



高効率 1-step qRT-PCR Master Mix

**THUNDERBIRD<sup>®</sup>**  
**Next Probe One-step**  
**qRT-PCR 4×Mix**  
(Code No. QRX-101)

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	2
[3] 製品のほかに用意するもの	3
[4] 使用方法	4
1. プライマーおよび TaqMan® プロブの設計方法と性能の確認	4
2. 反応液の調製	5
3. サイクル条件設定	6
[5] 凍結乾燥の最適化ガイドライン	7
1. 凍結乾燥前の PCR・RT-PCR 試薬調製例	7
2. 凍結乾燥機での凍結乾燥工程	7
[6] 実施例	8
[7] トラブルシューティング	10
[8] 関連商品	12

---

## ご注意

---

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、SDSを参照し安全に留意してください。本製品は、食品、化粧品として決して使用しないでください。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。

※その他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 One-step qRT-PCR 4xMix は、高効率逆転写酵素「ReverTra Ace®」と高効率 PCR 酵素「TTx DNA Polymerase」を用いた 2 酵素系による 1-step リアルタイム RT-PCR のマスターミックスです。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。

本製品は逆転写酵素と PCR 酵素および反応 Buffer が一液化されており、簡便な操作で反応液調製が可能です。また、逆転写反応と PCR 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。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することが可能です。

また、高効率な酵素を採用しており、迅速かつ高感度な反応を可能にします。生体由来成分など PCR を阻害する夾雑物存在下での効率的な増幅、複数遺伝子を同時に検出するマルチプレックス反応にも対応しています。

さらに、本製品は、グリセロールを含まない形で賦形剤が含まれており、凍結乾燥することが可能です。凍結乾燥後は室温で安定に保存でき、保冷剤などを必要とせず輸送することが可能です。また、鋳型を含むサンプルや水を加えるだけで、すぐにリアルタイム PCR 反応可能です。凍結乾燥することで性能に影響しないことを確認しております。

### ◆本製品の特長◆

#### 1. 迅速・高感度

プローブを用いる 1-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 ウイルスや発現量の少ない mRNA の定量に利用できます。本製品は、「伸長時間 10 秒の高速サイクル」でも「伸長時間 45 秒のサイクル」と同程度で効率的な増幅が可能であることを確認しております。

#### 2. 簡便な操作

THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix は、逆転写酵素、DNA Polymerase、反応バッファー、dNTP が一液化されており、反応液調製のための時間が節約でき、コンタミネーションやピペッティングエラーのリスクも抑えられます。

#### 3. 高い夾雑物耐性

夾雑物に耐性のある高効率な酵素を採用し、生体由来成分などの PCR を阻害する夾雑物存在下でも効率的な増幅が実施できます。

#### 4. dUTP を使用

本製品は THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix 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ていませんので、別売りの Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (Code No.UNG-101)またはセット品(Code No. QRX101 /UNG101)をご利用ください。

## 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<sup>®</sup> プローブを使用することで、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. 凍結乾燥試薬が調製可能

凍結乾燥を妨げるグリセロールを含まず、凍結乾燥用の賦形剤を入れております。また、凍結乾燥することで性能に影響しないことを確認しております。

## 7. 高速ホットスタート

抗 DNA Polymerase 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。

# [2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。

THUNDERBIRD<sup>®</sup> Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix  
(Code No. QRX-101)

品名および内容	保存	QRX-101 (250 回用*)
THUNDERBIRD <sup>®</sup> Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix	-20°C	1.25mL
50xROX reference dye	-20°C	100μL

\*20μL 反応系での反応回数を記載

## THUNDERBIRD<sup>®</sup> Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix

- ・反応バッファー、逆転写酵素、DNA Polymerase、dATP、dCTP、dGTP、dUTP 等を含む、4x濃度の反応溶液です。
- ・プライマー・プローブ、鋳型 RNA、滅菌水を加え、1x濃度に調製して使用してください

