



One-step リアルタイム RT-PCR

RNA-direct[®]
**Realtime PCR Master Mix -
ROX Free-**

([Code No. QRT-101RF](#))

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] 関連プロトコル	8
[6] トラブルシューティング	9
[7] 関連商品	12

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。

※TaqMan[®]は、Roche Diagnostic Systems 社の登録商標です。

※SYBR[™]は、Thermo Fisher Scientific 社の商標です。

※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

RNA-direct® Realtime PCR Master Mix -ROX Free-は、*Thermus thermophilus* HB8 株由来の組換え型耐熱性 DNA ポリメラーゼである *rTth* DNA Polymerase が、2 価のマンガンイオン(Mn^{2+})存在下において強い逆転写活性を示すことを利用した、1 酵素系によるワンステップリアルタイム RT-PCR 用 2x マスターミックスです。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。

RNA-direct® Realtime PCR Master Mix -ROX Free-は、各種プローブやプライマーを組み合わせて、TaqMan®アッセイ法によるリアルタイム PCR を実施することができます。

◆本製品の特長◆

1. 逆転写反応とリアルタイム PCRを同一の反応系で実施

RNA-direct® Realtime PCR Master Mix -ROX Free-は、RNAを鋳型として、逆転写反応とPCRを同一の反応系で連続的に行うため、実験系の迅速化、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。

2. 立体構造を取りやすいRNA鋳型や、GC-richな標的配列にも対応

RNA-direct® Realtime PCR Master Mix -ROX Free-は、逆転写反応とPCRを単一の耐熱性酵素 *rTth* DNA Polymerase で行います。耐熱性酵素を用いた逆転写は、一般の逆転写酵素と比較して、反応を高温で実施できるため、立体構造をとりやすい鋳型RNAの反応に適しています。また、*rTth* DNA PolymeraseはGC-richな配列の増幅に有効であることが知られており、リアルタイムPCRにおいても同様に高い増幅効率を期待することができます。

3. 高速ホットスタート

RNA-direct® Realtime PCR Master Mix -ROX Free-は、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、鋳型RNAや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。

4. 高い汎用性

RNA-direct® Realtime PCR Master Mix -ROX Free-は、CFX Connect™ (BIO-RAD社)、LightCycler™ (Roche Diagnostics社)、Thermo Fisher Scientific社製リアルタイムPCR装置など、さまざまなリアルタイムPCR装置に幅広く適合しています。

[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	QRT-101RF (250 回用/20 μ L 反応)
<i>RNA-direct</i> [®] Realttime PCR Master Mix -ROX Free-	-20 $^{\circ}$ C (または 4 $^{\circ}$ C で 2 ヶ月以内)	1.25mL x 2 本
50mM Mn(OAc) ₂	-20 $^{\circ}$ C	500 μ L x 1 本

RNA-direct[®] Realttime PCR Master Mix -ROX Free-

反応バッファー、dNTPs、*rTth* DNA ポリメラーゼ及び抗 DNA ポリメラーゼ抗体などを含んだ 2x 反応溶液です。鋳型 RNA、プライマー、プローブ、Mn(OAc)₂ 溶液を添加し、RNase-free 水で 1x 濃度に調製して使用してください。

-20 $^{\circ}$ C で凍結保存してください。融解後はゆるやかに混和し、溶液を均質化した上でご使用ください。使用後は、-20 $^{\circ}$ C で再度凍結保存してください。ただし、凍結融解の繰り返しは、10 回程度では品質には影響しませんが、なるべく避けてください。一度の使用量が少ない場合は、小分注して保存することをお勧めします。短期間(おおよそ 2 ヶ月以内)であれば、4 $^{\circ}$ C で冷蔵保存することもできます。

本製品には ROX が含まれていません。*RNA-direct*[®] Realttime PCR Mix (Code No. QRT-101) は ROX が添加された qPCR 用試薬です。

50mM Mn(OAc)₂

反応に必要なマンガンイオンの溶液です。通常は反応系に 1/20 volume (終濃度 2.5mM)となるように添加しますが、ターゲットとなる RNA の濃度や種類によっては、添加量を増減させることによりパフォーマンスが向上する場合がありますので、適宜調整してご使用ください。

