24-06

高効率 One-step qRT-PCR Kit

THUNDERBIRD®
Probe One-step qRT-PCR Kit

(Code No. QRZ-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

A5208K

ー 目 次 ー

[1] はじめに ・・・2

[2] 製品内容 ・・・3

[3] 製品のほかに用意するもの ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4

[4] 使用方法 ・・・6

1. プライマーおよび TaqMan® probe の設計方法と性能の確認 ・・・・6
2. 反応液の調製 ・・・7
3. サイクル条件設定 ・・8

[5] 各機器におけるサイクル条件設定例 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9

1. Applied Biosystems® StepOnePlus™ ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9
2. LightCycler®96 ・・・10
3. CFX96 Touch™ Deep Well ・・・11

[6] 最適な反応条件の検討方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12

1. 条件検討の手順 ・・12
2. 伸長(アニーリング)温度・時間の検討方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12
3. プライマー・TaqMan® probe 濃度の検討方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14

[7] 実施例 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

[1] はじめに

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit は、逆転写酵素として高効率逆転写酵素 ReverTra Ace®と PCR 酵素として Tth DNA Polymerase を用いた 2 酵素系によるワンステップリアルタイム PCR 用キットです。主に TaqMan®アッセイ法を用いるリアルタイム PCR に用いることができます。逆転写反応と PCR とを同一の反応系で連続的に行うため、試薬の分注操作が 1 回で済み、ハイスループット化に適しています。また、サンプル間のクロスコンタミネーションの危険性も低減します。

本製品は、2 種類の酵素と最適化されたバッファー組成を組み合わせることで、微量な RNA を迅速に定量することを可能にしました。RNA ウィルスや発現量の少ない mRNA の定量に有利です。また、ターゲットの配列の影響を受けにくく、さまざまな RNA を高感度に検出することが可能です。

◆本製品の特長◆

1. 迅速・高感度

Probe を用いる One-step qRT-PCR 法により、微量な RNA を迅速・高感度に定量することができます。RNA ウィルスや発現量の少ない mRNA の定量に有利です。

2. 配列バイアスの低減

ターゲットの配列の影響を受けにくく、さまざまな RNA を高感度に検出することができます。

3. 夾雑物耐性の向上

ヘマチンなどの PCR 阻害物質による感度低下を回避できます。

4. dUTP を使用

本製品は 2×Reaction Buffer 中に dUTP が含まれています。Uracil-N-Glycosylase(UNG)*を添加することで、キャリー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 (UNG-101)をご使用になれます。

5. 複数のターゲットを同時に検出可能

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。

6. 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。

7. さまざまな機器に対応

本製品は、一般的なブロックタイプの機器、ガラスキャピラリータイプなど、各種リアルタイム PCR 装置にご使用頂けます。Fast Mode 搭載の装置にも対応します。また、50×ROX Reference dye が別添付されているため、パッシブリファレンスを必要とする機器(Applied Biosystems®製機器など)においても、各機器に適した ROX 濃度でご使用になれます。

[2] 製品内容

本製品には、以下のパーツが含まれています。

品名および内容	保存	QRZ-101 250 回用 (20μL 反応)
2×Reaction Buffer	-20°C	1.25mL×2 本
DNA Polymerase	-20°C	125μL
RT Enzyme Mix	-20°C	125μL
50×ROX Reference dye	-20°C 遮光保存	100μL
RNase free water	-20°C	1.25mL×2 本

2×Reaction Buffer

・反応バッファー、dATP、dCTP、dGTP、dUTP などを含む、2×濃度の反応溶液です。
・鋳型 RNA、プライマー、添付の DNA Polymerase、RT Enzyme Mix、50×ROX Reference dye を加え、1×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。
* 都度混合してご使用ください。混合した状態での保存はできません。

DNA Polymerase

・PCR 反応に必要な PCR 酵素とホットスタート用抗体の混合液です。PCR 酵素として、Tth DNA polymerase を使用しています。

RT Enzyme Mix

・RT 反応に必要な逆転写酵素です。高効率逆転写酵素 ReverTra Ace®を使用しています。
・RT Enzyme Mix には、逆転写酵素の他に RNase inhibitor が含まれており、RNase 活性を抑制することができます。

50×ROX Reference dye

・Applied Biosystems®製機器、Agilent technologies 社製機器などでは、ウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のためにパッシブリファレンスを用います。
・これらの機器での反応の際に 50×ROX Reference dye を添加してください。
・最適な添加量は機種により異なります。
・補正を行わない機器では添加する必要はありません。

RNase free water

・RNase を含まない滅菌水です。
・反応液を調製する際に使用してください。

[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。

1. リアルタイム PCR 装置

本製品は、一般的なブロックタイプ、ガラスキャピラリータイプなど、各種リアルタイム PCR 装置にご使用頂けます。Fast Mode 搭載の装置にも対応します。ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従ってください。

2. プライマーおよび TaqMan® probe

目的遺伝子配列に対応したプライマーセットおよび TaqMan® probe をご用意ください。PCR のリバースプライマーが逆転写用のプライマーとしても働きますのでランダムプライマーや Oligo dT プライマーなどを準備する必要はありません。