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。

### [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<sup>®</sup> 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 TaqMan<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> プローブ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<sup>®</sup> プローブ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。

## [4] 使用方法

### 1. プライマーおよび TaqMan<sup>®</sup> プローブの設計方法と性能の確認

#### (1) プライマーおよび TaqMan<sup>®</sup> プローブの設計方法

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<sup>®</sup> 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ご紹介します。

#### (a) プライマー

- ・18～25mer、GC 含量は 40～60%、融解温度( $T_m$ )\*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。
- ・プライマーが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<sup>®</sup> プローブ

- ・20～30mer、GC 含量は 40～60%、融解温度( $T_m$ )\*は 65～70℃を目安に設定してください。
- ・TaqMan<sup>®</sup> プローブ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<sup>®</sup> プローブの  $T_m$  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<sup>®</sup> プローブの  $T_m$  値は  $Na^+$ 濃度を 50mM、プライマー・TaqMan<sup>®</sup> プローブ濃度を 0.5 $\mu$ M 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  $T_m$  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](https://lifescience.toyobo.co.jp/user_data/pcr_tm.php)

#### (2) プライマーおよび TaqMan<sup>®</sup> プローブの性能の確認

プライマーおよび TaqMan<sup>®</sup> プローブ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、反応液に添加します。

(例: Total RNA 量の希釈系列、0.2ng/ $\mu$ L、2ng/ $\mu$ L、20ng/ $\mu$ L を調製し、20 $\mu$ L

反応系に 5 $\mu$ L ずつ添加します。)

- (b) 検量線を作成し、PCR 効率が 85~115%程度、 $R^2$  値が  $R^2 \geq 0.98$  程度であることを確認します。PCR 効率、 $R^2$  値がこの範囲から外れる場合は、伸長(アニーリング)温度・時間の検討およびプライマー・TaqMan<sup>®</sup> プローブ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<sup>®</sup> プローブを再設計してください。

## 2. 反応液の調製

以下に 50 $\mu$ L および 20 $\mu$ 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、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<sup>®</sup> プローブセットの性能、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	20 $\mu$ L反応	50 $\mu$ L反応	最終濃度
RNase free water	X $\mu$ L	X $\mu$ L	
THUNDERBIRD <sup>®</sup> Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix	5 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L	1x
Forward Primer	10pmol	25pmol	0.5 $\mu$ M <sup>*1</sup>
Reverse Primer	10pmol	25pmol	0.5 $\mu$ M <sup>*1</sup>
TaqMan <sup>®</sup> probe	4pmol	10pmol	0.2 $\mu$ M <sup>*2</sup>
50xROX Reference dye (Uracil-N-Glycosylase)	0.4 / 0.04 $\mu$ L <sup>*3</sup>	1/0.1 $\mu$ L <sup>*3</sup>	1x/0.1x <sup>*3</sup>
RNA溶液	Y $\mu$ L <sup>*5</sup>	Y $\mu$ L <sup>*5</sup>	
合計液量	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L	

\*1 0.5 $\mu$ M で良好な結果が得られない場合は、0.2 $\mu$ M から 0.5 $\mu$ M を目安にご検討ください。

\*2 0.2 $\mu$ M で良好な結果が得られない場合は、0.2 $\mu$ M から 0.4 $\mu$ M を目安にご検討ください。

\*3 Applied Biosystems<sup>®</sup>製機器やアジレント・テクノロジーズ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 (UNG)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 (Code No. 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	1x(1/50 量)
Applied Biosystems® 7500、7500Fast、QuantStudio®、アジレント・テクノロジーズ機器(オプション)など	0.1x(1/500 量)
ロシュ機器、バイオラッド機器、キアゲン機器など	不要

### 3. サイクル条件設定

以下の通常または高速のサイクル条件を推奨します。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。

#### 通常サイクル条件

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

#### 高速サイクル条件

ステップ	温度	時間	
逆転写反応	50°C	10 分	
初期変性	95°C	30 秒	
PCR	変性	95°C	5 秒
(40~45cycles)* <sup>1</sup>	伸長(アニーリング)	60°C	10 秒

