

Code No. [HSTTX-219](#)

QRT-2BS

QRT-3BS

保存温度 -20°C

Glycerol Free 高効率 PCR, RT-PCR 用酵素・Buffer

Hot Start TTx DNA Polymerase <Glycerol Free>

10xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free>

2.5xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> Stabilizer plus

rTth DNA Polymerase 及び、TTx DNA Polymerase は、 Mn^{2+} 存在下で逆転写活性を示すユニークな PCR 酵素です。高い増幅活性と5'→3' Exonuclease 活性を有するため、汎用の PCR だけでなく、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 にも利用されています。

Hot Start TTx DNA Polymerase <Glycerol Free>は、弊社独自の酵素である TTx DNA polymerase に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。また組成に Glycerol が含まれないため、凍結乾燥試薬の原料として利用できます。

10xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free>は、rTth DNA Polymerase 及び、TTx DNA Polymerase 用の10x濃度の反応溶液です。Glycerol を含まないため、凍結乾燥試薬の原料として利用できます。

2.5xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> Stabilizer plus は、上記 10xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free>に凍結乾燥用の賦形剤が添加された 2.5x濃度の反応溶液です。安定剤の検討なしで凍結乾燥試薬の調製が可能です。

※TaqMan[®]は、Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。

特長

- **Mg²⁺使用で高効率な DNA 増幅が可能**

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。

- **Mn²⁺使用で高効率な 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。DNA・RNA どちらからでも高い増幅効率で増幅が可能です。

- **高い温度で逆転写が可能**

60°C において逆転写が可能のため、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。

<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/>

承認番号 A292K

- **凍結乾燥試薬が調製可能**

凍結乾燥を妨げる Glycerol を含まないため、凍結乾燥用試薬の原料として利用できます。

1. 内容物

品名	HSTTX-219
Hot Start TTx DNA Polymerase <Glycerol Free>	1KU (0.25 mL) × 1 本

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。

品名	QRT-2BS
10×Buffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free>	2 mL × 1 本

緩衝剤、塩類を含む、10×濃度の反応溶液です。dNTP や金属イオン、酵素は含まれておりません。dNTPs、Mn(OAc)₂ や MgCl₂ などの金属イオン、酵素、プライマー、鋳型 DNA や RNA を加え、滅菌水などで 1×濃度に調製して使用してください。凍結乾燥試薬を調製する場合は別途、賦形剤の添加が必要です。

品名	QRT-3BS
2.5×Buffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> Stabilizer plus	8 mL × 1 本

緩衝剤、塩類を含む、2.5×濃度の反応溶液です。dNTP や金属イオン、酵素は含まれておりません。dNTPs、Mn(OAc)₂ や MgCl₂ などの金属イオン、酵素、プライマー、鋳型 DNA や RNA を加え、滅菌水などで 1×濃度に調製して使用してください。凍結乾燥用の賦形剤が含まれており、安定化剤の検討なしで凍結乾燥試薬を調製できます。

2. 安全上の注意

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・反応条件

- ・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。

- (1) Hot Start TTx DNA Polymerase <Glycerol Free>、
10xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free>を用いた PCR 試薬調製例(20 μ L 反応)

試薬の調製例

Components	Volume	Final Concentration
10xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA)<Glycerol Free>	2 μ L	1x
2 mM dNTPs	4 μ L	0.4 mM
25 mM MgCl ₂	2 μ L	2.5 mM
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 <Glycerol Free>	0.25 μ L	1U
Template DNA(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。

dNTPs、MgCl₂は別売しております。関連製品をご参照ください。

2.5xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> Stabilizer plus を使用する場合は、20 μ L 反応液に 8 μ L を添加してください(最終濃度を 1xにしてください)。

プライマーの添加量は各々最終濃度 0.2-0.6 μ M、TaqMan[®] プローブ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。

MgCl₂添加量は最終濃度 2.5 mM を基本としていますが、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できる場合があります。また Mn(OAc)₂を用いても DNA からの増幅は可能です。

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。

PCR 反応サイクル例

Pre-denature :	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。

- (2) Hot Start TTx DNA Polymerase <Glycerol Free>、
10xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free>を用いた PCR・RT-PCR 試薬調製例 (20 μ L 反応)

試薬の調製例

Components	Volume	Final Concentration
10xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA)<Glycerol Free>	2 μ L	1x
2 mM dNTPs	4 μ L	0.4 mM
50 mM Mn(OAc) ₂	1 μ L	2.5 mM
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 <Glycerol Free>	0.25 μ L	1U
Template RNA or DNA(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。

上記の反応液で、DNA、RNA を共に増幅することが可能です。dNTPs、Mn(OAc)₂ は別売しております。関連製品をご参照ください。

2.5xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> Stabilizer plus を使用する場合は、20 μ L 反応液に 8 μ L を添加してください(最終濃度を 1xにしてご使用ください)。

鋳型が RNA の場合、RNase Inhibitor(別売)を 1~40U 添加することで、RNA の安定性を向上させることができます。サンプルに RNase が含まれる場合や反応液を長時間保存する場合、RNase Inhibitor の添加を推奨します。

