

ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix

(Code No. FSQ-201)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A4632K

— 目 次 —

[1] はじめに	1
[2] 製品内容	2
[3] 製品のほかに用意するもの	3
[4] 使用方法	4
[5] Appendix	5
[6] トラブルシューティング	7
[7] 関連商品	8

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix は、高効率逆転写酵素「ReverTra Ace[®]」を用いて開発された、リアルタイム PCR 用の逆転写反応キットです。逆転写反応に必要な成分 (ReverTra Ace[®]、RNase Inhibitor、Oligo dT Primer、Random Primer、dNTPs、反応 buffer) を全て含んだ 5x 濃度の完全プレミックス試薬であり、鋳型 RNA と水を添加するだけで、迅速に反応を開始することができます。また、リアルタイム PCR のターゲットとなる短鎖 cDNA の合成に最適化された反応組成を採用しておりますので、リアルタイム PCR に適した cDNA 鋳型を短時間で効率良く調製することが可能です。

本製品にはリアルタイム PCR 試薬は添付されていません。リアルタイム PCR には、弊社高性能リアルタイム PCR 試薬 THUNDERBIRD[®] qPCR Mix あるいは Realtime PCR Master Mix シリーズのご使用をお薦めします([7] [関連商品](#)をご参照ください)。

◆本製品の特長◆

1. 完全プレミックス試薬

-20 °Cにおいても凍結しない完全プレミックスタイプの試薬です。鋳型 RNA と水を加えるだけの操作で、簡便に再現性良く cDNA を合成することができます。また、同じくプレミックスタイプの no-RT Control が付属していますので、逆転写反応(ー)のコントロールも、容易に調製することができます。

2. RNA の全領域を均一に逆転写

Oligo dT と Random Primer の最適な混合比を持つプライマーミックスの採用により、RNA の全領域を均一に、高い効率で逆転写反応を行うことができます。

3. 短時間・簡便なプロトコール

リアルタイム PCR 用の cDNA 合成に最適化された反応バッファーにより、わずか 15 分で効率的に逆転写反応を行うことができます。また、リアルタイム PCR の反応阻害要因となる残存 RNA の除去においても、追加的な RNase H 処理を必要とせず、簡便なプロトコールとなっています(特許出願中)。

4. リアルタイム PCR 試薬との高い適合性

リアルタイム PCR の反応系への影響を最小限に抑える組成を採用しており、最大で 20% 液量の逆転写反応液を PCR に添加した場合でも、高い直線性を示します。発現量が少ない mRNA の高感度検出にも最適です。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれており、10µl 反応で 200 回用としてご使用いただけます。また、10µl 反応で 20 回分の 5x RT Master Mix no-RT Control が付属しています。全ての試薬は-20°C で保管してください^(注1)。

試薬名	保存 ^(注1)	容量
5x RT Master Mix ^(注2)	-20°C	400µl
5x RT Master Mix no-RT Control ^(注2)	-20°C	40µl
Nuclease-free Water	-20°C	1000µl x2

5x RT Master Mix

高効率逆転写酵素 ReverTra Ace[®]、RNase inhibitor、Oligo dT Primer、Random Primer、反応バッファー、MgCl₂、dNTPs、グリセロールなどを含んだ5x濃度のマスターミックスです。蓋を開ける前に、スピンドウンして液を底に落としてからご使用ください。また、粘性がありますので、ゆっくりとピペティングを行ってください。

5x RT Master Mix no-RT Control

5x RT Master Mix から ReverTra Ace[®]のみを除いたマスターミックスです。逆転写(ー)のコントロールの調製にご使用いただけます。5x RT Master Mixと同様に、蓋を開ける前に、スピンドウンして液を底に落としてからご使用ください。また、粘性がありますので、ゆっくりとピペティングを行ってください。

Nuclease-free Water

Nuclease-free グレードの滅菌蒸留水です。ポリメラーゼ活性に影響を及ぼす恐れのあるジエチルピロカーボネート(DEPC)処理を行わずに調製されています。

注 1) 長期に渡ってご使用される場合には、-30°Cにて保存ください。

注 2) 本キット付属の 5x RT Master Mix 及び 5x RT Master Mix no-RT Control は、弊社姉妹品 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301)には、ご使用いただけません[組成が異なります]。ご注意ください。

