

プローブ検出用 1-step qRT-PCR Kit

Hot Start TTx (RNA) Kit

本試薬は、弊社独自の酵素である TTx DNA Polymerase を使用した 1-step qRT-PCR 試薬です。TTx DNA Polymerase は逆転写活性を持ち、その活性は Mn^{2+} 存在下にて強く促進されます。この性能を利用して、逆転写反応と PCR を同一の酵素で行うことができます。TTx DNA Polymerase は逆転写活性を持つため、DNA・RNA どちらからでも高い増幅効率で増幅が可能です。また 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 にも利用することができます。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

● 高効率な 1 酵素系・1-step RT-PCR が可能

TTx DNA Polymerase は高い逆転写活性を持ち、微量の鋳型からでも効率よく RT-PCR を行うことができます。また、本試薬は DNA の検出にもご利用になれます。

● 高い温度で逆転写が可能

60°Cにおいて逆転写が可能なため、GC リッチな配列や高次構造をとりやすいターゲットの増幅に適しています。

● 高速サイクルで検出可能

TTx DNA Polymerase は増幅効率が高いため、短時間の反応サイクルでも効率的な増幅が可能です。

● 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。

1. 内容物

品名	内容量 (250 回用/20 μL 反応)	保存温度
5 \times Buffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA)	1 mL	-20 $^{\circ}\text{C}$
2mM dNTPs	1 mL	-20 $^{\circ}\text{C}$
50mM Mn(OAc) ₂	250 μL	-20 $^{\circ}\text{C}$
Hot Start TTx DNA Polymerase (4U/ μL)	62.5 μL	-20 $^{\circ}\text{C}$

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。

5 \times Buffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA)

緩衝剤、塩類を含む、5 \times 濃度の反応溶液です。添付の dNTP、Mn(OAc)₂ 溶液、Hot Start TTx DNA Polymerase、及び鋳型 DNA または RNA、プライマーを加え、滅菌水などで 1 \times 濃度に調製して使用してください。

<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/>

A5888K

2 mM dNTPs

dATP、dGTP、dCTP、dTTP を各 2 mM ずつ含む溶液です。

50 mM Mn(OAc)₂

反応に必要なマンガンイオンの溶液です。

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/μL 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 μL 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
5 × Buffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA)	4 μL	1 ×
2 mM dNTPs	4 μL	0.4 mM
50 mM Mn(OAc) ₂	1 μL	2.5 mM
PCR Forward Primer (10 μM)	0.6 μL	0.3 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.6 μL	0.3 μM
TaqMan [®] Probe (10 μM)	0.4 μL	0.2 μM
Hot Start TTx DNA Polymerase	0.25 μL	1U
Template RNA or DNA (Sample)	X μL	
Autoclaved, distilled water	to 20 μL	

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 0.2-0.6μM、TaqMan[®]Probe の添加量は最終濃度 0.05-0.3μM 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。

Mn(OAc)₂ 添加量は最終濃度 2.5 mM を基本としていますが、RNA サンプルの濃度や増幅ターゲットの配列によっては Mn(OAc)₂ 濃度を増減させることにより、より良好な結果を得ることがある場合があります。高速サイクルにおいて、増幅効率がよくない場合、酵素量を増減させることにより改善する場合があります。

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

4. 反応条件

qRT-PCR 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。

Predenature 1 :	90°C, 30 sec.	
Reverse Transcription :	60°C, 5 min.	
Predenature 2 :	95°C, 1 min.	
Denature :	95°C, 15 sec.	← 40~50 cycles
Annealing/ Extension :	60°C, 30 sec.	

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。

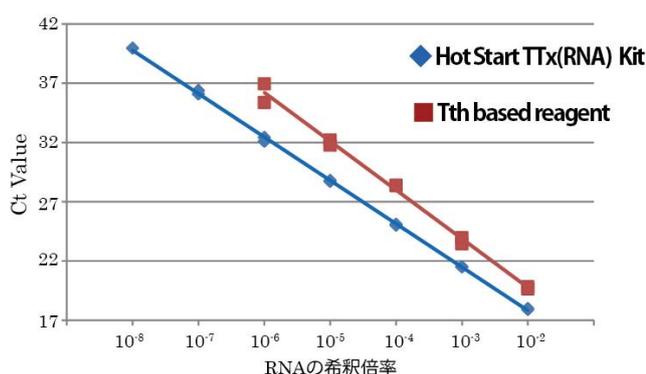
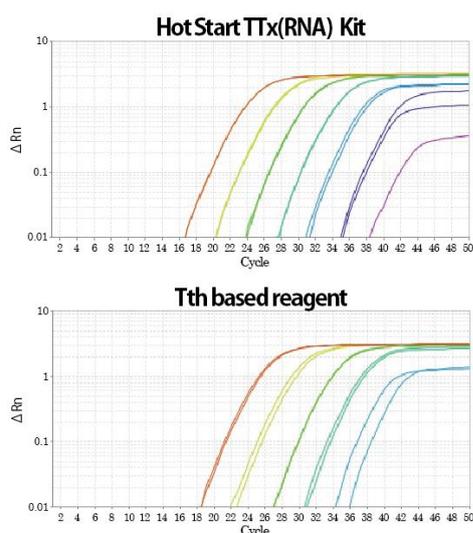
Denature 時間を最短 1 秒、Annealing/Extension 時間を最短 1 秒で検出できる場合もありますので、Denature および Annealing/Extension 時間をご検討ください。

