

RNA ウイルスなどの迅速・高感度定量に最適です！

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit

20 回用のサンプルを
ご用意しております。

THUNDERBIRD® シリーズからワンステップリアルタイム
RT-PCR キットが登場

高感度・低バイアスを実現！
さまざまなターゲットの迅速解析に



□ 迅速・高感度

TaqMan® probe を用いる One-step qRT-PCR 法により、微量な RNA を迅速・高感度に検出することができます。

□ 配列バイアスの低減

ターゲットの配列に左右されることなく、さまざまな RNA を高感度に検出が可能です。マルチプレックス検出での各ターゲットの増幅の偏りも最小限に抑えます。

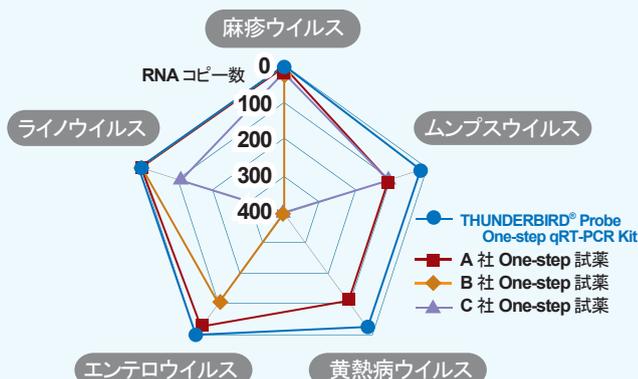
□ 夾雑物耐性の向上

ヘマチンなどの PCR 阻害活性を示す夾雑物の影響を回避することができます。

□ dUTP を使用

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 とのセット品をご用意しております。

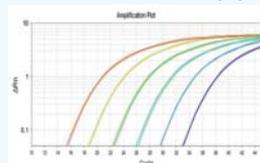
最大検出感度の比較



▶ 本製品では平均して 30 コピー以下 RNA を検出することができました。

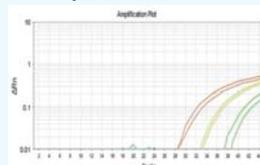
ヘマチンによる阻害実験

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit



+ Hematin

A 社 One-step 試薬



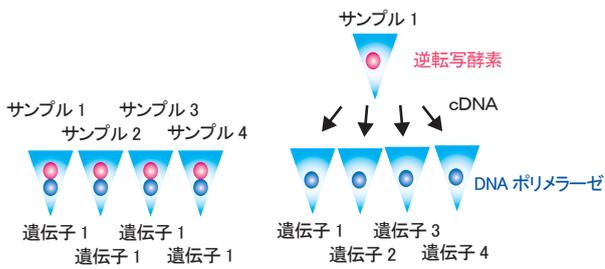
+ Hematin

▶ 2 μ M の Hematin ではほとんど阻害は認められませんでした。

mRNA の発現解析にも力を発揮。マルチ検出にも対応します。

1-step 法

2-step 法



	1-step 法	2-step 法
利点	<ul style="list-style-type: none"> ・ 1 回の反応で解析が完了する → サンプル数が多い場合に有効 → コンタミネーションのリスク低減 	<ul style="list-style-type: none"> ・ cDNA を用いて複数の解析が可能 → 解析遺伝子数が多い場合に有効 ・ 逆転写用のプライマーの選択肢が多い
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ・ リバースプライマーが限定される ・ 最適化が難しい (偏りが出やすい) ・ マルチ検出が難しい 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 操作が煩雑
主な用途	<ul style="list-style-type: none"> ・ ウイルス等の定量、スクリーニングなど 	<ul style="list-style-type: none"> ・ mRNA の相対定量など

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit について

本製品は、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 RT-PCR キットです。主に TaqMan® アッセイ法を用いるリアルタイム RT-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、反応液の分注操作が 1 回で済み、ハイスルーブ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 ウイ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。



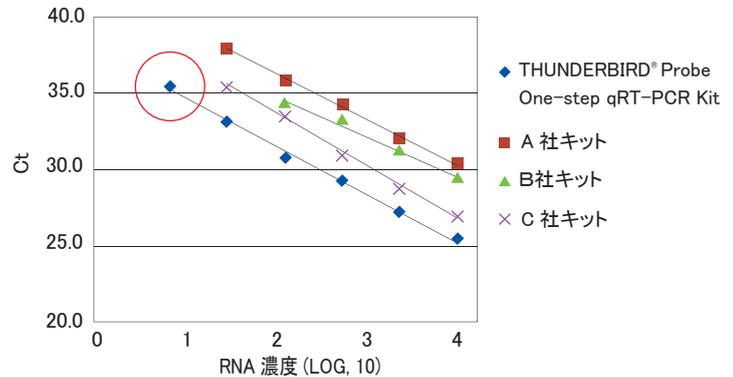
- ・ 2xReaction Buffer
- ・ DNA Polymerase
- ・ RT Enzyme Mix
- ・ 50 × ROX Reference dye*
- ・ RNase free water