注 3) 本試薬は、逆転写プライマー(Random Primer 及び Oligo dT Primer)を含む完全プレミックス試薬です。遺伝子特異的プライマー(Gene Specific Primer)を用いることはできません。遺伝子特異的プライマーをご使用される場合は、姉妹品 ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code No.FSQ-101)をご使用ください。

[3] 製品のほかに用意するもの

本製品の他に、以下の試薬・機器類をご用意ください。

- ・サーマルサイクラーまたはインキュベーター

本製品の推奨する温度(37°C、50°C、65°C、および98°C)を保つことができる機器をご用意ください。

- ・Nuclease-free Water

本製品には、200 回分の反応に必要な量が添付されていますが、鋳型 RNA の希釈などを行う際に、必要に応じて別途ご購入ください。DEPC(ジエチルピロカーボネート)不使用タイプの Nuclease-free Water の使用をお勧めします。DEPC 処理水を使用することも可能ですが、DEPC の残留により反応が阻害されることがありますので、オートクレーブを十分に行って DEPC を完全に除去してから使用してください。また逆転写反応や PCR に使用する Nuclease-free Water は、核酸の混入を防ぐため、他の実験とは別に保存し、共用しないことをお勧めします。

- ・Total RNA

本製品では、Total RNA を直接、鋳型として用いることができます。組織、培養細胞等から得られた Total RNA には、発現解析の対象となる mRNA が通常 1-2%程度含まれています。発現量が極端に低いターゲットの検出を行う場合などを除き、通常は Total RNA を鋳型とすることで十分に検出が可能です。

カラムタイプの RNA 抽出キットや AGPC(Acid Guanidium - Phenol - Chloroform)法などにより精製された Total RNA には、ゲノム DNA が混入しています。検出するターゲットに偽遺伝子が多く存在する場合や、イントロンをまたぐ位置にプライマーを設定できない場合などには、混入したゲノム DNA に由来する偽陽性シグナルが発生する可能性があります。必要に応じて、DNase I 等を用いてゲノム DNA を除去してください。あるいは、ゲノム DNA 除去機能を持つ弊社姉妹品 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code No. FSQ-301)をご使用ください。

- ・poly(A)⁺ RNA (mRNA)

poly(A)⁺ RNA は、oligo(dT)とのハイブリダイゼーションを利用して poly(A)⁺末端を有する mRNA のみを選択的に分離したものです。精製段階で mRNA を濃縮できるため、mRNA を高感度で検出したい場合に有用です。しかしながら、Total RNA と比較してリボヌクレアーゼ(RNase)による分解を受けやすい、ribosomal RNA を内部参照とした相対定量ができないなどの短所があります。

[4] 使用方法

(1) RNA の変性(オプション)*

RNA を 65°C で 5 分間インキュベートし、氷上で急冷します。

*この処理を行うことで、高次構造を取り易い RNA に対する逆転写効率が向上する場合がありますので、初めて実験される際には条件検討されることをお勧めします。(この処理を行う場合は、必ず 5x RT Master Mix を添加する前に行ってください。)

(2) 反応液の調製

氷上にて、以下のように反応液を調製します。

5x RT Master Mix	2 μ l
RNA template	1pg~1 μ g
Nuclease-free Water	
<hr/>	
Total	10 μ l

- ・ここで、逆転写(ー)のコントロールをとる場合は、5x RT Master Mix の代わりに 5x RT Master Mix no-RT Control を用います。逆転写(ー)のコントロールをとることによって、シグナルが cDNA に由来するか否かを確認することができます。
- ・必要に応じて、適宜スケールアップすることも可能です。

(3) 逆転写反応

反応液を軽く攪拌して均一にした後、以下の温度でインキュベートします。

37°C, 15min.	} (逆転写反応)
50°C, 5min. (オプション)**	
98°C, 5min.	(酵素失活反応)
4°C, hold	

** ReverTra Ace[®] は、高温反応性に優れるように改良されています。本工程を入れることにより逆転写効率が向上する場合があります。

反応終了後は、4°C または -20°C で保存します。リアルタイム PCR 実施の際は、鑄型として反応液に直接または希釈して添加してください。

- ・逆転写反応液のリアルタイム PCR 反応液への添加量は、最大で 20%程度としてください。多量の添加は PCR の反応効率を低下させ、正確な定量ができないことがあります。

