

ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover

(Code No. FSQ-301)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A4633K

— 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 | 6 |
| [6] トラブルシューティング | 8 |
| [7] 関連商品 | 9 |

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 with gDNA Remover は、ゲノム DNA (gDNA)除去反応をプラスした、リアルタイム PCR 用逆転写反応キットです。高効率逆転写酵素「ReverTra Ace[®]」を使用しています。

リアルタイム PCRによる遺伝子発現解析では、cDNAのみを検出することが重要です。しかし、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、多くの場合、微量の gDNA が混入します。検出するターゲットに偽遺伝子が存在する場合や、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、この混入した gDNA を鋳型にした増幅が起こり、正確な定量が阻害されることがあります。

本試薬では、強力な DNA 分解活性を有する gDNA Remover により鋳型 RNA に混入している gDNA を分解した後、精製することなく RNA の逆転写を行うことで、gDNA フリーの cDNA を簡便に調製することができます。また、それぞれの反応に用いる試薬は、プレミックスタイプとなっておりますので容易に反応液を調製することができます。

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. 簡便、迅速にゲノム DNA 除去と cDNA 合成を実現

DNA 除去反応試薬と逆転写反応試薬を順次添加するだけの約 20 分の操作で、ゲノム DNA (gDNA)の除去と cDNA 合成が可能です。

2. プレミック試薬

DNA 除去反応試薬と逆転写反応試薬は、共に-20℃においても凍結しないプレミックスタイプの試薬となっています。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。

3. RNA の全領域を均一に逆転写

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と、最適な混合比を持つプライマーミックス(Oligo dT と Random Primer)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。

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 II 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 |
|----------------------------------------|--------------------|-----------|
| gDNA Remover | -20°C | 10µl |
| 4x DN Master Mix | -20°C | 440µl |
| 5x RT Master Mix II ^(注2, 3) | -20°C | 400µl |
| 5x RT Master Mix II no-RT Control | -20°C | 40µl |
| Nuclease-free Water | -20°C | 1000µl x2 |

gDNA Remover

本キットに最適化したDNase Iです。4x DN Master Mixに50分の1量の割合で添加して使用します。液量が微量ですので、使用する前にスピンドウンしてご使用ください。

4x DN Master Mix

RNase inhibitor及び反応バッファーを含む4x濃度のマスターミックスです。最初にお使いになる際に、チューブ全量の4x DN Master Mix (440µl)に対し8.8µl(50分の1量)のgDNA Removerを添加し、転倒攪拌にてよく混和した後、ご使用ください。このgDNA Removerを加えた4x DN Master Mixは、-20°Cにて少なくとも3ヶ月間は安定に保存することができます。なお、短期間で使い切らない場合は、小さい単位で適宜混合してご使用ください(例:4x DN Master Mix 220µl + gDNA Remover 4.4µl)。

5x RT Master Mix II

高効率逆転写酵素 ReverTra Ace[®]、Random Primer、Oligo dT Primer、反応バッファー、dNTPsなどを含んだ5x濃度のマスターミックスです。

5x RT Master Mix II no-RT Control

5x RT Master Mix II 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。

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) 長期に渡って保管される場合は、-80°Cに保存してください。この場合、試薬は凍結しますが、10 回程度の凍結融解の繰り返しは、品質に影響がないことが確認されています。ご使用になられる際は、融解後、穏やかに試薬を均一化してからご使用ください。

注 2) 逆転写反応には、4x DN Master Mix から持ち越される成分が必要なため、5x RT Master Mix II 単独では使用できません。4x DN Master Mix を用いた gDNA 除去反応は必ず行ってください。

注 3) 本キット付属の 5x RT Master Mix II は、弊社姉妹品 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (Code No.FSQ-201)に含まれる 5x RT Master Mix とは組成が異なります。必ず、本キット付属の 5x RT Master Mix II をご使用ください。

注 4) いずれの試薬も、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、Nuclease-free Water 以外の試薬は、粘性がありますので、ゆっくりとピペッティングを行ってください。

