



THUNDERBIRD[®] Next Probe qPCR Mix

(Code No. QPX-101, QPX-101T)

取扱説明書

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

TOYOBO

－ 目 次 －

[1] はじめに	1
[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
[5] 最適な反応条件の検討方法	11
[6] 関連プロトコル: RNA サンプルからの cDNA 合成	14
[7] トラブルシューティング	17
[8] 関連商品	20

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キット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。

※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。

[1] はじめに

THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix は、TaqMan® probe などの配列特異的蛍光標識プローブや蛍光標識プライマーなどの各種検出系によるリアルタイム PCR のための 2×濃度のプレミックス試薬です。ROX(別添)、プローブ、プライマー以外の成分があらかじめ混合されているため、反応液調製が簡便化できるとともに、サンプル間の蛍光強度のばらつきが最小限に抑えられ、再現性の高い結果を得ることができます。

本製品は、従来品<THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101)>の組成を更に改良することで、Multiplex 検出や、クルードサンプルからの検出に最適化しました。また、高速 PCR サイクルにも対応しています。

◆本製品の特長◆

- 1. 高い特異性** 組成最適化により、PCR の特異性が向上しました。非特異反応の低減により低濃度ターゲットの検出における信頼性が向上しています。
 - 2. さまざまなターゲットを均一に検出** 新規なエンハンサーを採用。ターゲットごとの PCR 効率のばらつきを最小限に抑えます。
 - 3. 広いレンジで検出可能** 高効率、かつ特異的な増幅により、広い測定レンジで解析が可能です。
 - 4. 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。
 - 5. 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。
 - 6. 高速 PCR サイクルに対応** 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。
 - 7. 高速ホットスタート** 抗 DNA ポリメラーゼ抗体を用いるホットスタートシステムを採用しています。抗体は加温により速やかに失活するため、最初の変性時間を短時間に設定できます。
 - 8. dUTP を使用** 本製品の組成中には 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。別売の Uracil-DNA Glycosylase(UNG), Heat-

labile(Code No. UNG-101)がご使用になれます。

9. さまざまな機器に対応 一般的なブロックタイプの機器のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。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使用する機器（アプライド・バイオシステムズ機器、アジレント・テクノロジーズ機器など）においても、各機種の特性に応じた最適な ROX 濃度でご使用になれます。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。

品名および内容	保存	QPX-101 (500 回用 /20 μ L 反応)	QPX-101T (100 回用 /20 μ L 反応)
THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix	-20°C (または 2~8°C で 3 か月以内)	1.67mL × 3 本	1mL × 1 本
50 × ROX reference dye	-20°C (または 2~8°C) 遮光保存	250 μ L	50 μ L

※QPX-101X5 は、QPX-101 の 5 セット組です。

THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix

反応バッファー、dATP、dCTP、dGTP、dUTP、Mg²⁺、DNA ポリメラーゼ及び抗 DNA ポリメラーゼ抗体などを含む 2 × プレミックス溶液です。鋳型 DNA (cDNA、genomic DNA、virus DNA、plasmid DNA など)とプライマー・プローブ溶液を添加し、滅菌水で 1 × 濃度に調製して使用ください。ROX (passive reference dye)は含まれておりません。

製品到着後は、-20°C で凍結保存してください。使用時は、融解後、ボルテックスミキサーなどでよく混和し溶液を完全に均質化した上でご使用ください。その後は、3 か月以内を目安として、2~8°C で冷蔵保存することができます。長期間使用しない場合は、-20°C で再度凍結保存してください。凍結融解の繰り返しは、10 回程度では品質に影響がないことが確認されています。

50 × ROX reference dye

アプライド・バイオシステムズ機器など、ウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のため、パッシブリファレンスを用いる機器での反応の際に添加してください。最適な添加量は機種により異なります。主な機器の添加量については、[4] 使用方法の項目をご覧ください。また、パッシブリファレンスによる補正を行わない機器では添加する必要はありません。

