



プローブ検出用リアルタイム PCR Kit

Hot Start TTx (DNA) Kit

本試薬は、弊社独自の酵素である TTx DNA Polymerase を使用したリアルタイム PCR 試薬です。

TTx DNA Polymerase は、汎用酵素である Taq DNA Polymerase と比べ増幅効率が高く、高速サイクルでの PCR や PCR 阻害物質を含むクルードサンプルからの増幅が可能です。

TTx DNA Polymerase は、5'→3' Exonuclease 活性を有するため、TaqMan[®]アッセイなどのプローブアッセイを用いたリアルタイム PCR にご使用になれます。本試薬には、中和抗体が混合されており、特異性の高い Hot start PCR を行うことができます。

特長

● 優れた DNA 増幅効率

弊社独自の酵素である TTx DNA Polymerase をベースに反応組成を最適化しました。TTx DNA Polymerase は汎用酵素である Taq DNA Polymerase や Tth DNA Polymerase に比べ伸長性が高く、効率的な増幅が可能です。

● 高速サイクルで検出可能

高い増幅効率を活かし、短時間の反応サイクルでも効率的な増幅が可能です。

● クルードサンプルに強い

PCR 阻害物質を含むクルードなサンプル（生体試料、土壌、食品など）からの増幅に優れます。血液などでは、核酸を抽出することなく直接反応液に加えるだけで十分な増幅が可能です。

● マルチプレックス PCR が可能

検出波長の異なる TaqMan[®] Probe を使用することで、複数のターゲットを同時に検出することが可能です。同一反応内でコントロール遺伝子と標的遺伝子を検出することができ、迅速、簡便に正確性の高い遺伝子定量が可能です。

● dUTP 含有

本試薬の 2× Buffer for rTth/ TTx (DNA) 中には dUTP が含まれています。Uracil-N-Glycosylase(UNG)*を添加することで、キャリアオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止することができます。

* UNG は本製品中には含まれません。別売りの Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (Code No. UNG-101)をご使用になれます。

● 高速ホットスタート

抗 DNA ポリメラーゼ抗体を用いたホットスタートシステムを採用しています。抗体を用いたホットスタートは非特異反応の抑制に強力な効果を示し、また、加熱によって速やかに抗体が失活するため、酵素の再活性化も迅速であり、酵素への高温によるダメージを最小限に抑えることができます。

本製品は、Chakrabarti Advanced Technology NewCo LLC.より US7772383 のライセンスを受け、販売しております。

TaqMan[®]、LightCycler[®]は、Roche Diagnostics K.K.の登録商標です。

TOYOBO

<製品の内容・技術に関するお問合せ>

東洋紡 (株) バイオプロダクト営業部 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 (土日祝日、休日を除く)

E-mail: tech_osaka@toyobo.jp

[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>

A5887K

①

1. 内容物

| 品名 | 内容量 (250 回用/20 μ L 反応) | 保存温度 |
|--|----------------------------|------------------|
| 2 \times Buffer for rTth/ TTx (DNA) | 2 \times 1.25 mL | -20 $^{\circ}$ C |
| Hot Start TTx DNA Polymerase (4U/ μ L) | 62.5 μ L | -20 $^{\circ}$ C |

リアルタイム PCR にご利用いただく場合：本試薬には、パッシブリアレンス用蛍光色素(ROX)は含まれておりません。Applied Biosystems 社製機器や Agilent Technologies 社製機器などでウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のためパッシブリアレンスを使用する場合は、別売品である 50 \times ROX reference dye(Code No. ROX-101)をお使いください。

2 \times Buffer for rTth/ TTx (DNA)

緩衝材、塩、Mg²⁺、dATP、dCTP、dGTP、dUTP などを含む、2 \times 濃度の反応溶液です。

鋳型 DNA、プライマー、添付の Hot Start TTx DNA Polymerase を加え、滅菌水などで 1 \times 濃度に調製して使用してください。

融解後はよく混和し、均質化した上で使用してください。

Hot Start TTx DNA Polymerase

TTx DNA Polymerase とホットスタート用抗体を含む酵素溶液です。4U/ μ L の濃度に調製されています。

2. 安全上の注意

本製品は、研究用試薬です。診断および臨床検査用試薬として使用しないでください。また、本製品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。関係する実験において、人体に有害な試薬を扱う場合も予想されます。各試薬に添付されている注意書き、機器・器具に添付されている取扱説明書の指示を順守し、必要に応じて適切な保護具をご使用になりますようお願いいたします。