注 5) 本試薬は、逆転写プライマー(Random Primer 及び Oligo dT Primer)を含む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。

[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用意ください。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。

[4] 使用方法

(1) 4x DN Master Mix と gDNA Remover の混合 (初回ご使用時のみ)

チューブ全量の 4x DN Master Mix (440 μ l) に対し、8.8 μ l (50 分の 1 量) の gDNA Remover を添加し、転倒攪拌にてよく混和します。この gDNA Remover を加えた 4x DN Master Mix は、-20 $^{\circ}$ C にて少なくとも 3 ヶ月間は安定に保存することができます。

- ・短期間で使い切らない場合は、小さい単位で適宜混合してご使用ください。
(例: 4x DN Master Mix 220 μ l + gDNA Remover 4.4 μ l)

(2) RNA の変性 (オプション)*

RNA を 65 $^{\circ}$ 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 4x DN Master Mix を添加する前に行ってください。)

(3) ゲノム DNA 除去反応 (DNase 反応)

氷上にて、以下のように反応液を調製します。

| | |
|--------------------------------------|-------------------|
| 4x DN Master Mix (gDNA Remover 添加済み) | 2 μ l |
| RNA template | 0.5pg~0.5 μ g |
| Nuclease-free Water | |
| Total | 8 μ l |

反応液を軽く攪拌して均一にした後、37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートします。

- ・必要に応じて、適宜スケールアップすることも可能です。

(4) 逆転写反応

引き続き、氷上にて、以下のように反応液を調製します。

| | |
|---------------------|------------|
| (3)の反応液 | 8 μ l |
| 5x RT Master Mix II | 2 μ l |
| Total | 10 μ l |

- ・ここで、逆転写(-)のコントロールをとる場合は、5x RT Master Mix II の代わりに 5x RT Master Mix II no-RT Control を用います。逆転写(-)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。