-20°C または 2~8°C で遮光保存してください。長期間使用しない場合は、-20°C で凍結保存してください。

※ROX reference dye を同一濃度で定常的にご使用される場合、50 × ROX reference dye をあらかじめ THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix へ混合して保存することもできます。混合後はゆるやかに転倒混和し、上記の THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix の保存条件に従って保存してください(ROX の蛍光減衰を防ぐため、混合後は遮光保存してください)。混合比率は以下の通りです。ROX 濃度については、[4] 使用方法の項目をご覧ください。

ROX を 1 × 濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50 × ROX = 1.67mL : 66.8 μ L (QPX-101) または 1mL : 40 μ L (QPX-101T)

ROX を 0.1 × 濃度で使用する場合

qPCR Mix : 50 × ROX = 1.67mL : 6.7 μ L (QPX-101) または 1mL : 4 μ L (QPX-101T)

[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、高速タイプ、ガラスキャピラリータイプなど、各種リアルタイム PCR 装置にご使用になれます。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

目的遺伝子配列に対応したプライマーセットをご用意ください。高感度で定量性のあるデータを得るためには、プライマーの設計が重要となります。以下に、設計時の一般的な注意事項を挙げます。

- 長さは20～30mer、GC含量は40～60%に設定します。
- 増幅領域の長さは200bp以下、可能であれば80～150bp程度に設定してください。長すぎると増幅効率が低下しやすくなります。
- cDNAを検出する場合、増幅領域は可能であればイントロンをはさんだ領域に設定します。これにより、ゲノムDNA由来の増幅を防ぐことができます。
- プライマーの融解温度(melting temperature: T_m)は、60～65°C程度に設定してください。ただし、融解温度は、計算方法により値が異なりますので、あくまで目安としてお考えください。

また、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、非特異反応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。

(3) 蛍光プローブ

目的遺伝子配列に対応した蛍光プローブをご用意ください。プローブの配列設計については、各種プローブの設計のガイドラインに従ってください。

また、プローブの精製純度が十分で無い場合、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プローブをご使用ください。

(4) 鋳型 DNA

本製品では、鋳型 DNA として、cDNA、genomic DNA、plasmid DNA、virus DNA など、各種 DNA を用いることができます。

(a) cDNA

一般的な逆転写反応用試薬などを用いて合成した cDNA 液を、精製せずに滅菌水などで適宜希釈して、そのままリアルタイム PCR 反応液に添加してご使用いただくこ

とができます。

添加量は反応液量の 10%を上限の目安としてください。高濃度の添加は、PCR 反応バッファの組成を大きく変化させ、定量性低下の原因となります。また、リアルタイム PCR での使用が考慮されていない一部の逆転写反应用試薬では、添加可能量は 10%よりも少なくなる場合があります。

※弊社リアルタイム PCR 用 cDNA 合成キット ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code No. FSQ-101)、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix(Code No. FSQ-201)、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code No. FSQ-301) は、リアルタイム PCR での反応阻害を低減させる組成を採用しており、反応液量の 20%まで添加が可能です。

(b) genomic DNA、virus DNA

genomic DNA、virus DNA を鋳型として使用することもできます。添加量は、50 μ L 反応あたり 200ng を上限の目安としてください。

(c) plasmid DNA

plasmid DNA を鋳型として使用することもできます。ただし、環状のまま使用すると、増幅効率が低下し、正しいコピー数を反映しない場合がありますので、制限酵素で切断し、直鎖状にしたものをご使用ください。

また、精製された plasmid DNA 溶液を鋳型として使用する場合、全 DNA 量に対する標的配列のコピー数が極めて高くなるため、反応液への添加量は少なくする必要があります。その際、溶液中の DNA 濃度が極めて低くなることで、DNA が容器への吸着などによって失われやすくなり、リアルタイム PCR 実施の際に、低濃度域での直線性や再現性が大きく低下する原因となります。希釈の際には、反応と関与しない核酸 (yeast RNA など)をキャリアとして希釈液に混合することで、低濃度域の直線性が改善される場合があります。

plasmid DNA のコピー数は、以下の式で簡易的に算出することができます。

$$1\mu\text{g あたりの plasmid DNA のコピー数} = 9.1 \times 10^{11} / \text{plasmid DNA のサイズ(kb)}$$

(5) Uracil-N-Glycosylase (UNG) [オプション]