従来の 1-step 法の欠点	本製品の改良点
<ul style="list-style-type: none"> ● プライマーの最適化が難しい [高感度が難しい] ● 配列によって測定感度に偏り (バイアス) が生じやすい 	<ul style="list-style-type: none"> ● プライマー・プローブやターゲットの配列に起因する増幅の偏りの影響を最小限に抑えます <p>↓</p> <p>さまざまなウイルスや mRNA の迅速・高感度検出 / 定量に有利です</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● RNA 中の夾雑物によって感度低下が起きやすい 	<ul style="list-style-type: none"> ● 夾雑物による阻害を回避できます
<ul style="list-style-type: none"> ● TaqMan® probe による多色解析が難しい 	<ul style="list-style-type: none"> ● マルチプレックス検出における各ターゲットの増幅の偏りを最小限に抑えます <p>↓</p> <p>ハウスキープ遺伝子をコントロールとする複数遺伝子の相対定量などに最適です</p>

* ROX 溶液が別添付となっており、さまざまなリアルタイム PCR 測定機器に対応可能です。

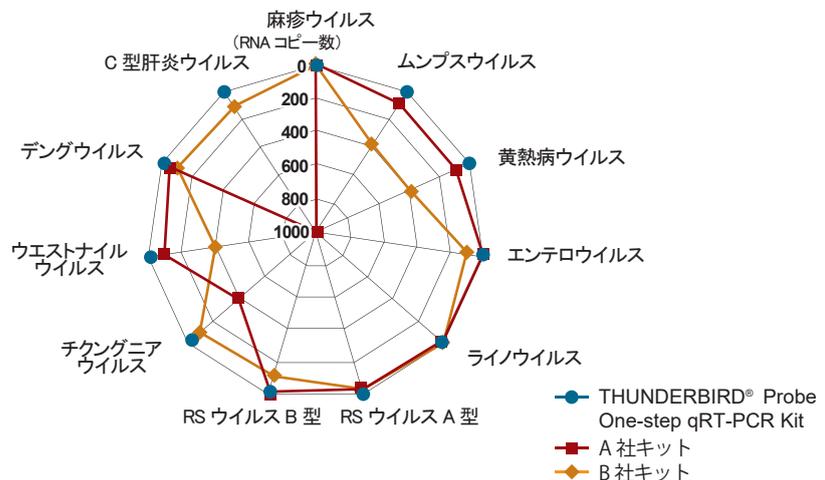
実施例 1 エンテロウイルス RNA の高感度検出

エンテロウイルス RNA を 4 倍希釈し、TaqMan® probe 法を用いて検出感度・定量性を他社製品と比較しました。プライマー・プローブは既知のものを (最適化することなく) そのまま使用しました。解析には Applied Biosystems® StepOnePlus™ を用いました。本製品でのみ 10 コピー以下の RNA を検出することが可能であり、幅広いダイナミックレンジでの定量を行うことができました。本製品は、RNA ウイルスや発現量の少ない mRNA の検出・定量に有効です。



実施例 2 さまざまなウイルスの検出感度の比較

11 種類のウイルス RNA の 4 倍希釈系列を作成し、TaqMan® probe 法を用いて最高検出感度の比較を行いました。プライマー・プローブは既知のものをそのまま使用しました。解析には Applied Biosystems® StepOnePlus™ を用いました。グラフは、検出された最も低いコピー数を各試薬ごとにプロットしたものです。その結果、本製品でのみ、全てのターゲットを 30 コピー以下の感度で検出・定量が可能であることが分かりました。この実験から、本製品ではターゲットの配列に左右されず、さまざまな RNA を高感度に検出することが可能であることが示唆されました。