\*<sup>1</sup> 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] 凍結乾燥の最適化ガイドライン

### 1. 凍結乾燥前の PCR・RT-PCR 試薬調製例

凍結乾燥をおこなう前に 20 $\mu$ L 反応液を調製してください。

試薬	20 $\mu$ L反応	最終濃度
RNase free water	X $\mu$ L	
THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix	5 $\mu$ L	1x
Forward Primer	10pmol	0.5 $\mu$ M
Reverse Primer	10pmol	0.5 $\mu$ M
TaqMan® probe	4pmol	0.2 $\mu$ M
合計液量	20 $\mu$ L	

### 2. 凍結乾燥機での凍結乾燥工程

共和真空技術株式会社の真空凍結乾燥機(フリーズドライ装置)Triomaster II を用いる場合の凍結乾燥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。

#### 凍結乾燥サイクル例

Step	Temperature	Time	Pa	Description
Freezing	-45°C	240 min		Hold
Primary Drying	-40°C	5.0°C /60min	20.0	Ramp
	-40°C	600 min	20.0	Hold
Secondary Drying	+20°C	1.0°C /min	2.0	Ramp
	+20°C	360 min	2.0	Hold

凍結乾燥条件は、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、お客さま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  $\mu$ 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[4]使用方法の 3. サイクル条件設定 をご参照ください。

## [6] 実施例

### 実験例:凍結乾燥前後における RNA の検出

#### <方法>

THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix を用いて、凍結乾燥前後でインフルエンザ A 型の RNA 検出を試みました。20 $\mu$ L の反応液を調製後、凍結乾燥を実施し、凍結乾燥後のケーキを再水和しました。また、凍結乾燥後の比較として、凍結乾燥前の反応液を調製しました。インフルエンザ A 型の RNA は、4 倍希釈(5 段階)で、20 $\mu$ L 反応系に対し  $1.5 \times 10^3 \sim 5.9$  copies/test になるように添加しました。

#### 1. 反応液調製

試薬	20 $\mu$ L 反応	最終濃度
RNase free water	X $\mu$ L	
THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix	5 $\mu$ L	1x
Forward Primer	10pmol	0.5 $\mu$ M
Reverse Primer	10pmol	0.5 $\mu$ M
TaqMan® probe	4pmol	0.2 $\mu$ M
合計液量	20 $\mu$ L	

#### 2. プライマー・プローブの配列情報

インフルエンザ A 型	配列 (5' - 3')
Forward Primer	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA
Reverse Primer	GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA
TaqMan® probe	[FITC(6FAM)]- TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG -[BHQ1]

#### 3. 凍結乾燥条件

Step	Temperature	Time	Pa	Description
Freezing	-45°C	240 min		Hold
Primary Drying	-40°C	5.0°C /60min	20.0	Ramp
	-40°C	600 min	20.0	Hold
Secondary Drying	+20°C	1.0°C /min	2.0	Ramp
	+20°C	360 min	2.0	Hold