別売の Uracil-DNA Glycosylase(UNG),Heat-labile(Code No. UNG-101)がご使用になれます。

[4] 使用方法

(1) 反応液の調製

以下に、TaqMan® Probe を用いた 50 μL および 20 μL 反応時の調製例を示します。用いるサーマルサイクラーの特性に合わせ、適宜反応液量を増減させてください。その他の蛍光プローブを用いる場合には、販売元からの情報をご確認ください。

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
滅菌水	XμL	XμL	
THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix	10μL	25μL	1×
Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3μM*1
Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3μM*1
TaqMan® probe	4pmol	10pmol	0.2μM*2
50×ROX Reference dye (Uracil-N-Glycosylase)	0.4 / 0.04μL *3 0.4unit*4	1/0.1μL *3 1unit*4	1×/0.1×*3
DNA 溶液	YμL	YμL	
合計液量	20μL	50μL	

*1 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 アプライド・バイオシステムズ機器やアジレント・テクノロジーズ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。

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、 QuantStudio™、アジレント・テクノロジーズ機器	0.1×(1/500 量)

(オプション)など	
ロッシュ機器、バイオラッド機器、 キアゲン機器など	不要

(2)PCR サイクル条件設定

以下の条件(①高速サイクル、②通常サイクル)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。

①高速サイクル

ステップ	温度	時間	昇降速度
(UNG 反応)	(20~25°C*1)	(10分*1)	(最大)
初期変性	95°C	20秒	最大
PCR	変性	5秒	最大
(40~45cycles)*2	伸長(アニーリング)	10秒	最大

②通常サイクル

ステップ	温度	時間	昇降速度
(UNG 反応)	(20~25°C*1)	(10分*1)	(最大)
初期変性	95°C	20秒	最大
PCR	変性	5秒	最大
(40~45cycles)*2	伸長(アニーリング)	30秒	最大

*1 UNG 処理を行う場合(オプション:UNG は本製品中には含まれません。別売の Uracil-DNA Glycosylase(UNG),Heat-labile(Code No. UNG-101)がご使用になれます。)、初期変性の前に、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。

(2)-1. Applied Biosystems® StepOnePlus™ におけるサイクル条件設定例

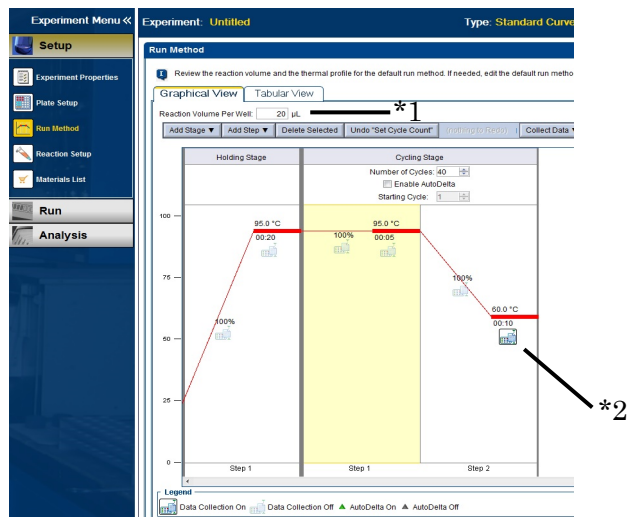
アプライド・バイオシステムズ機器 (Applied Biosystems® StepOnePlus™ など) におけるサイクル条件の設定例をご紹介します。詳細は各取扱説明書を参照してください。(通常ブロックタイプ、ソフトウェアバージョン 2.3)

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)、QuantStudio® Real-Time PCR System など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)Holding Stage を選択し、95°C 20 秒に変更します。
- (6)Cycling Stage を選択し、95°C 5 秒、60°C 10 秒、40 サイクルに変更します。
- (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。