プライマーの精製純度は反応特異性に大きな影響を与えます。一般的に精製純度が低いプライマーでは品質のばらつきが大きくなり、非特異増幅が発生しやすくなることがあります。可能であれば HPLC 精製、少なくともカートリッジ(OPC)精製以上の精製グレードのプライマーをご使用ください。また、TaqMan® probe の精製純度が低い場合、残存した未結合の蛍光色素が増幅の検出に対して阻害的に作用することがあります。可能であれば HPLC 精製以上の精製グレードの TaqMan® probe を使用してください。

3. 鋳型 RNA

本製品では、鋳型 RNA として、Total RNA、poly(A)$^+$RNA(mRNA)、ウイルス RNA などの各種 RNA を用いることができます。

(a)Total RNA

Acid-Guanidium-Phenol-Chloroform (AGPC)法などの標準的な方法により精製された Total RNA にはゲノム DNA が混入しています。ゲノム DNA の混入は、特に偽遺伝子が多く存在するターゲットを検出する際などに偽陽性シグナルを発生させる原因となりますので、必要に応じて、DNase Ⅰ などを用いてゲノム DNA を除去してください。

(b)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 polyA 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。ただし、Total RNA に比べて RNase による分解を受けやすいため、取り扱いには注意してください。

(c)ウィルス RNA

AGPC 法やスピンカラム法などの標準的な方法により、血漿、血清、無細胞体液などから精製されたウィルス RNA を使用することが可能です。

4. Uracil-N-Glycosylase (UNG) [オプション]

別売りの Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (UNG-101)をご使用になれます。

[4] 使用方法

1. プライマーおよび TaqMan® probe の設計方法と性能の確認

(1)プライマーおよび TaqMan® probe の設計方法

高感度で定量性のあるデータを取得するためにはプライマーおよび TaqMan® probe の設計が最も重要となります。

以下に、設計時の一般的な注意事項をご紹介します。

(a)プライマー

・18～25mer、GC 含量は 40～60%、融解温度(Tm)*は 60～65℃を目安に設定してください。

・増幅サイズは 70～200bp を目安に設定します。200bp を越えると PCR 効率が低下するため、検出感度が低下することがあります。

・プライマーをイントロンを挟む異なるエキソン、または、ジャンクションに設計することにより、ゲノム DNA 由来の増幅を回避することができます。

(b) TaqMan® probe

・20～30mer、GC 含量は 40～60%、融解温度(Tm)*は 65～70℃を目安に設定してください。

・TaqMan® probe をエキソンジャンクションに設計することでゲノム由来の増幅産物の検出を防止することができます。

* プライマーや TaqMan® probe の Tm 値の計算は最近接塩基対法(Nearest Neighbor method)をお勧めします。本取扱説明書記載のプライマー・TaqMan® probe の Tm 値は Na^+濃度を 50mM、プライマー・TaqMan® probe 濃度を 0.5μM として計算した値を利用しています。

弊社では、最近接塩基対法（Nearest Neighbor method）に基づく Tm 計算プログラムを公開しています。弊社のウェブページ からダウンロードしてご利用になれます。

https://lifescience.toyobo.co.jp/user_data/pcr_tm.php

(2)プライマーおよび TaqMan® probe の性能の確認

プライマーおよび TaqMan® probe の性能は以下のような方法で確認することができます。実験を始める前に、実施されることをお勧めします。

(a)鋳型 RNA の 3 段階以上の希釈系列を調製し、反応液に添加する。

（例： Total RNA 量の希釈系列、0.2ng/μL、2ng/μL、20ng/μL を調製し、20μL 反応系に 5μL ずつ添加する。）

(b)検量線を作成し、PCR 効率が 85～115%程度、R^2 値が $R^2 \geqq 0.98$ 程度であることを確認する。

PCR 効率、R^2 値がこの範囲から外れる場合は、「**[6]最適な反応条件の検討方法**」を参考に、伸長(アニーリング)温度・時間の検討およびプライマー・TaqMan® probe 濃度の検討を実施してください。この検討により改善しない場合はプライマー・TaqMan® probe を再設計してください。

2. 反応液の調製

以下に 50μL および 20μL 反応時の調製例を示します。使用するリアルタイム PCR 機器の特性に合わせ、適宜反応液量を増減させてください。

オプション

複数のターゲットを同時に検出する場合も同様の条件を適用することができますが、事前に単独の反応でプライマー・TaqMan® probe セットの性能、および選択したレポーター色素がリアルタイム PCR 機器に適合していることを確認してください。

試薬	20μL 反応	50μL 反応	最終濃度
RNase free water	XμL	XμL	
2×Reaction Buffer	10μL	25μL	1×
DNA Polymerase	0.5μL	1.25μL	
RT Enzyme Mix	0.5μL	1.25μL	
Forward Primer	10pmol	25pmol	0.5μM*1
Reverse Primer	10pmol	25pmol	0.5μM*1
TaqMan® probe	4pmol	10pmol	0.2μM*2
50×ROX Reference dye	0.4 /0.04μL*3	1/0.1μL*3	1×/0.1×*3
(Uracil-N-Glycosylase)	0.4unit*4	1unit*4	
RNA 溶液	YμL*5	YμL*5	
合計液量	20μL	50μL	

*1 0.5μM で良好な結果が得られない場合は、「**[6]最適な反応条件の検討方法**」を参照してください。複数のターゲットを同時に検出する場合も同じ濃度で実施してください。