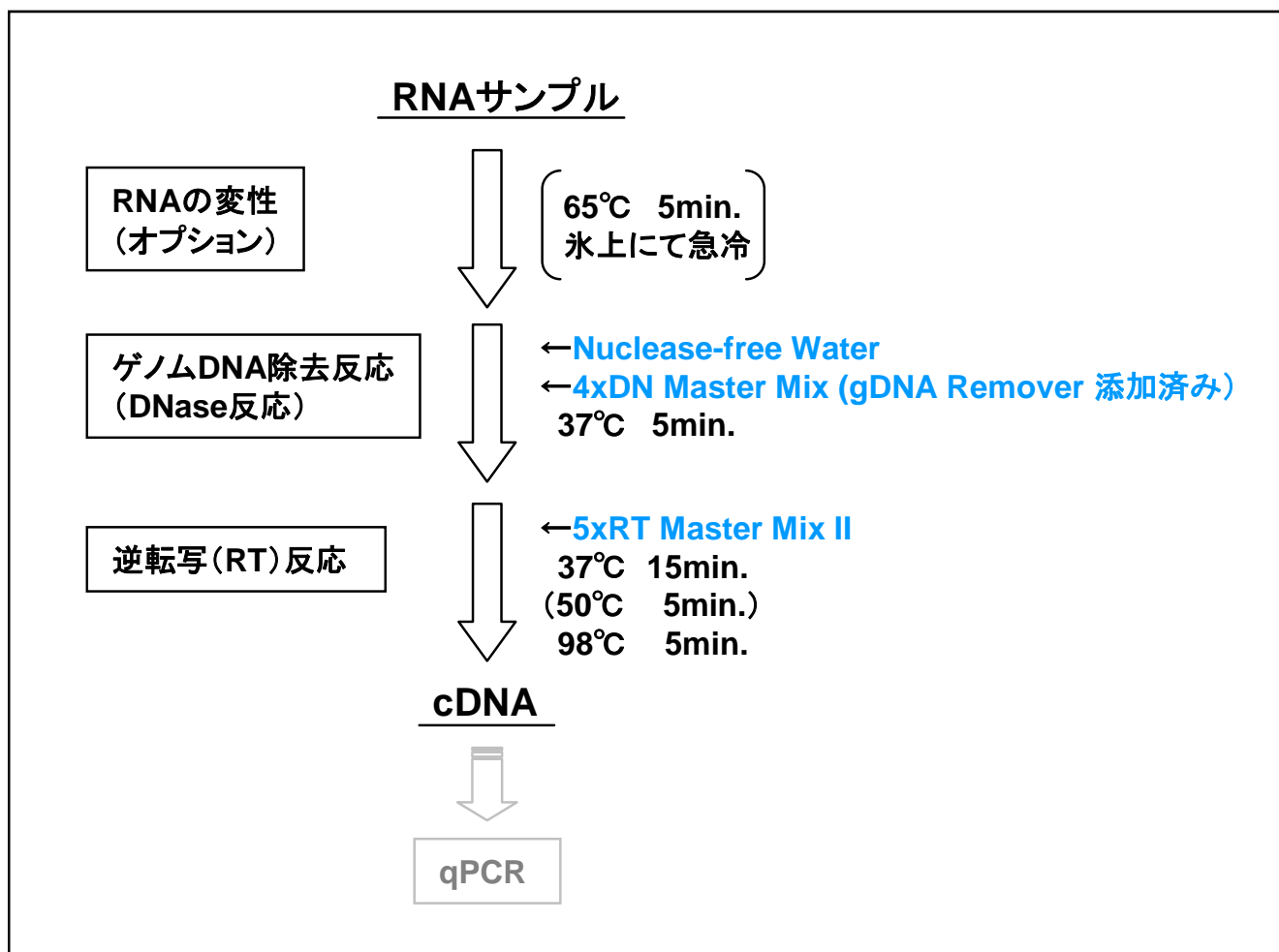
反応液を軽く攪拌して均一にした後、以下の温度でインキュベートします。

| | | |
|-----------------------|---|----------|
| 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、鋳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

実験例 1: gDNA 除去効果の確認

<方法>

cDNA 合成

試薬: 本試薬 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No.FSQ-301)

鋳型: 自家調製した HeLa total RNA 0.5µg /10µl 反応系

条件: gDNA Remover 添加(+), あるいは無添加(-) の 4x DN Master Mix を用いて gDNA 除去反応を行った後、それぞれをさらに、5x RT Master Mix II あるいは 5x RT Master Mix II no-RT Control を用いて逆転写反応を行いました。

| | 4x DN Master Mix | 5x RT Master Mix |
|---|------------------|------------------|
| ① | - gDNA Remover | - RTase |
| ② | - gDNA Remover | + RTase |
| ③ | + gDNA Remover | - RTase |
| ④ | + gDNA Remover | + RTase |

リアルタイム PCR

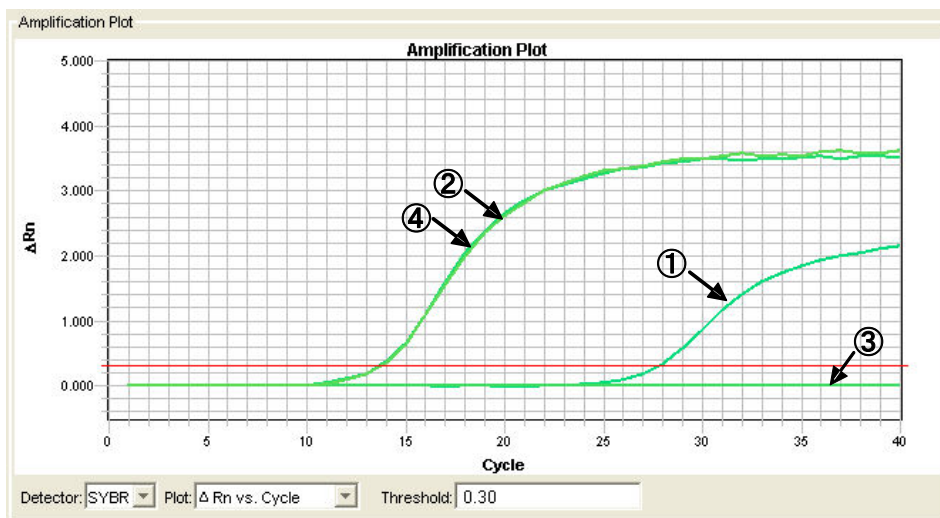
試薬: THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No.QPS-201)