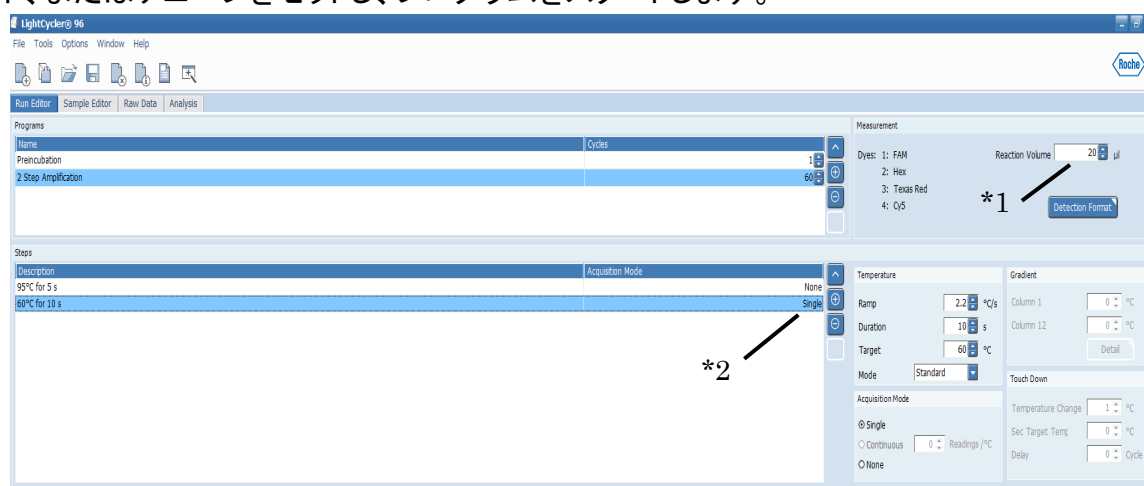
*1 Reaction Volume(µl)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。

*2 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。機器や制御用ソフトウェアの仕様上、25 秒以下に設定できない場合もありますので、取扱説明書をご確認の上、設定可能な時間を適宜設定してください(例: QuantStudio® 5 の 96 ウェルスタンダードでは 25 秒以上、Applied Biosystems® 7000/7300 では 31 秒以上、7500 では 35 秒以上)。

(2)-2. LightCycler®96 におけるサイクル条件設定例

ロッシュ 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、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)Preincubation を選択し、Target 95°C、Duration 20 秒に変更します。
- (5)2 Step Amplification を選択し、Target 95°C、Duration 5 秒、Target 60°C、Duration 10 秒に変更します。
- (6) 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。



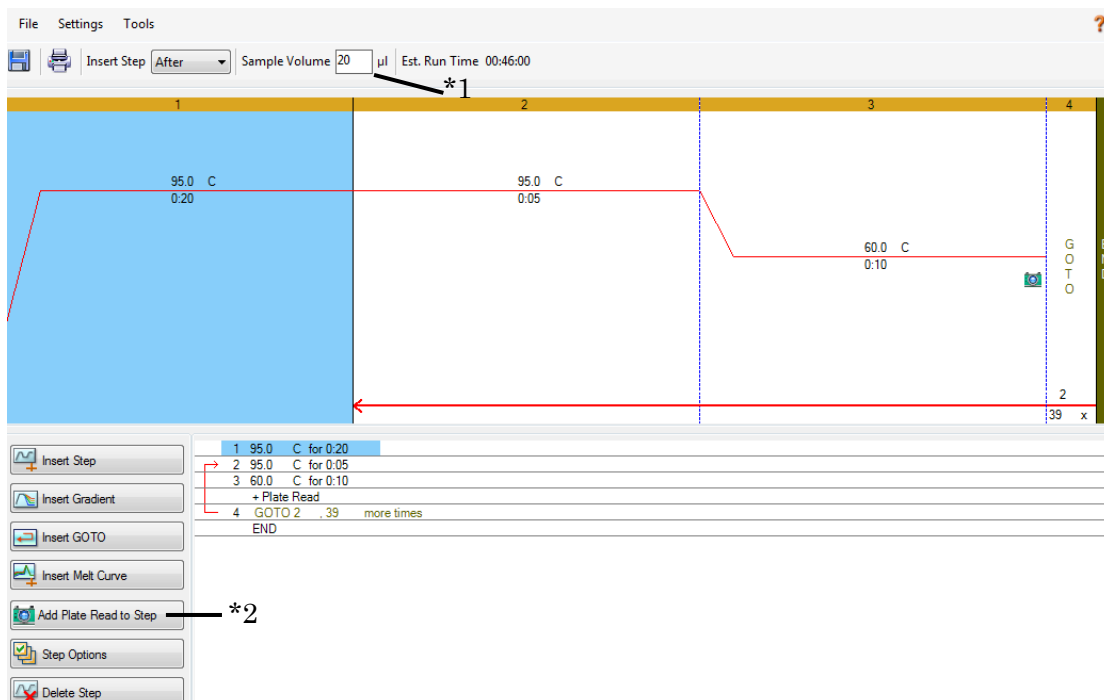
*1 Reaction Volume(µL)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。