*2 0.2μM で良好な結果が得られない場合は、「**[6]最適な反応条件の検討方法**」を参照してください。複数のターゲットを同時に検出する場合も同じ濃度で実施してください。

*3 Applied Biosystems®製機器や Agilent Technologies 社製機器などではウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のためにパッシブリファレンスを使用します。これらの機器での反応の際には、ROX Reference dye を添加してください。 最適な添加量は機種により異なります。主な機器の添加量は表 1 の通りです。また、補正を行わない機器では添加する必要はありません。

*4 Uracil-N-Glycosylase 処理を実施する場合、熱感受性(heat-labile) UNG を使用してください。別売りの Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (UNG-101)をご使用になれます。

*5 過剰量の添加は反応効率低下の原因となり、十分な直線性が得られない場合があります。Total RNA は反応液中に 25ng/μL 以下を目安に添加してください。

表 1：主な機器の最適な ROX Reference dye 濃度

機器	最終濃度（添加量）
Applied Biosystems®7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™など	1×(1/50 量)
Applied Biosystems®7500 、7500Fast 、Agilent Technologies 社製機器（オプション）など	0.1×(1/500 量)
Roche 社製機器、Bio-Rad 社製機器、Qiagen 社製機器など	不要

3. サイクル条件設定

以下の条件を推奨します。Data Collection は伸長(アニーリング)ステップに設定してください。PCR 効率が低い場合は、「**[6]最適な反応条件の検討方法**」を参照してください。複数のターゲットを同時に検出する場合も、下記の推奨条件で実施してください。

ステップ		温度	時間	昇降速度
(UNG 反応)		(20～25℃*1)	(10 分*1)	(最大)
逆転写反応		50℃	10 分	最大
初期変性		95℃	1 分	最大
PCR	変性	95℃	15 秒	最大
(40～45cycles)*2	伸長(アニーリング)	60℃	45 秒	最大

*1 UNG 処理を行う場合は、逆転写反応の前に、UNG 反応のステップを設定してください。上記の
表に一般的な温度条件および反応時間を示しましたが、各社の推奨条件に従って調整してください。

*2 サイクル数は 40 サイクルで実施し、増幅が不十分な場合は 45 サイクルまで上げてください。

[5] 各機器におけるサイクル条件設定例

1. Applied Biosystems® StepOnePlus™

Applied Biosystems®製機器（Applied Biosystems® StepOnePlus™など）におけるサイクル条件の設定例をご紹介します。詳細は各取扱説明書を参照してください。(通常ブロックタイプ、ソフトウェアバージョン 2.3)

なお、Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System(通常ブロックタイプ、ソフトウェアバージョン 2.0.6)なども類似した設定方法となっていますので、参考にしてください。

(1)ソフトウェアを起動します。

(2)Design Wizard、Advanced Setup、QuickStart のいずれかを選択します。

(3)下表のタブを選択し、reagents で TaqMan® Reagents を選択します。

Design Wizard の場合	Method＆Materials
Advanced Setup の場合	Setup → Experiment Properties
QuickStart の場合	Experiment Properties

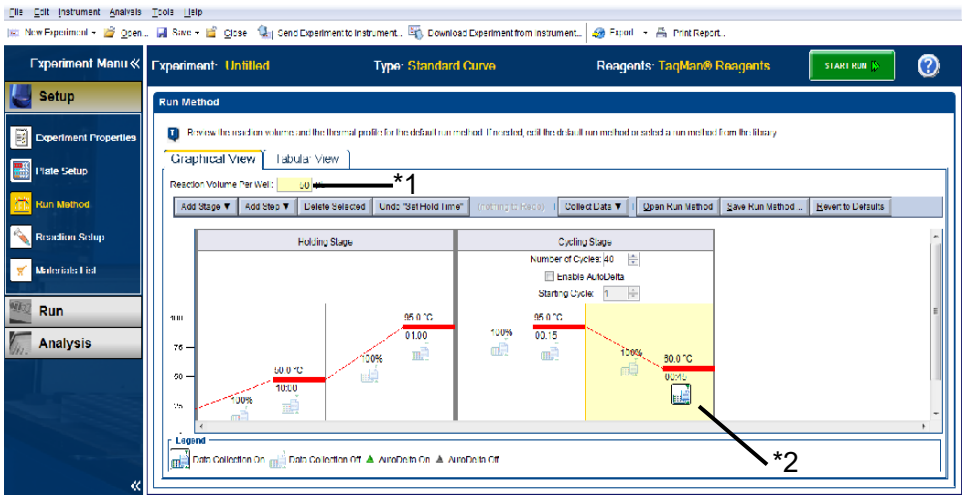
(4)Run Methods を選択し、Reaction Volume Per Well に反応液量を入力します。

