選ぶ際には、反応特異性と増幅効率の両方を考慮して総合的に判断します。両方のバランスが取れた実験系では広い濃度範囲で正確な定量が可能です。

- 反応特異性が高い実験系
 - ・ No Template Control でプライマーダイマーなどの非特異的増幅が生じない。
 - ・ 目的産物以外の非特異的増幅が生じない。
- 増幅効率が高い実験系
 - ・ 増幅産物がより早いサイクルで検出される（Ct 値が小さい）。
 - ・ PCR 増幅効率が高い（理論値である 100%に近い）。

【プライマー濃度の検討】

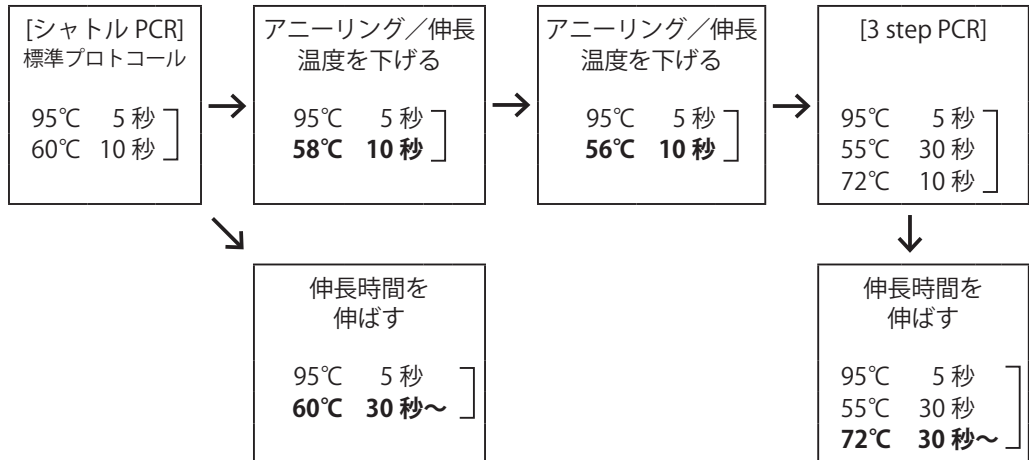
プライマー濃度と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。反応特異性を上げるにはプライマー濃度を下げ、増幅効率を上げるにはプライマー濃度を上げます。



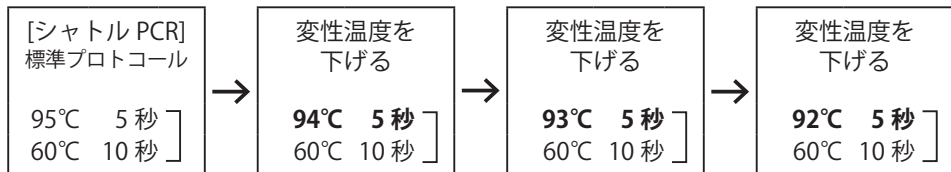
【PCR 条件の検討】

○ 増幅効率を上げるには—

- (1) アニール／伸長温度を下げるか 3 step PCR に変更、または伸長時間を伸ばすことにより、増幅効率が改善することがあります。以下の手順で検討を行ってください。

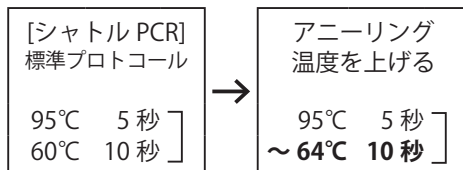


- (2) 変性温度を 95°C から 1°C ずつ 92°C まで下げることにより、増幅効率が改善することがあります。



○ 反応特異性を上げるには—

アニール温度を上げると反応特異性が改善することがあります。増幅効率とのバランスを確認しながら、検討を行ってください。



○ 初期変性について

初期変性は通常 95°C、30 秒で充分です。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鋳型でも、ほとんどの場合、この条件で良好に反応できます。鋳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ですが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがありますので、2 分以上の条件は推奨しません。

VII. Appendix : プライマー設計について

リアルタイム PCR を効率的に行うには、反応性の良いプライマーを設計することが重要です。以下のガイドラインに沿って、増幅効率がよく、非特異的反応が起こらないプライマーを設計してください。

なお、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの遺伝子発現解析用途のリアルタイム RT-PCR プライマーの設計・合成には、弊社オンライン検索&注文システム「Perfect Real Time サポートシステム for インターカレーター」*1 のご利用を推奨します。

詳細は弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

*1: ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq 登録遺伝子または Ensembl Plants 登録遺伝子に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです (ご注文によりカスタム合成してお届けします)。本製品と組み合わせて、TB Green 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

本システムを利用して RT-PCR プライマーを設計・合成された場合には、シャトル PCR 標準プロトコールで反応できます。

■ 増幅産物

増幅サイズ	80 ~ 150 bp が最適 (300 bp までは増幅可能)
-------	----------------------------------

■ プライマー

長さ	17 ~ 25 mer
GC 含量	40 ~ 60% (望ましくは、45 ~ 55%)
Tm	Forward primer と Reverse primer の Tm 値が大きく異なること。 Tm 値の計算は、専用のソフトウェアで行う。 OLIGO*2 : 63 ~ 68°C Primer3 : 60 ~ 65°C
配列	全体的に塩基の偏りがない配列にする。 部分的に GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける (特に 3' 末端)。 T/C の連続 (polypyrimidine) は避ける。 A/G の連続 (polypurine) は避ける。
3' 末端配列	3' 末端が GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける。 3' 末端塩基は、G または C が望ましい。 3' 末端塩基が T であるプライマーは避けたほうがよい。
相補性	プライマー内部およびプライマー間での 3 base 以上の相補的配列を避ける。 プライマーの 3' 末端同士が 2 base 以上相補する配列を避ける。
特異性	BLAST 検索でプライマーの特異性を確認する。*3

* 2 : OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights 社)

* 3 : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

※ タカラバイオでは、「Perfect Real Time サポートシステム for インターカレーター」に対応していない遺伝子についても、プライマーのカスタム設計・合成サービスを行っております。

弊社ウェブサイトにてご注文を承ります。

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. 関連製品

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus), Bulk (製品コード RR820L/W)
TB Green® *Premix DimerEraser*™ (Perfect Real Time) (製品コード RR091A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A/B)
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)
One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 製品コード RR096A/B)
EASY Dilution II (for Real Time PCR) (製品コード 9451)
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)

Perfect Real Time サポートシステム for インターカレーター*

- *：ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq 登録遺伝子または Ensembl Plants 登録遺伝子に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです (ご注文によりカスタム合成してお届けします)。本製品と組み合わせ、TB Green 検出によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。詳細は弊社ウェブサイトをご参照ください (<https://catalog.takara-bio.co.jp>)。

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。
- TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*Premix Ex Taq*、CronoSTAR、PrimeScript、DimerEraser 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