*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)-3. CFX96 Touch™ Deep Well におけるサイクル条件設定例

バイオラッド 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)各工程を 95°C 20 秒、95°C 5 秒、60°C 10 秒、40 サイクルに変更します。
- (4)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。



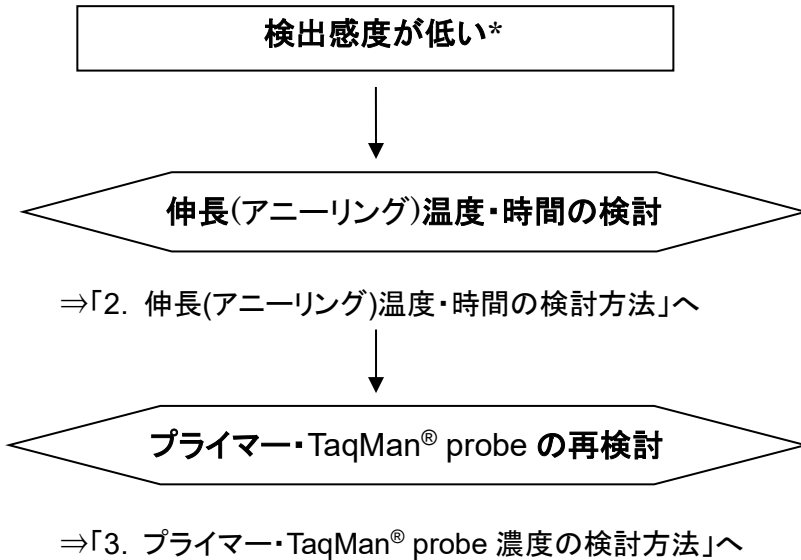
*1 Sample Volume(µL)の欄は、必ず正しい反応液量を入力してください。

*2 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。

[5] 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 (2)PCR 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。



* 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、まずはプライマーおよび TaqMan® probe の設計に問題がないか確認した上で、「[5] 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「[5]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

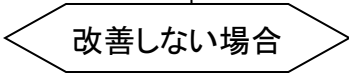
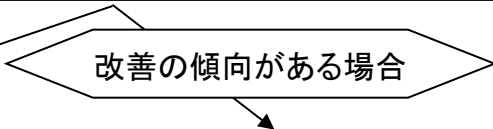
プライマーのアニーリングが不十分な場合は、伸長(アニーリング)温度を下げ、伸長(アニーリング)時間を延長させることにより PCR 効率が改善することがあります。また、TaqMan® probe のアニーリングが不十分な場合は、検出感度が低下することがあり、上記と同様な対応で改善されることがあります。

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
初期変性		95℃	20 秒
PCR	変性	95℃	5 秒
(40cycles)*1	伸長(アニーリング)	60℃	10-30 秒

伸長(アニーリング)温度*2を下げる

ステップ		温度	時間
初期変性		95℃	20 秒
PCR	変性	95℃	5 秒
(40cycles)*1	伸長(アニーリング)	55℃~	10-30 秒



伸長(アニーリング)時間を延長する

ステップ		温度	時間
初期変性		95℃	20 秒
PCR	変性	95℃	5 秒
(40cycles)*1	伸長(アニーリング)	55℃~	~1 分

伸長(アニーリング)温度*2を上げる

ステップ		温度	時間
初期変性		95℃	20 秒
PCR	変性	95℃	5 秒
(40cycles)*1	伸長(アニーリング)	~65℃	10-30 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™ 機能やバイオラッド機器の温度グラジエント(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 0.2 μ M で固定し、プライマー濃度を、0.3～0.5 μ M 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、0.2～0.4 μ M 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 0.2 μ M で固定し、プライマー濃度を、0.2～0.3 μ M を目安に下げてください。

TaqMan[®] probe 濃度を 0.2 μ M 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。