鋳型: 上記 cDNA 2µl/20µl 反応系(持込量 10%)

Target: ACTB(188bp)

測定: Applied Biosystems 7900HT

<結果>



③の条件では、増幅が見られないことから、確実にゲノム DNA が除去されていることが確認できます。

実験例 2: cDNA 合成量(検量線)の比較

<方法>

cDNA 合成

試薬:

本試薬 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No.FSQ-301)
及び

ゲノム DNA 除去機能を持たない姉妹品 ReverTra Ace[®] qPCR RT kit (Code No.FSQ-101)

鋳型: HeLa total RNA 1pg, 10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng, 1µg /20µl 反応系
(FSQ-301 のみヒトゲノム DNA 100ng を反応系に添加)

リアルタイム PCR

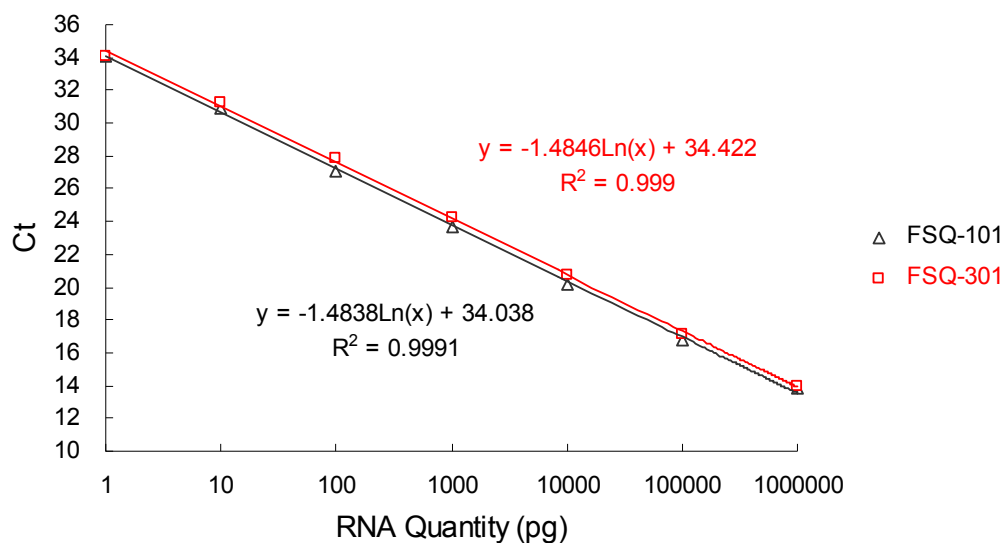
試薬: THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix (Code No.QPS-201)

鋳型: 上記 cDNA 2µl/20µl 反応系(持込量 10%)

Target: GAPDH(65bp)

測定: Applied Biosystems 7900HT

<結果>



ゲノム DNA 除去機能を持たない FSQ-101 と同等に、高い直線性が得られました。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 0.5pg から 0.5µg 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 | 添加量が多すぎる場合、PCR 反応が阻害される可能性があります。逆転写反応液のリアルタイム PCR 反応液への添加量は、PCR 反応液の液量の 10% 以下にしてください。 |
| 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 に過剰のゲノム DNA が混入している | 本製品では、およそ 50ng までのゲノム DNA の除去が可能であることを確認しています (10µl 反応系) が、鑄型 RNA に過剰のゲノム DNA が混入している場合には、完全には除去できない可能性があります。別途、DNase I 処理を行い、鑄型 RNA の再精製を行ってください。 |
| | 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 |
| リアルタイム PCR 用 cDNA 合成マスターミックス ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix | 200 回用 | FSQ-201 |

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ます。

※容量は、50 μ l 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>