3. 反応液の調製

20 μ L 反応での試薬調製例です。

- ・凍結している試薬は完全に融解してからご使用ください。
- ・反応液を調製する前に各試薬を十分混合してからご使用ください。

| Components | Volume | Final Concentration |
|--|----------------------------|---------------------|
| 2 \times Buffer for rTth/ TTx (DNA) | 10 μ L | 1 \times |
| PCR Forward Primer(10 μ M) | 0.6 μ L | 0.3 μ M |
| PCR Reverse Primer(10 μ M) | 0.6 μ L | 0.3 μ M |
| TaqMan [®] Probe(10 μ M) | 0.4 μ L | 0.2 μ M |
| Hot Start TTx DNA Polymerase (Uracil-N-Glycosylase) | 0.25 μ L (0.4units) | 1U |
| Sample | X μ L | |
| Autoclaved, distilled water | to 20 μ L | |

全ての液を添加した後、反応液を十分混合してからサーマルサイクラーにセットしてください。

プライマーの添加量は各々最終濃度 0.2-0.6 μ M、TaqMan[®] Probe の添加量は最終濃度 0.05-0.3 μ M を目安にご検討ください。増幅効率がよくない場合、添加量を増やすことによりパフォーマンスが向上する場合がありますが、逆に入れすぎると非特異反応の原因となり、検出感度が低下する場合があります。

高速サイクルやクルードサンプルからの検出において、増幅効率がよくない場合、酵素量を増やす(最大 2 倍量) ことにより改善する場合があります。

4. 反応条件

qPCR のサイクル例です。必要に応じて条件を調整してください。

| | | |
|------------------------|---------------|-------------------|
| Pre-denature : | 95°C, 1 min. | |
| Denature : | 95°C, 15 sec. | ← 40~50 cycles |
| Annealing/ Extension : | 60°C, 30 sec. | |

UNG 処理を行う場合は、Pre-denature 反応の前に、UNG 反応のステップを設定してください。UNG の反応は各社の推奨条件に従って調整してください。

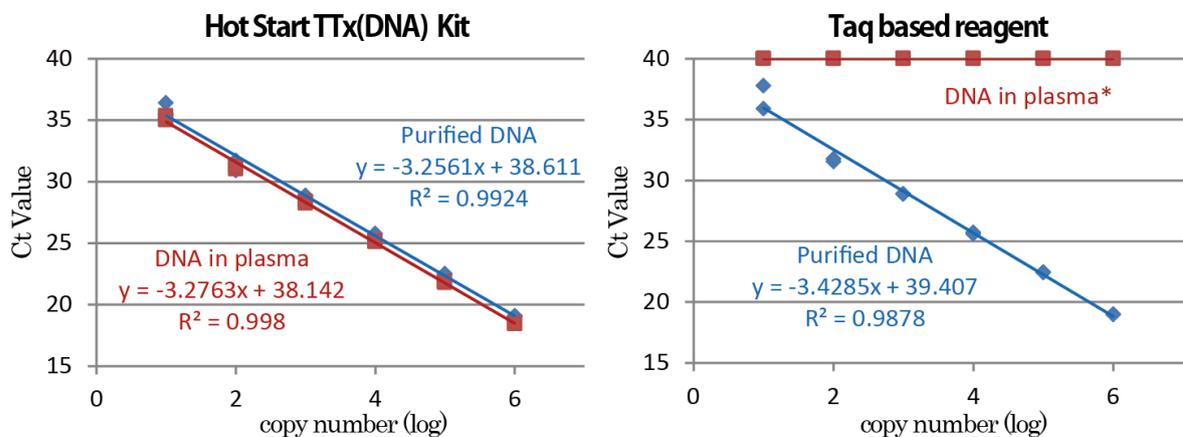
Annealing/ Extension の温度は、55~65°C の範囲で検討いただくと検出感度等が改善する場合があります。

リアルタイム PCR 装置によっては、高速サイクルでの増幅が可能です。

Denature 時間を最短 1 秒、Annealing/Extension 時間を最短 1 秒で検出できる場合もありますので、Denature および Annealing/Extension 時間をご検討ください。