[6] 関連プロトコル: RNA サンプルからの cDNA 合成

本試薬は、さまざまな逆転写反应用試薬を用いて合成した cDNA を鋳型として用いることが可能です。リアルタイム PCR 用に設計された逆転写反应用試薬を用いることで、より感度の高い反応を行うことが可能となります。

弊社 ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code No. FSQ-101)、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix(Code No. FSQ-201)、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code No. FSQ-301)はリアルタイム PCR での使用を考慮して設計された、高効率 cDNA 合成キットです。本製品と組み合わせることで、より信頼性の高い結果を得ることができます。ここでは、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix あるいは ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いたリアルタイム PCR 用 cDNA 合成法について記載します (詳細はキットに添付の取扱説明書をご参照ください)。

●ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix(Code No. FSQ-201)

(1)RNA の変性(オプション)

鋳型として用いる RNA 液を使用量分取し、65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で急冷します。

・この処理を行うことで、高次構造を取り易い RNA に対する逆転写効率が向上する場合がありますので、初めて実験される際には条件検討されることをお勧めします。(この処理を行う場合は、必ず 5×RT Master Mix を添加する前に行ってください。)

(2)反応液の調製

氷上にて、以下のように反応液を調製します。

Nuclease-free Water	X μL
5×RT Master Mix	2 μL
RNA	1pg~1μg 相当
<hr/>	
Total volume	10 μL

(3)逆転写反応

反応液を軽く攪拌して均一にした後、以下の温度でインキュベートします。

37°C,	15 分	(逆転写反応)
50°C,	5 分	(オプション)**	
98°C,	5 分	(酵素失活反応)
4°C,	hold		

** ReverTra Ace[®]は、高温反応性に優れるように改良されています。本工程を入れることにより逆転写効率が向上する場合があります。

反応終了後は、4°C または -20°C で保存します。リアルタイム PCR 実施の際は、
鋳型として反応液に直接または希釈して添加してください。

●ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code No. FSQ-301)

(1) 4 × DN Master Mix と gDNA Remover の混合 (初回ご使用時のみ)

チューブ全量の 4 × DN Master Mix (440 μL) に対し、8.8 μL (50 分の 1 量) の gDNA Remover を添加し、転倒攪拌にてよく混和します。この gDNA Remover を加えた 4 × DN Master Mix は、-20°C にて少なくとも 3 か月間は安定に保存することができます。

- ・短期間で使い切らない場合は、小さい単位で適宜混合してご使用ください。
(例: 4 × DN Master Mix 220 μL + gDNA Remover 4.4 μL)

(2) RNA の変性 (オプション)

鋳型として用いる RNA 液を使用量分取し、65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で急冷します。

- ・この処理を行うことで、高次構造を取り易い RNA に対する逆転写効率が向上する場合がありますので、初めて実験される際には条件検討されることをお勧めします。(この処理を行う場合は、必ず 4 × DN Master Mix を添加する前に行ってください。)

(3) ゲノム DNA 除去反応 (DNase 反応)

氷上にて、以下のように反応液を調製します。

4 × DN Master Mix (gDNA Remover 添加済み)	2 μL
RNA template	0.5 pg ~ 0.5 μg 相当
Nuclease-free Water	X μL
<hr/>	
Total volume	8 μL

反応液を軽く攪拌して均一にした後、37°C で 5 分間インキュベートします。

- ・必要に応じて、適宜スケールアップすることも可能です。

(4) 逆転写反応

引き続き、氷上にて、以下のように反応液を調製します。

(3) の反応液	8 μL
5 × RT Master Mix II	2 μL
<hr/>	
Total volume	10 μL

反応液を軽く攪拌して均一にした後、以下の温度でインキュベートします。

37°C, 15分 (逆転写反応)

50°C, 5分 (オプション)**

98°C, 5分 (酵素失活反応)