プライマーの添加量は各々最終濃度 0.2-0.6 μ M、TaqMan[®] プローブ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。

Mn(OAc)₂ 添加量は最終濃度 2.5 mM を基本としていますが、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できる場合があります。

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。

RT-PCR 反応サイクル例

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。

- (3) Hot Start TTx DNA Polymerase <Glycerol Free>、
2.5xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> Stabilizer plus を用いた
凍結乾燥 PCR・RT-PCR 試薬調製例(20 μ L 反応)

試薬の調製例

Components	Volume	Final Concentration
2.5xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> Stabilizer plus	8 μ L	1x
2 mM dNTPs	4 μ L	0.4 mM
50 mM Mn(OAc) ₂	1 μ L	2.5 mM
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 <Glycerol Free>	0.25 μ L	1U
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凍結乾燥機にセットしてください。

10xBuffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> を使用して凍結乾燥する場合は、賦形剤の添加が必要です。dNTPs、Mn(OAc)₂は別売しております。関連製品をご参照ください。

プライマーの添加量は各々最終濃度 0.2-0.6 μ M、TaqMan[®] プローブ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。

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できる場合があります。DNA のみを増幅する場合は、MgCl₂ を使用いただいても凍結乾燥試薬を調製することが可能です。

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。

凍結乾燥サイクル例

Freezing:	25°C to -45°C	70 min. (1°C / min.)
	-45°C	240 min.
Primary drying:	-45°C to -30°C	60 min. (0.25°C / min.)
	-30°C	600 min.
Secondary drying:	-30°C to 20°C	50 min. (1°C / min.)
	20°C	360 min.

反応液のガラス転移温度は約-35°C です。一次乾燥温度は-30~-40°C でご検討ください。

凍結乾燥の条件は、凍結乾燥する試薬の量や用いる凍結乾燥機等で変わります。上記は一例であり、お客様の実施条件で検討することを推奨します。

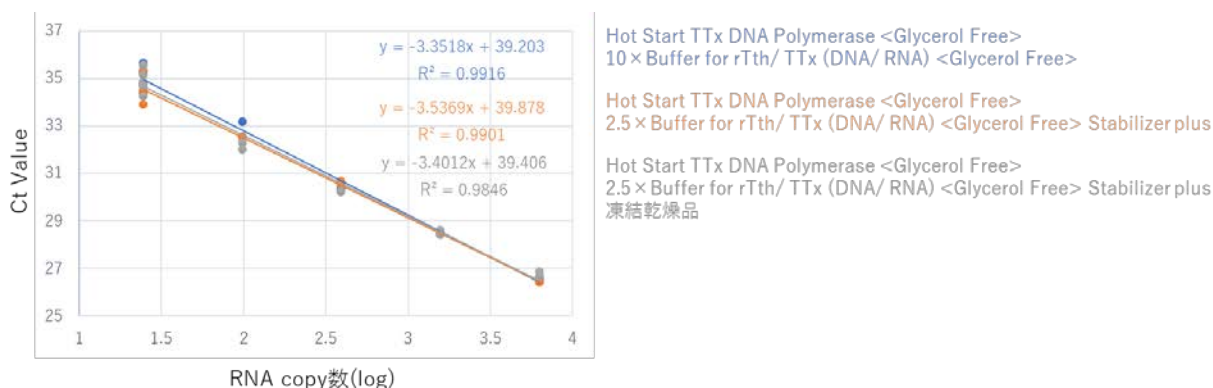
凍結乾燥後の試薬は吸湿しやすいため、乾燥剤存在下にて保存してください。

凍結乾燥品を使用する場合は、乾燥ケーキを鋳型 DNA や RNA を含む 20 μ L の溶液で溶解し、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。反応サイクルは(1)、(2)の調製例をご参照ください。

4. 実施例

Hot Start TTx DNA Polymerase <Glycerol Free>、10 \times Buffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free>、2.5 \times Buffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> Stabilizer plus を用い、TaqMan[®]プローブにて、SARS-CoV-2 RNA (6,250、1,563、391、98、24copy)を検出しました。2.5 \times Buffer for rTth/ TTx (DNA/ RNA) <Glycerol Free> Stabilizer plus については、凍結乾燥後にも同様の検出を行いました。結果、どの組み合わせを用いても 24 コピーが検出でき、凍結乾燥を実施しても反応に影響がないことが確認されました。

□



5. 関連商品

品名	包装	Code No.
<核酸増幅基質> dNTPs Mixture (A, C, G, T each 2mM) dNTPs Mixture (A, C, G, T each 10mM) dNTPs Mixture (A, C, G, U each 2mM)	1 mL×1本 0.2 mL×1本 1 mL×1本	NTP-201 NTP-301 NTP-501
<RNA 増幅用マンガン溶液> 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
<パッシブリファレンス> 50×ROX reference dye	5 mL×1本	ROX-101
<RNase 阻害剤> RNase Inhibitor, Recombinant	2,500 U×1本	SIN-201
<高効率 PCR・RT-PCR 用酵素> Hot Start TTx DNA Polymerase	10,000 U×1本	HSTTX-129
<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
<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

*50 mM Mn (OAc)₂, または 25 mM 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

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/>