5. 実施例

実施例 1 : TaqMan[®] Probe 用いて、アフリカ豚コレラウイルスの DNA の検出を 4. 反応条件 qPCR のサイクル例に従い、実施しました。20 μ L の反応液に 2.5 μ L の血漿ありなしで反応を比較した結果、Taq DNA Polymerase ベースの試薬では血漿の阻害を受け、増幅が確認できませんでした。一方、本試薬においては、血漿の阻害を受けることなく増幅が可能でした。本試薬では DNA を精製することなく増幅することができるため、迅速な遺伝子検査が可能になります。



※増幅がみられなかったものを Ct=40 とした。

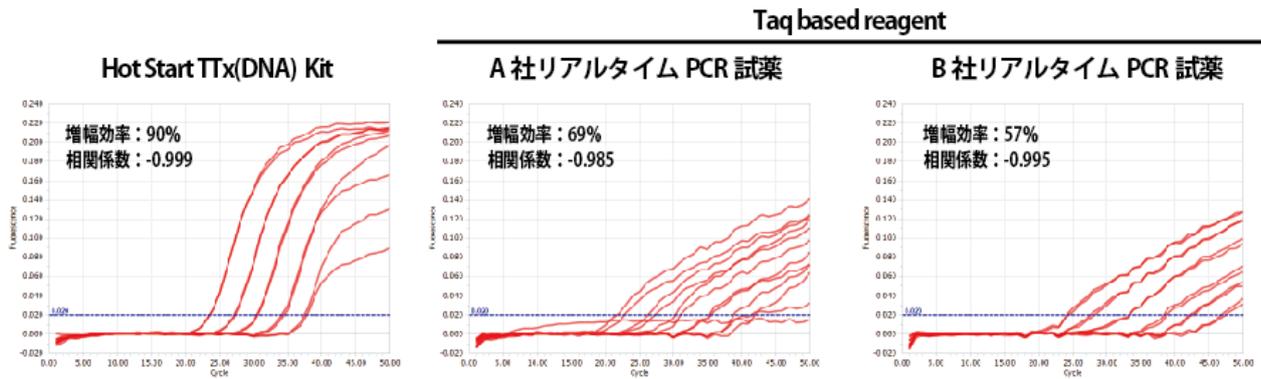
実施例2 : TaqMan® Probe を用いて、アフリカ豚コレラウィルスの DNA (10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ コピー) の検出を高速サイクルで実施しました。その結果、Hot Start TTX(DNA)のみ高速サイクル条件下で効率的な増幅が可能でした。

サイクル条件

| | | |
|------------------------|--------------|------------|
| Pre-denature : | 95°C, 1 min. | } 50cycles |
| Denature : | 95°C, 1 sec. | |
| Annealing/ Extension : | 60°C, 1 sec. | |

装置

Roche LightCycler® 96



6. 関連商品

| 品名 | 包装 | Code No. |
|--|----------------|-----------|
| <高効率 PCR・RT-PCR 用酵素> Hot Start TTX DNA Polymerase | 10,000 U × 1 本 | HSTTX-129 |
| <DNA 増幅用 rTth/ TTx 反応 Buffer (Mg ²⁺ 含有)> 2 × Buffer for rTth/ Ttx (DNA) | 100 mL × 1 本 | QRZ-1B1 |
| <パッシブリアレンス> 50 × ROX reference dye | 5 mL × 1 本 | ROX-101 |
| <熱感受性(Heat-labile) UNG> Uracil-DNA Glycosylase(UNG), Heat-labile | 200U × 1 本 | UNG-101 |
| <高効率 PCR・RT-PCR 用酵素> Hot Start rTth DNA Polymerase | 10,000 U × 1 本 | HSTTH-329 |
| <DNA・RNA 増幅用 rTth/ TTx 反応 Buffer (Mg ²⁺ , Mn ²⁺ 不含)> 5 × Buffer for rTth/ Ttx (DNA/ RNA)* | 40 mL × 1 本 | QRT-1B1 |
| <RNA 増幅用マンガンを溶液> 50 mM Mn (OAc) ₂ | 5 mL × 1 本 | QRT-MN1 |
| <DNA 増幅用マグネシウム溶液> 25 mM MgCl ₂ | 40 mL × 1 本 | TAP-2S1 |

*50 mM Mn (OAc)₂, または 25 mM MgCl₂ とあわせて、ご使用ください。

※弊社ウェブサイトの製品ページに本製品の実施例を掲載しております。ご確認ください。

https://lifescience.toyobo.co.jp/detail/detail.php?product_detail_id=263

【製造・販売元】

—価格・在庫に関するお問い合わせ—

TOYOBO

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (大阪)
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目 13 番 1 号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (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