-20 $^{\circ}$ C で保存してください。

[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. プライマーおよびプローブ

目的遺伝子配列に対応したプライマーセットおよびプローブをご用意ください。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。

プライマーおよびプローブの設計は、各アッセイ系それぞれの注意事項に従って実施してください。高感度で定量性のあるデータを得るためには、プライマーおよびプローブ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挙げます。ただし、各アッセイ系により至適条件が異なる場合がありますので、あくまで参考としてお考えください。

- プライマーの長さは20-30mer、GC含量は40-60%に設定します。
- 増幅領域の長さは200bp以下に設定します。長すぎると増幅効率が低下し、また非特異反応も起こりやすくなるため、検出感度が低下します。
- 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、プローブはエクソンの境界部位に設定します。これにより、ゲノムDNA由来の増幅を防ぐことができます。

3. RNase-free 水

フィルター濾過により調製された RNase-free 水の使用をお勧めします。ジエチルピロカーボネート(DEPC)処理水を使用する場合は、DEPC の残留により反応が阻害されることがありますので、オートクレーブを十分に行って DEPC を完全に除去してください。また、リアルタイム PCR に使用する RNase-free 水は、核酸の混入を防ぐため、他の実験用とは別に保存し、共用しないことをお勧めします。

4. 鑄型 RNA

本製品では、鑄型 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

AGPC(Acid Guanidium - Phenol - Chloroform)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等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 等を用いてゲノム DNA を除去してください。

組織、培養細胞等から得られた Total RNA には、発現解析の対象となる mRNA が通常 1-2%程度含まれています。

(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 に比べてリボヌクレアーゼ(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) ウイルス RNA

AGPC 法やスピнка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イルス RNA を使用することが可能です。

[4] 使用方法

1. 反応液の調製

以下に 20 μ L 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て、適宜反応液量を増減させてください。

試薬	20 μ L 反応	最終濃度
RNase free water* ¹	X μ L	
RNA-direct [®] Realtime PCR Master Mix -ROX Free-	10 μ L	
50mM Mn(OAc) ₂	1 μ L	2.5mM* ³
Forward primer	10pmol	0.5 μ M* ²
Reverse primer	10pmol	0.5 μ M* ²
TaqMan [®] probe	4pmol	0.2 μ M* ²
RNA 溶液	Y μ L* ⁴	
合計液量	20 μ L	

*1 Distilled Water は RNase-free グレードのもの(RNase-free 水)をご使用ください。フィルター濾過により調製された RNase-free 水の使用をお勧めします。ジエチルピロカーボネート(DEPC)処理水を使用する場合は、DEPC の残留により反応が阻害されることがありますので、オートクレーブを十分に行って DEPC を完全に除去してください。また、リアルタイム PCR に使用する RNase-free 水は、他の実験用とは別に保存し、共用しないでください。

*2 プライマーの添加量は各々4-12 pmol (最終濃度 0.2-0.6 μ M)、TaqMan[®]プローブの添加量は 1-6 pmol (最終濃度 0.05-0.3 μ M)を目安にご検討ください。既製品のプライマー・プローブセットを用いる場合は、各製品の推奨条件をそのまま適用してください。PCR 効率が低い場合は、「[6]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」を参照してください。

*3 Mn(OAc)₂ 添加量は最終濃度 2.5mM 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。

*4 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。20 μ L 反応液中に Total RNA は 1 μ g 以下、poly(A)⁺ RNA (mRNA)は 200ng 以下を目安に添加してください。

2. PCR の実施

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。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
初期変性*1		90°C	30 秒
逆転写反応		60°C	20 分
PCR	変性	95°C	5 秒
(45cycles) *2	伸長(アニーリング) *3	60°C	45 秒

*1 本製品では高速ホットスタートシステム(p.2 参照)を採用していますので、最初の変性ステップにおける酵素の再活性化は 90°C、30 秒間で十分に行うことができます。必要以上の加熱処理は、酵素活性を低下させ、また鋳型 RNA の安定性にも悪影響を及ぼす可能性があります。

*2 増幅が不十分な場合はサイクルを 50 までを目安に増やしてください。

*3 PCR 効率が低い場合は、「[6]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」を参照してください。