実施例3 マルチプレックス検出系での発現定量

3種類の蛍光色素で標識した TaqMan[®] probe を用い、単独検出と、3種類のプローブを一度に用いるマルチプレックス検出系にて、IL-1 β 、TNF- α 、GAPDH 遺伝子の発現量を解析しました。実験には HeLa S3 RNA (1pg ~ 100ng の 10 倍希釈 [6 段階]) をサンプルとして用い、Roche Diagnostics 社 LightCycler[®] 96 にて解析を行いました。その結果、各遺伝子を単独 (図 1) および 3 チャンネルを用いたマルチプレックス検出 (図 2) において同等な感度で検出可能であり、PCR 効率と相関係数に大きな差は認められないことが分かりました (表 1)。

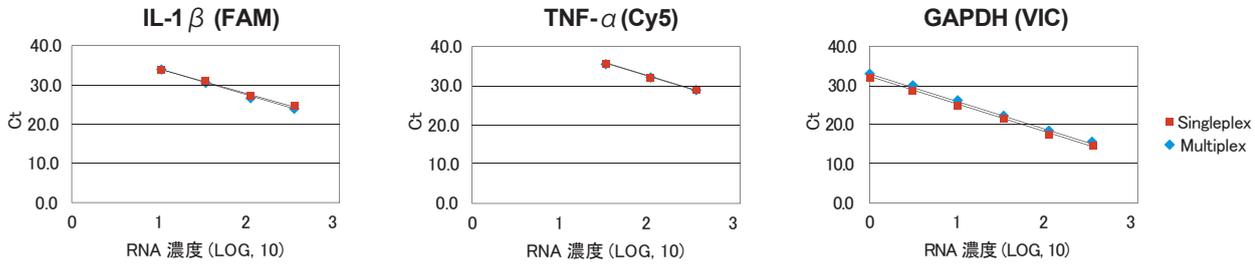


図 1 単独検出の結果

それぞれのターゲットの単独検出の結果。図 2 のマルチプレックス検出の結果を比較のためにプロットしています。

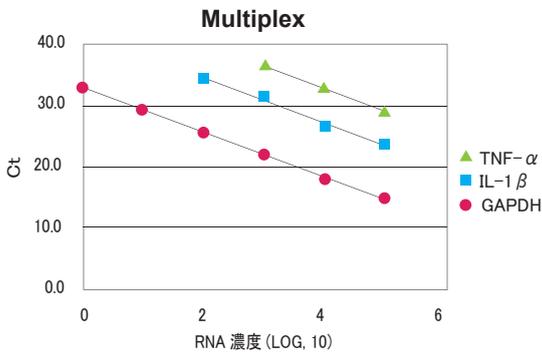


図 2 マルチプレックス検出の結果

表 1 マルチプレックス検出と単独検出での PCR 効率と相関係数の比較

	IL-1 β		TNF- α		GAPDH	
	PCR 効率	R ²	PCR 効率	R ²	PCR 効率	R ²
Multiplex	90.2%	0.989	91.8%	0.999	89.6%	0.999
Singleplex	91.6%	0.999	92.9%	0.998	91.6%	0.999

HeLa S3 細胞を 6well プレートに 4×10^5 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ました。その後、PMA 処理および未処理の細胞から抽出した Total RNA を用い、本製品を使用して、IL-1 β 、TNF- α 、GAPDH 遺伝子の発現量を解析しました。その結果、PMA 処理による IL-1 β 、TNF- α の発現量の向上を確認できました (図 3)。

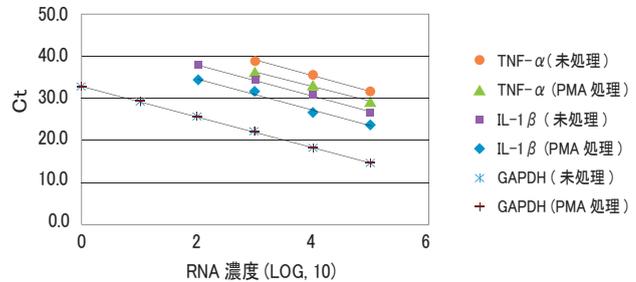
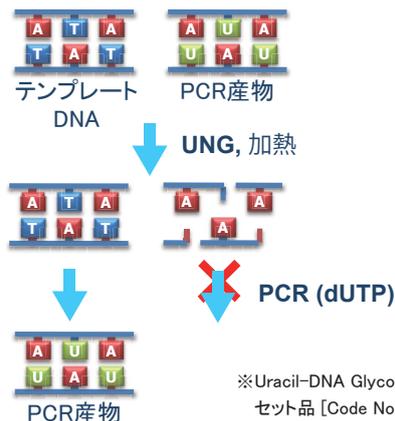