4°C, hold

** ReverTra Ace[®]は、高温反応性に優れるように改良されています。本工程を入れることにより逆転写効率が向上する場合があります。

反応終了後は、4°C または -20°C で保存します。リアルタイム PCR 実施の際は、鑄型として反応液に直接または希釈して添加してください。

[7] トラブルシューティング

現象	原因	対策
高濃度サンプルの反応で直線性が乱れる	サンプル溶液中の不純物による反応阻害	サンプルの純度が低い場合、不純物によって PCR が阻害されることがあります。また、リアルタイム PCR 用に設計されていない逆転写反应用試薬により合成した cDNA をご使用の場合、逆転写反応液に含まれる物質によって、反応が阻害されることがあります。サンプル濃度を下げて反応を行うか、サンプルの精製を行ってください。また、逆転写反応にはリアルタイム PCR 用に設計された試薬を用いてください。
低濃度サンプルの反応で直線性が乱れる、または増幅曲線の蛍光強度が低くなる	標的 DNA のコピー数が少なすぎる	反応液中に標的 DNA が数コピーから数十コピーしか含まれない場合、確率的にコピー数のばらつきが大きくなり、直線性が乱れやすくなります。サンプル濃度を上げて反応を行ってください。
	DNA の反応チューブへの吸着	用いたサンプルの DNA 量が少ない場合、またはサンプルを希釈して長時間放置した場合、DNA が反応チューブへ吸着するなどの原因で実質的な鋳型量が減少することがあります。サンプル濃度を上げて反応を行ってください。また、サンプルを希釈して反応を行う場合は、希釈は反応直前に行ってください。
	プライマーダイマーとの競合	一般的に、蛍光プローブを用いたアッセイでは、標的以外の増幅産物に由来するシグナルは検出されませんが、標的配列の増幅と、プライマーダイマーの増幅とが同時に発生した場合、競合によって標的配列の増幅反応が弱くなることがあります。反応条件の再検討を行い、非特異反応の発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更を検討してください。
希釈系列サンプルの増幅曲線の間隔が揃わない、または形状が不揃い	非特異反応との競合	一般的に、蛍光プローブを用いたアッセイでは、標的以外の増幅産物に由来するシグナルは検出されませんが、プライマー配列の特異性が十分でない場合、標的以外の増幅反応が同時発生することで、競合によって標的配列の増幅反応が弱くなる場合があります。反応条件の再検討を行い、非特異反応の発生を回避してください。改善されない場合は、プライマー配列の変更を検討してください。

現象	原因	対策
PCR 効率が 90%を下回る (slope < -3.6)	反応条件の不適合	標的配列によっては、標準の反応条件で十分な PCR 効率が得られない場合があります。 [4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定 に従って、PCR 反応条件の再検討を行ってください。
	プライマーの劣化	プライマーの劣化により、PCR 効率が大きく低下することがあります。プライマーの原液からの再希釈、またはプライマーの再合成を行ってください。
	PCR 効率算出時に、直線から外れた Ct 値を含めた	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れた Ct 値を算出対象から外し、再計算を行ってください。
PCR 効率が 110%を上回る (slope > -3.1)	PCR 効率算出時に、直線から外れた Ct 値を含めた	直線から外れた Ct 値を PCR 効率算出に利用した場合、算出値の誤差が増大します。直線から外れた Ct 値を算出対象から外し、再計算を行ってください。
再現性が良くない	サンプルの純度が低い	サンプルの純度が低いと、PCR への障害が発生し、再現性が低下することがあります。サンプル濃度を下げて反応を行うか、サンプルの精製を行ってください。
	希釈後、長時間放置したサンプルを使用	濃度が薄い DNA 溶液は、容器への吸着によって実効濃度が低下することがあります。原液から再希釈を行ってください。また、希釈系列による標準サンプルは、希釈後の保存は避け、毎回反応時に原液から都度作製してください。
	鋳型に精製プラスミド DNA や PCR 増幅産物を使用	精製プラスミド DNA 溶液や PCR 増幅産物を鋳型として使用する場合、全 DNA 量に対する標的配列のコピー数が極めて高くなるため、反応液への添加量は少なくする必要があります。その際、溶液中の DNA 濃度が極めて低くなることで、DNA が容器への吸着などによって失われやすくなり、特に低濃度域の直線性や再現性が大きく低下する原因となります。希釈の際には、反応と関与しない核酸(Yeast RNA など)を希釈液に混合することで、低濃度域の直線性が改善される場合があります。
	反応条件の不適合	反応条件が至適からずれている場合、反応の再現性が低下することがあります。 [4] 使用方法 (2) PCR サイクル条件設定 に従って、PCR 反応条件の再検討を行ってください。
	プライマー・プローブの品質差	同一の配列を持つプライマーやプローブでも、合成時毎に品質差が発生することがあります。新規に合成を行った際は、従来用いていたものと比較実験を行って、品質差の確認を行ってください。