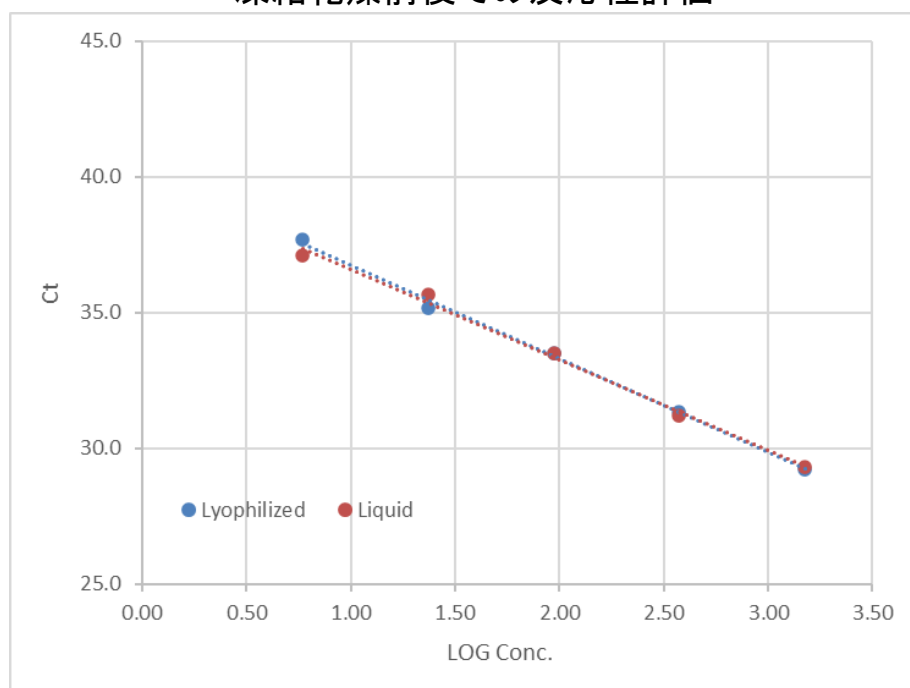
#### 4. サイクル条件 (CFX96 Touch Deep Well リアルタイム PCR 解析システム)

ステップ		温度	時間
逆転写反応		50°C	10 分
初期変性		95°C	30 秒
PCR (40 cycles)	変性	95°C	5 秒
	伸長(アニーリング)	60°C	10 秒

#### <結果>

1.5×10<sup>3</sup>~5.9 copies/test でインフルエンザ A 型 RNA の検出について、凍結乾燥前後で比較したところ、同等な感度で検出でき、PCR 効率、R<sup>2</sup> に差は認められませんでした。本製品は、凍結乾燥前後で極微量な 5.9 copies の良好な増幅が得られ、凍結乾燥による影響がないことが確認できました。

凍結乾燥前後での反応性評価



	Lyophilized	Liquid
PCR 効率	95.0%	99.4%
R <sup>2</sup>	0.99	0.99

## [7] 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) ROX 濃度の不具合

原因	対策
50xROX Reference dye 濃度が不適切	50xROX 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。50xROX Reference dye 濃度が適切か確認してください。

#### (4) サイクル条件

原因	対策
変性温度、伸長(アニーリング)温度、時間が不適切	変性、伸長(アニーリング)の温度と時間は、指示に従って最適化する必要があります。 反応サイクルは[4]使用方法の 3. サイクル条件設定 をご参照ください。

## 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 <sup>®</sup> プローブの設計方法と性能の確認」を参考にプライマーおよび TaqMan <sup>®</sup> 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) 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。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。
THUNDERBIRD <sup>®</sup> Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix を正確な量添加できていない	粘性が高く操作が困難な場合、室温に戻してからピペット操作してください。それでもピペット操作が困難な場合は、一度 2x に希釈してからご使用ください。

### 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 <sup>®</sup> プローブ の設計に問題がある	TaqMan <sup>®</sup> プローブ が非特異的な結合をしている可能性があります。TaqMan <sup>®</sup> プローブを再設計することにより改善する場合があります。

## [8] 関連製品

### 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
グリセロールフリー熱感受性(Heat-labile) UNG Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile<Glycerol Free>	200 U	UNG-201

### 1-step リアルタイム PCR 関連試薬

品名	内容	Code No.
高効率 1-step qRT-PCR Kit THUNDERBIRD <sup>®</sup> Probe One-step qRT-PCR Kit	250 回用 /20 $\mu$ L 反応	QRZ-101

### RNA 精製関連試薬

品名	内容	Code No.
磁性ビーズを用いる簡便なウイルス RNA 精製キット MagExtractor <sup>™</sup> -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 <sup>™</sup> -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 <sup>®</sup>	1 個	MGS-101

# 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/>