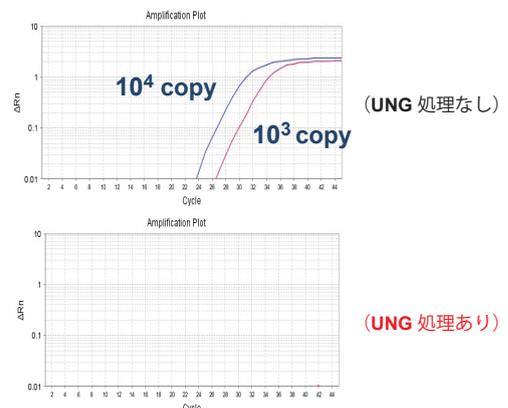
図 3 マルチプレックス検出による発現解析の結果

＜キャリアオーバーによる偽陽性の防止＞

本製品では、dTTP の代わりに dUTP が使用されています。熱感受性 (heat-labile) ウラシル-N-グリコシラーゼ (UNG) を添加することにより、増幅産物汚染 (キャリアオーバー) による偽陽性の発生を防止することができます。



● U を含む PCR 産物の添加実験



※Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile 単品 [Code No. UNG-101] を別途ご購入いただくか、セット品 [Code No. QRZ101/UNG101] をご利用ください。

実施例 4 臨床検体を用いた RS ウイルスA型、及び B 型の同時定量

20 検体の咽頭ぬぐい液から抽出した RNA サンプルを用いて、RT-PCR 法、及び THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit による qRT-PCR 法による RS ウイルスの検出を行いました。また、並行して抗体検査を用いて解析を行い比較しました。qRT-PCR は、RS ウイルスの A 型と B 型を判別できるように、特異的なプライマーとそれぞれ異なる色素で標識した TaqMan[®] probe を用いて定量を行いました。解析には、Roche Diagnostics 社 LightCycler[®] 96 を用いました。その結果、抗体検査法で偽陰性と判定された検体についても、PCR 法と高い相関で感染の有無を判定可能でした。また、型判別の結果も完全に一致していました。

表 さまざまな方法を用いた RS ウイルスの検出相関試験結果

検体番号	抗体検査法	PCR (定性・型判別)	qPCR 解析での定量値 (コピー数)	
			A 型検出 (FAM, 470nm)	B 型検出 (Cy5, 645nm)
1	+	+ (A)	1.6 × 10 ⁵	-
2	-	-	-	-
3	+	+ (A)	8.1 × 10 ⁴	-
4	+	+ (A)	2.7 × 10 ⁵	-
5	-	+ (A)	9.6 × 10 ²	-
6	-	+ (A)	3.6 × 10 ³	-
7	+	+ (A)	2.3 × 10 ⁶	-
8	-	-	-	-
9	+	+ (A)	1.5 × 10 ⁵	-
10	+	+ (A)	6.7 × 10 ⁵	-
11	-	-	-	-
12	+	+ (A)	1.6 × 10 ⁵	-
13	+	+ (A)	9.4 × 10 ³	-
14	-	+ (A)	9.5 × 10 ³	-
15	+	+ (A)	3.9 × 10 ³	-
16	+	+ (A)	2.4 × 10 ⁵	-
17	-	-	-	-
18	-	+ (A)	4.2 × 10 ⁴	-
19	-	+ (A)	3.4 × 10 ²	-
20	-	+ (B)	-	9.6 × 10 ³

品名	包装	保存温度	Code No.	価格 (税別)
高効率 One-step qRT-PCR Kit THUNDERBIRD [®] Probe One-step qRT-PCR Kit	250 回用 /20 μL 反応	-20°C	QRZ-101	¥36,000
キャリアオーバーコンタミネーション防止試薬とのセット品 THUNDERBIRD [®] Probe One-step qRT-PCR/UNG Set*	1set	-20°C	QRZ101/UNG101	¥46,000

*キャリアオーバーコンタミネーション防止試薬単品 : Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile [Code No. UNG-101] 200U × 1 本 ¥35,000 も販売しております。

※本資料に記載している会社名および商品名・ロゴマークなどは、各社の商号、商標または登録商標です。

TOYOBO 東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部

(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp

(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

(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

テクニカルライン

(E-mail) tech_osaka@toyobo.jp

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

(9:00 ~ 12:00 13:00 ~ 17:00 [土日祝日、休日を除く])

WEBサイト

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



サンプル請求