(5)Add Step を選択し、逆転写反応を 50℃ 10 分に変更します。

(6)Holding Stage を選択し、95℃ 1 分に変更します。

(7)Cycling Stage を選択し、95℃ 15 秒、60℃ 45 秒、40 サイクルに変更します。

(8)プレート、またはチューブをセットし、プログラムをスタートします。



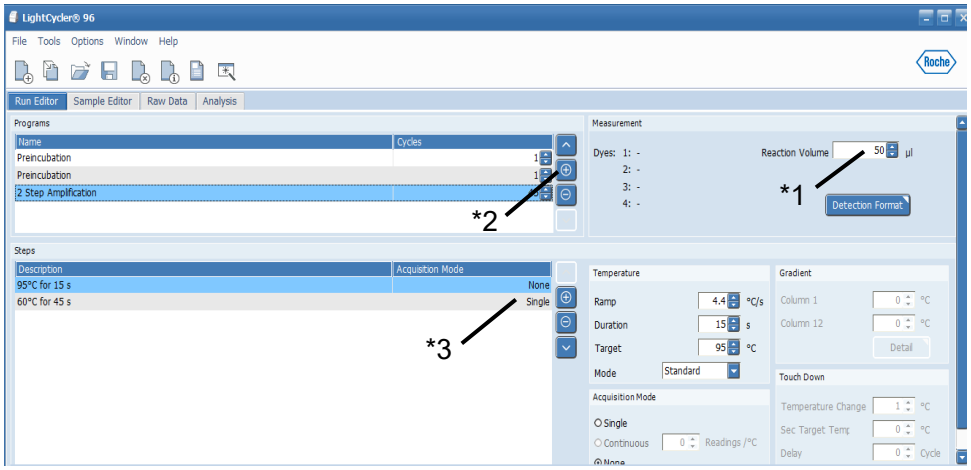
*1 Reaction Volume(μl)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。

*2 伸長(アニーリング)反応時にデータ回収ポイントを設定してください。

2. LightCycler®96

Roche 社製 LightCycler®96 におけるサイクル条件の設定例をご紹介します。詳細は各取扱説明書を参照してください。(ソフトウェアバージョン 1.1)

(1)ソフトウェアを起動し、Create New Experiment を選択します。
(2)Reaction Volume に反応液量を入力します。
(3)Run Editor のタブを開き、Predefined Programs で Preincubation、Preincubation、2 Step Amplification を順に選択します。Preincubation は「+」の表記を選択することで追加できます。
(4)1 つ目の Preincubation を選択し、Target 50℃、Duration 600 秒に変更します。
(5)2 つ目の Preincubation を選択し、Target 95℃、Duration 60 秒に変更します。
(6)2 Step Amplification を選択し、Target 95℃、Duration 15 秒、Target 60℃、Duration 45 秒に変更します。
(7) プレート、またはチューブをセットし、プログラムをスタートします。

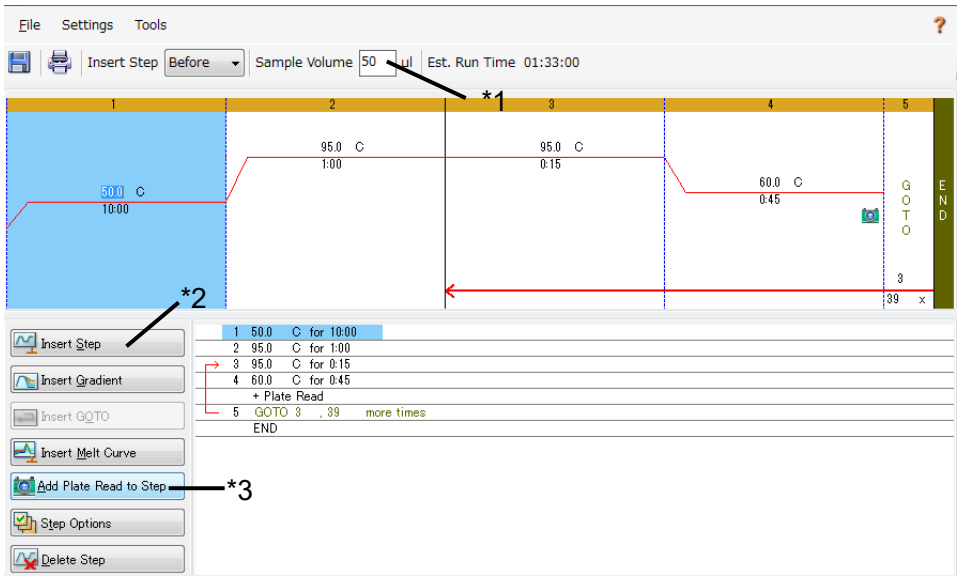


*1 Reaction Volume(µL)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。
*2 初期設定では、初期変性とPCR(2step)のサイクルとなっています。「+」を選択し、逆転写反応を追加してください。
*3 伸長(アニーリング)反応時にデータ回収ポイントを設定してください。

3. CFX96 Touch™ Deep Well

Bio-Rad 社製 CFX96 Touch™ Deep Well において用いる場合のサイクル条件設定例を示します。詳細は各取扱説明書を参照してください。(ソフトウェアバージョン 3.1)

(1)ソフトウェアを起動し、User-defined を選択します。
(2)Create New…を選択し、Sample Volume に反応液量を入力します。
(3)Insert Step を選択し、逆転写反応の 50℃ 10 分を追加します。
(4)各工程を 95℃ 1 分、95℃ 15 秒、60℃ 45 秒、40 サイクルに変更します。
(5)プレート、またはチューブをセットし、プログラムをスタートします。