[5] 関連プロトコル

●Total RNA の DNase I 処理

AGPC(Acid Guanidium-Phenol-Chloroform)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。必要に応じて、下記の方法によりゲノム DNA を除去してください。

(1)反応液調製

反応液組成(一例)

Distilled Water (RNase-free grade)	up to 10 μ L
Total RNA	X μ g
10x DNase I Buffer	1 μ L
RNase-free DNase I (10U/ μ L)	0.5 μ L
Total volume	10 μ L

(2)反応と精製

上記反応組成液を調製し、氷上で 10 分から 30 分間静置して反応させます。

↓

反応液に 100 μ L の Distilled Water、100 μ L の TE 飽和フェノールを添加し、ボルテックス等で混合した後、氷上で 5 分間静置します。

↓

12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を回収します。

↓

100 μ L のクロロホルムを添加し、混合します。

↓

12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を回収します。

↓

5 μ L の 20mg/mL グリコーゲン(共沈剤)、100 μ L の 5M 酢酸アンモニウム、200 μ L のイソプロパノールを添加し、混合した後、-20 $^{\circ}$ C で 30 分間静置します。

↓

12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を廃棄します。

↓

沈殿に 70%エタノールを加えます。

↓

12,000rpm、5 分間の遠心分離を行い、上清を廃棄します。

↓

沈殿に適量の Distilled Water を加え、溶解します。

[6] 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	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。伸長(アニーリング)温度を下げて改善しない場合は、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。
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。各々4-12 pmol (最終濃度 0.2-0.6 μ M)、TaqMan [®] プローブの添加量は1-6 pmol (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。

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 の再設計を検討してください。
---	---

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、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	「[6]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。

[7] 関連商品

ROX が添加された One-step Real-time RT-PCR 用試薬

品名	内容	Code No.
One-step リアルタイム PCR 用マスターミックス RNA-direct[®] Realtime PCR Master Mix	500 μ L \times 5 本 (500 μ L \times 5 本) \times 5	QRT-101 QRT-101 \times 5
One-step リアルタイム 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	500 μ L \times 5 本 (500 μ L \times 5 本) \times 5	QRT-201 QRT-201 \times 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 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 Magical Trapper	1 個	MGS-101

リアルタイム PCR 関連試薬

品名	内容	Code No.
リアルタイム PCR 用マスターミックス (プローブアッセイ用) Realtime PCR Master Mix	1mL \times 5 本 (1mL \times 5 本) \times 5	QPK-101 QPK-101X5
リアルタイム PCR 用マスターミックス (SYBR [™] Green アッセイ用) SYBR[™] Green Realtime PCR Master Mix	1mL \times 5 本 (1mL \times 5 本) \times 5	QPK-201 QPK-201X5
信頼性がさらに向上したリアルタイム PCR 用マスターミックス (SYBR [™] Green アッセイ用) SYBR[™] Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	1mL \times 5 本 (1mL \times 5 本) \times 5	QPK-212 QPK-212X5
各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出系用 リアルタイム PCR 試薬 THUNDERBIRD[®] Probe qPCR Mix	1mL \times 1 本 1.67mL \times 3 本 (1.67mL \times 3 本) \times 5	QPS-101T QPS-101 QPS-101X5
SYBR [™] Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 THUNDERBIRD[®] SYBR[™] qPCR Mix	1mL \times 1 本 1.67mL \times 3 本 (1.67mL \times 3 本) \times 5	QPS-201T QPS-201 QPS-201X5
高効率 SYBR [™] Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 THUNDERBIRD[®] Next SYBR[™] qPCR Mix	1mL \times 1 1.67mL \times 3	QPX-201T QPX-201
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 合成マスターミックス ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix	200 回用	FSQ-201
ゲノム DNA 除去試薬をプラスしたリアルタイム PCR 用 cDNA 合成試薬 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200 回用	FSQ-301
高伸長性・高反応効率の改良型逆転写酵素 ReverTra Ace[®]	10,000U \times 1 本 (10,000U \times 1 本) \times 5 (10,000U \times 1 本) \times 10	TRT-101 TRT-101X5 TRT-101X10
ゲノム DNA の混入を抑えた組換え型 RNase 阻害剤 RNase Inhibitor, Recombinant	2,500U \times 1 本 (2,500U \times 1 本) \times 5	SIN-201 SIN-201X5

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/>