[5] Appendix

A. 実験例

<方法>

cDNA 合成

試薬: 本試薬 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (Code No.FSQ-201)

鋳型: HeLa total RNA 2pg-2μg /20μl 反応系

リアルタイム PCR

試薬: THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix (Code No.QPS-201)

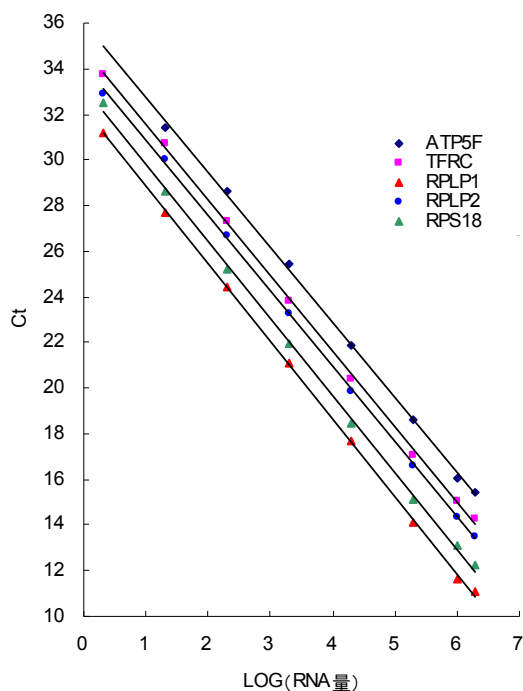
鋳型: 上記 cDNA 2μl/20μl 反応系(持込量 10%)

プライマー: 代表的な House Keeping Gene をターゲットとした 5 種類

測定: Applied Biosystems 7900HT

<結果>

Template RNA量(pg)	Log(RNA量)	qPCR での各TargetのCt値				
		ATP5F	TFRC	RPLP1	RPLP2	RPS18
2	0.301		33.76	31.16	32.89	32.54
20	1.301	31.43	30.73	27.70	30.05	28.65
200	2.301	28.64	27.29	24.44	26.72	25.22
2,000	3.301	25.41	23.79	21.12	23.31	21.98
20,000	4.301	21.86	20.43	17.69	19.88	18.42
200,000	5.301	18.65	17.09	14.14	16.59	15.10
1,000,000	6.000	16.03	15.03	11.63	14.37	13.09
2,000,000	6.301	15.42	14.28	11.11	13.53	12.28
/20μl	Slope	-3.280	-3.303	-3.384	-3.284	-3.368
	R2	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999
	Eff.	101.8%	100.8%	97.5%	101.6%	98.1%



5 種類のターゲットに対して、検量線が交差することなく、かつ高い直線性を示しました。このことから、広いRNA濃度範囲にわたって、同等な効率にて逆転写ができていることが分かります。

B. 関連プロトコール (Total RNA の DNase I 処理)

AGPC 法などにより精製された Total RNA にはゲノム DNA が混入している場合があります。ゲノム DNA 由来の偽陽性シグナルが発生する可能性がある場合には(p.3 参照)、下記の方法によりゲノム DNA を除去してください。あるいは、ゲノム DNA 除去機能を持つ弊社姉妹品 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301)をご使用ください。

(1) 反応液調製と反応(一例)

Total RNA (<10µg)	X µl
10x DNase I Buffer (10mM Tris-Cl, pH7.6, 2.5mM MgCl ₂ , 0.5mM CaCl ₂)	1 µl
RNase-free DNase I (10U/µl)	0.5 µl
Nuclease-free Water	to 10 µl

上記反応組成液を調製し、氷上で 10 分から 30 分間静置して反応させます。

(2) 精製 (市販の精製キットを用いることもできます)

反応液に 100µl の Nuclease-free Water、100µl の TE 飽和フェノールを添加し、ボルテックス等で混合した後、氷上で 5 分間静置します。