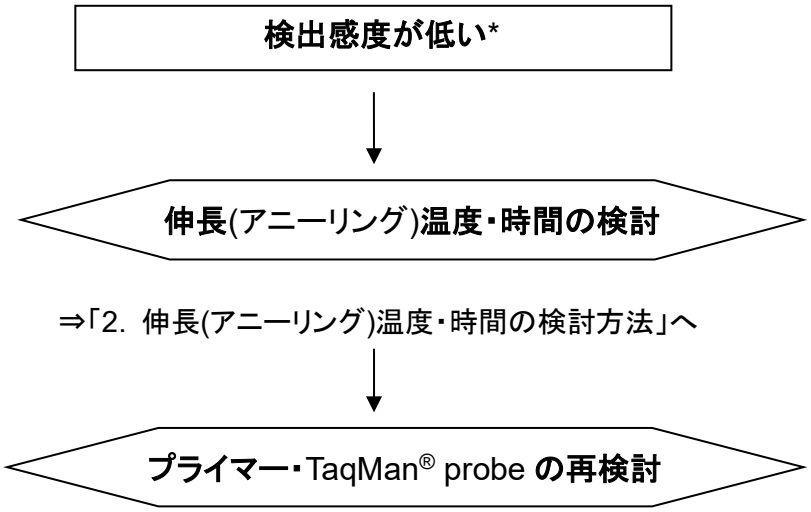


*1 Sample Volume(µL)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。
*2 初期設定では、初期変性と PCR(2step)のサイクルとなっています。Insert Step を選択し、逆転写反応を追加してください。
*3 伸長(アニーリング)反応時にデータ回収ポイントを設定してください。

[6] 最適な反応条件の検討方法

1. 条件検討の手順

「**[4]使用方法** 3. サイクル条件設定」に記載の初期反応条件で目標の感度が得られない場合は、最適な反応条件を検討する必要があります。反応条件は以下の手順で検討します。



⇒「3. プライマー・TaqMan® probe 濃度の検討方法」へ

* 検出感度が低い原因として PCR 効率が低いこと、または TaqMan® probe の検出に問題があることが考えられます。これらの原因が、プライマーや TaqMan® probe の設計にある可能性がありますので、まずは「**[4]使用方法** 1. プライマーおよび TaqMan® probe の設計方法と性能の確認」を確認した上で、「**[6]最適な反応条件の検討方法** 2. 伸長(アニーリング)温度・時間の検討方法」に続いて「**[6]最適な反応条件の検討方法** 3. プライマー・TaqMan® probe 濃度の検討方法」を行ってください。

2. 伸長(アニーリング)温度・時間の検討方法

プライマーのアニーリングが不十分な場合は、伸長(アニーリング)温度を下げ、伸長(アニーリング)時間を延長させることにより PCR 効率が改善することがあります。また、TaqMan® probe のアニーリングが不十分な場合は、検出感度が低下することがあり、上記と同様な対応で改善されることがあります。

伸長(アニーリング)温度を下げても改善しない場合は、プライマーダイマーなどの非特異増幅が生じ、PCR 効率が低下している可能性があります。このような場合は伸長(アニーリング)温度を上げることにより PCR 効率が改善することがあります。

初期反応条件

ステップ		温度	時間
逆転写反応		50℃	10 分
初期変性		95℃	1 分
PCR	変性	95℃	15 秒
(40cycles)*1	伸長(アニーリング)	60℃	45 秒

伸長(アニーリング)温度*2を下げる

ステップ		温度	時間
逆転写反応		50℃	10 分
初期変性		95℃	1 分
PCR	変性	95℃	15 秒
(40cycles)*1	伸長(アニーリング)	**55℃～**	45 秒

改善の傾向がある場合

伸長(アニーリング)時間を延長する

ステップ		温度	時間
逆転写反応		50℃	10 分
初期変性		95℃	1 分
PCR	変性	95℃	15 秒
(40cycles)*1	伸長(アニーリング)	**55℃～**	**～1 分**

改善しない場合

伸長(アニーリング)温度*2を上げる

ステップ		温度	時間
逆転写反応		50℃	10 分
初期変性		95℃	1 分
PCR	変性	95℃	15 秒
(40cycles)*1	伸長(アニーリング)	**～65℃**	45 秒

*1 サイクル数は 40 サイクルで実施し、増幅が不十分な場合は 45 サイクルまで上げてください。

*2 伸長(アニーリング)温度の検討には、Applied Biosystems® StepOnePlus™ の VeriFlex™ 機能や Bio-Rad 社製機器の温度グラジェント(温度勾配)機能などを使用することで、一度に複数の伸長(アニーリング)温度の検討が可能であり、より簡便に検討を行うことができます。

3. プライマー・TaqMan® probe 濃度の検討方法

「2. 伸長(アニーリング)温度・時間の検討方法」の方法で PCR 効率や検出感度が改善しない場合は、プライマー・TaqMan® probe 濃度の検討を行ってください。検討は(1)、(2)の順で行ってください。

(1) プライマー濃度を上げる／TaqMan® probe の濃度を上げる

プライマーのアニーリングが不十分な場合、プライマー濃度を上げることで、PCR 効率が改善することがあります。また、TaqMan® probe のアニーリングが不十分な場合、TaqMan® probe 濃度を上げることで、検出感度が改善することがあります。

まずは TaqMan® probe 濃度を 0.2μM で固定し、プライマー濃度を、0.5～0.8μM を目安に上げてください。この対策でも改善しない場合は、TaqMan® probe 濃度を、0.2～0.4μM を目安に上げてください。