5. 実施例

実施例 1 : TaqMan® Probe を用いて、インフルエンザウイルス RNA を検出しました。20 μL の反応液に 1 μL の希釈した精製 RNA を添加し反応に供した結果、本試薬では Tth DNA Polymerase ベースの試薬より高い感度が得られました。TTx DNA Polymerase を用いることで、微量の鋳型からでも効率よく検出が可能です。

サイクル条件

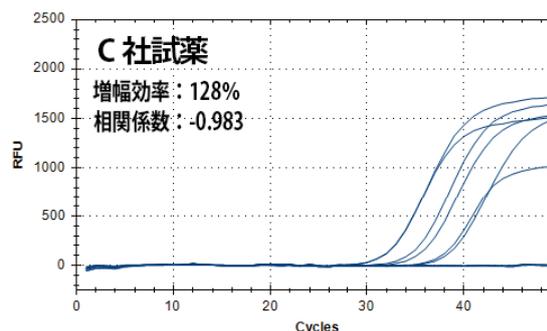
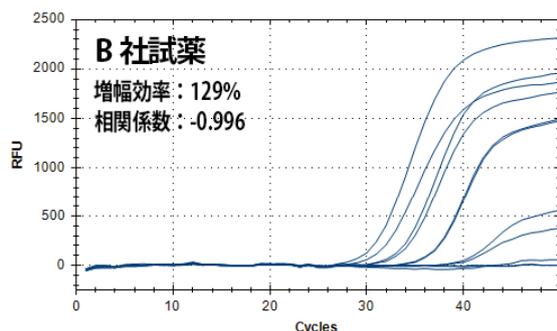
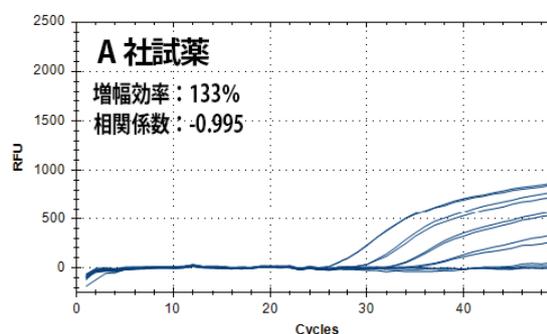
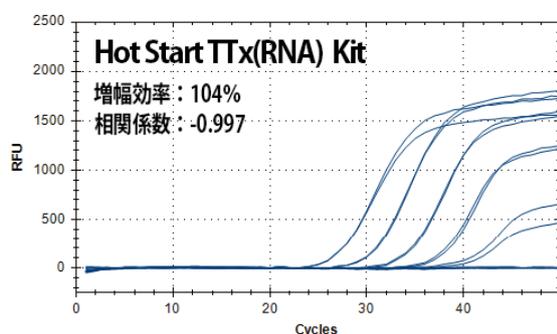
Predenature 1 :	90°C, 30 sec.	
Reverse Transcription :	60°C, 5 min.	
Predenature 2 :	95°C, 1 min.	
Denature :	95°C, 15 sec.	← 50cycles
Annealing/ Extension :	60°C, 30 sec.	



実施例 2 : TaqMan® Probe を用いて、Hot Start TTx(RNA) Kit および 1 酵素系・1-step qRT-PCR 試薬にてインフルエンザウイルス RNA を高速サイクルにて検出しました。その結果、Hot Start TTx(RNA) Kit のみ効率的な増幅が可能でした。

サイクル条件

Pre-denaturation 1 :	90°C, 30 sec.	50cycles
Reverse Transcription :	60°C, 1 min.	
Pre-denaturation 2 :	95°C, 1 min.	
Denature :	95°C, 3 sec.	
Annealing/ Extension :	60°C, 5 sec.	



※弊社ウェブサイトの商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=264

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・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 増幅用マンガン溶液> 50 mM Mn (OAc) ₂	5 mL × 1 本	QRT-MN1
<パッシブリアレンス> 50 × ROX reference dye	5 mL × 1 本	ROX-101
<高効率 PCR・RT-PCR 用酵素> Hot Start rTth DNA Polymerase	10,000 U × 1 本	HSTTH-329
<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
<DNA 増幅用マグネシウム溶液> 25 mM MgCl ₂	40 mL × 1 本	TAP-2S1

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

【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