現象	原因	対策
no-template control (NTC)で増幅が見られる	コンタミネーションの発生	再試時も再現する場合には、試薬類や滅菌水へのコンタミネーションが発生している可能性がありますので、試薬類や滅菌水の更新を行ってください。
	蛍光測定の設定の誤り (multiplex PCR 実施時など)	複数種の蛍光プローブを用いた multiplex PCR において、蛍光測定の設定が正しく行われていない場合、異なる色素のクロストークによるシグナルを誤って検出してしまう場合があります。反応系に含まれる全ての蛍光色素に対して、機器の設定を再確認してください。
増幅曲線の蛍光シグナルが弱い、または増幅曲線の形状がギザギザになる	50 × ROX reference dye の添加量が過剰	パッシブリアレンスを使用する機器において、50 × ROX reference dye の添加量が過剰である場合、蛍光量補正時に蛍光値が低く見積もられることがあります。[4] 使用方法 (1) 反応液の調製に従い、50 × ROX reference dye の添加量を確認してください。
	蛍光測定の設定の誤り	蛍光色素の設定に誤りがあると、正しい検出が行われませんので、機器の取扱説明書をご参照の上、設定を再確認してください。
	蛍光プローブの純度が低い	蛍光プローブの純度が十分でない場合、合成時に残存した未結合の蛍光色素が、ベースライン上昇の原因となり、増幅産物由来の蛍光値が低く見積もられる場合があります。HPLC 精製グレード以上のプローブを用いてください。
	クエンチャー色素の蛍光強度が過剰	TAMRA などの蛍光を発するクエンチャーを用いている場合、クエンチャーが発する蛍光によってベースラインが上昇し、増幅産物由来の蛍光値が低く見積もられる場合があります。non-fluorescent quencher を用いたプローブを使用することで改善される場合があります。
	プローブの劣化	プローブ溶液の保存上の問題により、プローブが分解し、ベースラインが上昇することがあります。また、一部の蛍光色素は、EDTA により劣化する性質を持つものがあります。プローブの合成元推奨の保存条件をご確認ください。
	蛍光測定時間が短い	一部の機器では、PCR の伸長時間が短すぎる場合、蛍光測定が十分に完了しない場合があります。増幅曲線のがたつきが目立つ場合には、伸長時間を長め(45~60 秒)に設定することで、改善される場合があります。
	反応液量が少ない	機器の標準条件よりも少ない液量で反応を行った場合、蛍光測定値の誤差が増大する傾向があります。液量を増やして反応を行ってください。

[8] 関連商品

SYBR® Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬

品名	内容	Code No.
SYBR® Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix	1mL × 1 本 (100 回用 /20 µL 反応)	QPX-201T
	1.67mL × 3 本 (500 回用 /20 µL 反応)	QPX-201

cDNA 合成キット

品名	内容	Code No.
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成キット ReverTra Ace® qPCR RT Kit	200 回用	FSQ-101
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成試薬 プレミックスタイプ ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	200 回用	FSQ-201
リアルタイム PCR 用 cDNA 合成試薬 プレミックスタイプ (ゲノム DNA 除去試薬付き) ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200 回用	FSQ-301

1-step リアルタイム PCR 関連試薬

品名	内容	Code No.
各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出系用 1-step リアルタイム PCR 用試薬 RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	0.5mL × 5 本 (250 回用 /20 µL 反応)	QRT-101
SYBR® Green I 検出系用 1-step リアルタイム PCR 用試薬 RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	0.5mL × 5 本 (250 回用 /20 µL 反応)	QRT-201
高効率 1-step qRT-PCR Kit THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit	250 回用 /20 µL 反応	QRZ-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

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください
<https://lifescience.toyobo.co.jp/>

TOYOBO

【製造・販売元】

— 価格・在庫に関するお問い合わせ —

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

— 製品の内容・技術に関するお問い合わせ —

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/>