(2) プライマー濃度を下げる

プライマーダイマーなどの非特異増幅が生じる場合、プライマー濃度を下げることで、PCR 効率が改善することがあります。

このような場合は、TaqMan® probe 濃度を 0.2μM で固定し、プライマー濃度を、0.2～0.5μM を目安に下げてください。

TaqMan® probe 濃度を 0.2μM より下げると、一定の蛍光強度が確保できなくなり、検出感度が低下する場合がありますので、ご注意ください。

[7] 実施例

実験例 1:精製 RNA の検出

＜方法＞

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit を用いて、RS ウィルス A 型の検出を試みました。サンプルは咽頭ぬぐい液を QIAamp Virus RNA Kit で抽出した RNA(6.5x10^4copies)を 10 倍ずつ 6 段階に希釈して使用しました。

1. サイクル条件 ：

ステップ		温度	時間
逆転写反応		50℃	10 分
初期変性		95℃	1 分
PCR	変性	95℃	15 秒
(45cycles)	伸長(アニーリング)	60℃	45 秒

2. 使用機器 ： Applied Biosystems® StepOnePlus™

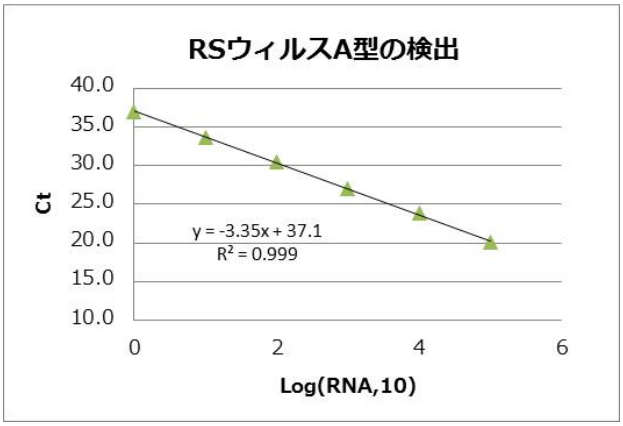
3. 検出した RNA ： RS ウィルス A 型

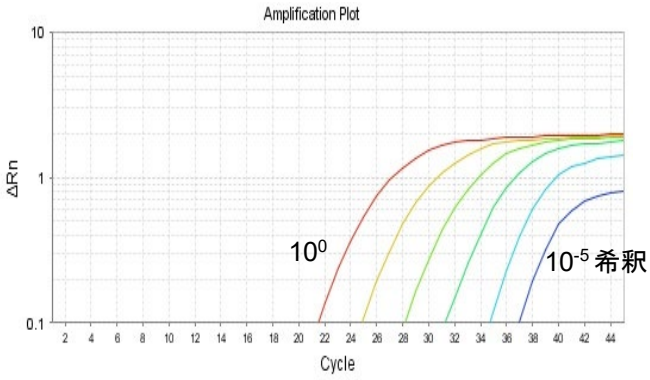
4. プライマー・TaqMan® probe ：

RS ウィルス A 型	配列	鎖長	GC 含量	Tm 値
Forward Primer	GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA	26mer	38.5%	65.4℃
Reverse Primer	TGCTCCGTTGGATGGTGTATT	21mer	47.6%	66.3℃
TaqMan® probe	[FAM]ACACTCAACAAAGATCAACTTCTGTCATCCAGC[TAMRA]	33mer	42.4%	73.9℃

＜結果＞

臨床検体から抽出したウィルス RNA を用いて、良好な PCR 効率かつ幅広いダイナミックレンジで増幅を確認することができました。





実験例 2: 複数のターゲットの同時検出

＜方法＞

HeLa S3 細胞を 6well プレートに $4x10^5$ cells/well ずつ播種し、100nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を加えて 20 時間インキュベートし、Total RNA を抽出しました。この Total RNA を鋳型に、THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit を用いて IL-1β、TNF-α、GAPDH 遺伝子を検出しました。TaqMan® probe は 3 種類の蛍光色素で標識し、3 種類の遺伝子について単独検出と並行して Multiplex 検出を実施しました。HeLa S3 RNA は 10 倍希釈(6 段階)で、20μL 反応系に対し 1pg～100ng になるように添加しました。

1. サイクル条件 ：

ステップ		温度	時間
逆転写反応		50℃	10 分
初期変性		95℃	1 分
PCR	変性	95℃	15 秒
(45cycles)	伸長(アニーリング)	60℃	45 秒

2. 使用機器: LightCycler®96

3. 検出した RNA ： HeLa S3 RNA

4. プライマー・TaqMan® probe ：

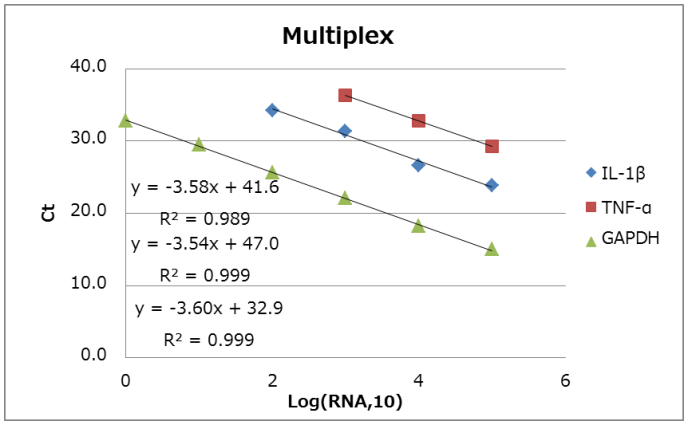
IL-1β	配列	鎖長	GC 含量	Tm 値
Forward Primer	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA	21mer	47.6%	63.7℃
Reverse Primer	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	21mer	52.4%	64.3℃
TaqMan® probe	[FAM]CTCTGCCCTCTGGATGGCGG [TAMRA]	20mer	70%	73.5℃