↓

12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を回収します。

↓

100µl のクロロホルムを添加し、混合します。

↓

12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を回収します。

↓

100µl の 5M 酢酸アンモニウム、200µl のイソプロパノールを添加し、混合した後、-20°C で 30 分間静置します。

↓

12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を廃棄します。

↓

沈殿に 70%エタノールを加えます。

↓

12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を廃棄します。

↓

沈殿に適量の Nuclease-free Water を加え、溶解します。

[6] トラブルシューティング

現象	原因	対策
リアルタイム PCR でシグナルが出ない、あるいは遅れて検出される	RNA の純度が低い	RNA 調製時に残留した不純物によって逆転写反応が阻害されている可能性があります。鑄型 RNA を再精製してください。
	RNA が分解している	RNase の混入によって RNA が分解している可能性があります。RNA の再調製を行ってください。また RNA を低濃度で保存した場合、RNase による分解をより受けやすくなるほか、反応容器への吸着によって実質的な RNA 量が減少する場合があります。希釈した RNA は、使用後に凍結保存して再使用することは避け、毎使用時に高濃度保存液から調製することをおすすめします。
	RNA の量が少なすぎる、あるいは多すぎる	本製品では、およそ 1pg から 1µg までの RNA (10µl 反応系) を用いた場合に安定的な効率で逆転写が可能であることを確認していますが、RNA の種類や品質によっては、反応可能な RNA 量は変動する可能性があります。鑄型 RNA の添加量を増減させてください。
	RNA が立体構造を取り易い	高次構造を取り易い RNA の場合、逆転写が阻害される場合があります。逆転写反応を行う前に、RNA を 65°C で 5 分間インキュベートし、氷上で急冷してから使用してください。また(あるいは)、37°C、15 分間の逆転写反応の後に、50°C、5 分間の反応を追加してください。
	反応温度が不適切	反応条件の変更は、プライマーのアニーリング効率、酵素活性、逆転写反応後の酵素失活、鑄型 RNA の除去効率など広範囲に影響します。反応温度は必ず本説明書に記載の条件に従って実施してください。
	逆転写反応液の添加量が多すぎる	本製品では、逆転写反応液を PCR 反応液へ最大 20% 添加しても直線性には問題がないことを確認していますが、使用する PCR 試薬の性質によっては、この値は低下する可能性があります。逆転写反応液の添加量を減らしてください。
リアルタイム PCR で no-RT Control を用いた反応液に増幅が見られる	RNA にゲノム DNA が混入している	RNA に混入しているゲノム DNA が鑄型になっている可能性があります。ゲノム DNA 由来の増幅がおこらないようにプライマーを再設計してください。あるいは、鑄型 RNA に対して DNase I 処理を行い、ゲノム DNA を除去した後、再度逆転写反応を行ってください。
	プライマーダイマーの発生	融解曲線分析において、no-template control のピークが標的配列よりも低温側に存在する場合は、プライマーダイマーの発生が疑われます。プライマーダイマーは、プライマー配列のほか、プライマーの品質不良によっても発生する可能性があります。まず PCR 反応条件の再検討を行い、改善が見られない場合には、プライマーの再設計や再合成を検討してください。また、再合成の際は、精製グレードを HPLC 以上にしてください。

[7] 関連商品

リアルタイム PCR 用 cDNA 合成試薬

品名	容量	Code No.
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成キット ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit	200 回用	FSQ-101
ゲノム DNA 除去試薬をプラスしたリアルタイム PCR 用 cDNA 合成試薬 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200 回用	FSQ-301

リアルタイム PCR 試薬

品名	容量	Code No.
各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出系用 リアルタイム PCR 試薬 THUNDERBIRD[®] Probe qPCR Mix	1ml x 1 (40 回用)	QPS-101T
	1.67ml x 3 (200 回用)	QPS-101
SYBR [®] Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix	1ml x 1 (40 回用)	QPS-201T
	1.67ml x 3 (200 回用)	QPS-201

※THUNDERBIRD[®] qPCR Mix では、50X ROX reference dye が別容器で添付されています。

※容量は、50μl 反応の場合の反応回数です。

※1000 回用の QPS-101X5、QPS-201X5 (QPS-101 または QPS-201 の 5 セット組) もご用意しています。

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆
<http://www.toyobo.co.jp/bio>



【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>