TNF-α	配列	鎖長	GC 含量	Tm 値
Forward Primer	CCCAGGGACCTCTCTCTAATC	21mer	57.1%	62.8℃
Reverse Primer	ATGGGCTACAGGCTTGTCACT	21mer	52.4%	64.8℃
TaqMan® probe	[Cy5]TGGCCCCAGGCAGTCAGATC ATC[BHQ2]	23mer	60.9%	75.3℃

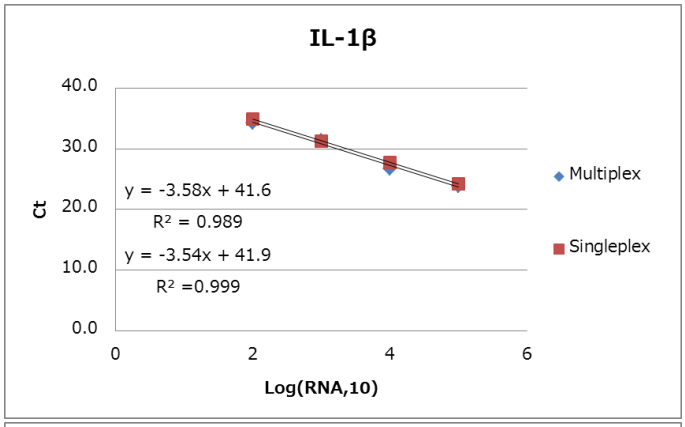
GAPDH：Human GAPD(GAPDH) Endogenous Control (VIC[R]/MGB probe, primer limited)
（製造元：Applied Biosystems　製品コード：4326317E）

＜結果＞

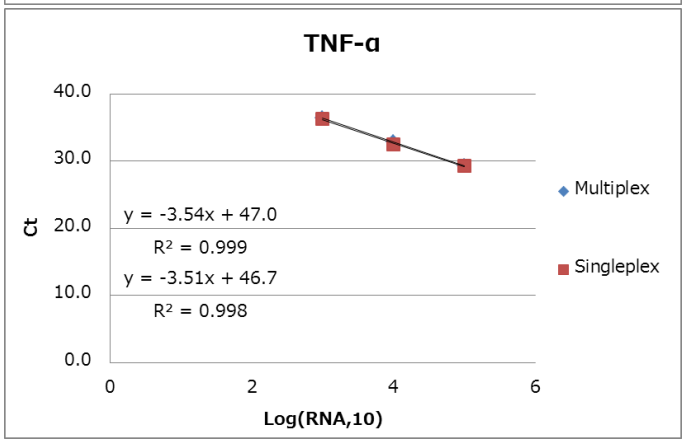
各遺伝子を単独(Singleplex)および 3 チャンネルを用いた Multiplex 検出を行い比較したところ、同等な感度で検出でき、PCR 効率、R^2 値に差は認められませんでした。本製品は 3 種類の遺伝子を同時に定量することができ、発現解析の簡便化に有効であることが確認できました。



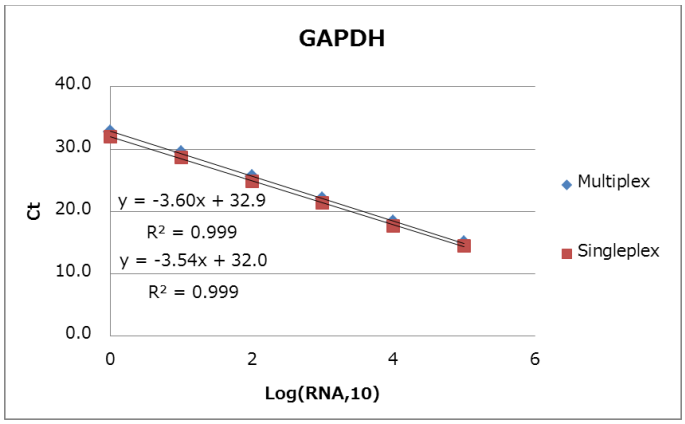
	PCR 効率	R^2 値
IL-1 β	90.2%	0.989
TNF- α	91.8%	0.999
GAPDH	89.6%	0.999



	PCR 効率	R^2 値
Multiplex	90.2%	0.989
Singleplex	91.6%	0.999



	PCR 効率	R^2 値
Multiplex	91.8%	0.999
Singleplex	92.9%	0.998



	PCR 効率	R^2 値
Multiplex	89.6%	0.999
Singleplex	91.6%	0.999

[8] トラブルシューティング

1. PCR 効率が低い、検出感度が低い、検出結果が乱れる

(1)機器の設定の不具合

原因	対策
検出機器の設定などが蛍光色素に適合していない	標識に用いられる蛍光色素の種類によって、検出機器の設定を変更する必要があります。設定を適正化して再解析してください。
data collection の設定が不適切	各種アッセイ法により data collection の推奨設定位置が異なります。設定を確認し、適正化して再実験してください。
サンプル位置の設定ミス	入力したサンプル番号と、機器にセットしたサンプルの位置が合っているか確認し、適正なサンプル位置を設定して再解析、あるいは再実験してください。
その他装置の故障・不具合	各装置の取扱説明書に従い、点検してください。

(2)RNA サンプルの不具合

原因	対策
RNA が分解されている	RNase の作用により鋳型 RNA が分解されている可能性があります。RNA 抽出の工程を見直し、ピペットなどの器具類は RNA 取扱専用のものを使用して RNA を再調製してください。

(3)サイクル条件設定およびプライマー・TaqMan® probe 濃度の不具合

原因	対策
伸長(アニーリング)温度・時間が適していない	「**[6]最適な反応条件の検討方法**」を参考に、伸長(アニーリング)温度および時間を検討してください。
プライマー・TaqMan® probe 濃度が適していない	伸長(アニーリング)温度・時間の調整で改善しない場合は、プライマー・TaqMan® probe 濃度を検討してください。 「**[6]最適な反応条件の検討方法**」を参考に、プライマー・TaqMan® probe 濃度を検討してください。
プライマー・TaqMan® probe の設計に問題がある	サイクル条件設定およびプライマー・TaqMan® probe 濃度を見直しても、改善しない場合は、プライマー・TaqMan® probe の設計に問題がある可能性があります。プライマー・TaqMan® probe を検討してください。

(4)ROX 濃度の不具合

原因	対策
50×ROX Reference dye 濃度が不適切	50×ROX Reference dye の最適な添加量は機種により異なります。また、補正を行わない機器では添加する必要はありません。50×ROX Reference dye 濃度が適切か確認してください。

2. 定量値がばらつく

(1)機器の設定の不具合

原因	対策
装置の故障・不具合	装置の不具合により、温度管理や検出にばらつきが生じている場合があります。各装置の取扱説明書に従い、点検してください。

(2)RNA サンプルの不具合

原因	対策
サンプルの純度が低い	サンプル中の不純物は、ばらつきの原因となる可能性があります。精製度が高いサンプルをご使用ください。また、サンプル中のゲノム DNA の残留により、ゲノム DNA 由来の増幅産物が検出されることがあります。その場合、「**[4]使用方法** 1. プライマーおよび TaqMan®probe の設計方法と性能の確認」を参考にプライマーおよび TaqMan®probe の設計を見直してください。さらに、サンプルを DNase I で処理し、ゲノム DNA を除去してください。
サンプルの吸着	RNA サンプルがマイクロチューブに吸着している可能性があります。低吸着チューブを使用し、RNA を再調製してください。
鋳型 RNA のコピー数が少ない、または多い	鋳型 RNA の 3 段階以上の希釈系列を調製して検量線を作製し、検量線の直線域で定量してください。

(3)サイクル条件設定およびプライマー・TaqMan® probe 濃度の不具合

原因	対策
伸長(アニーリング)温度・時間が適していない	「**[8]トラブルシューティング** 1. PCR 効率が低い、検出感度が低い、検出結果が乱れる (3) サイクル条件設定およびプライマー・TaqMan® probe 濃度の不具合」と同様の操作を実施してください。
プライマー・TaqMan® probe 濃度が適していない	
プライマー・TaqMan® probe の設計に問題がある	

(4)反応液量の不具合

原因	対策
試薬分注のばらつき	多くのリアルタイム PCR 装置では、推奨反応スケールよりも少量の液量で検出が可能ですが、検出感度や再現性が低下する場合があります。反応スケールを上げて推奨液量で再実験してください。

3. 陰性サンプルにシグナルがみられる

原因	対策
陽性サンプルやPCR産物のコンタミネーション	まずは、陰性サンプルを更新してください。それでも発生する場合は、使用する滅菌水やプライマー、試薬などを更新して再検討してください。
TaqMan® probe の設計に問題がある	TaqMan® probe が非特異的な結合をしている可能性があります。TaqMan® probe を再設計することにより改善する場合があります。

[9] 関連商品

簡便なインターカレータアッセイによる One-step Realtime PCR 用試薬

品名	内容	Code No.
One-step Realtime PCR 用マスターミックス (SYBR® Green アッセイ用) ***RNA-direct*™ SYBR® Green** **Realtime PCR Master Mix**	0.5mL×5 本 (0.5mL×5 本)×5	QRT-201 QRT-201×5

RNA 調製関連試薬

品名	内容	Code No.
磁性ビーズを用いる簡便なウィルス RNA 精製キット **MagExtractor™ -Viral RNA-**	100 回用	NPK-401F
磁性ビーズを用いる簡便な Total RNA 精製キット **MagExtractor™ -RNA-**	100 回用	NPK-201F
磁性ビーズによる精製を簡単に行う専用磁性スタンド **Mag*ical Trapper***	1 個	MGS-101

キャリーオーバー対策・偽陽性防止用試薬

品名	内容	Code No.
熱感受性(Heat-labile) UNG **Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile**	200 U	UNG-101

TOYOBO

【製造・販売元】

ー価格・在庫に関するお問い合わせー

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

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　(土日祝日、休日を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］https://lifescience.toyobo.co.jp/