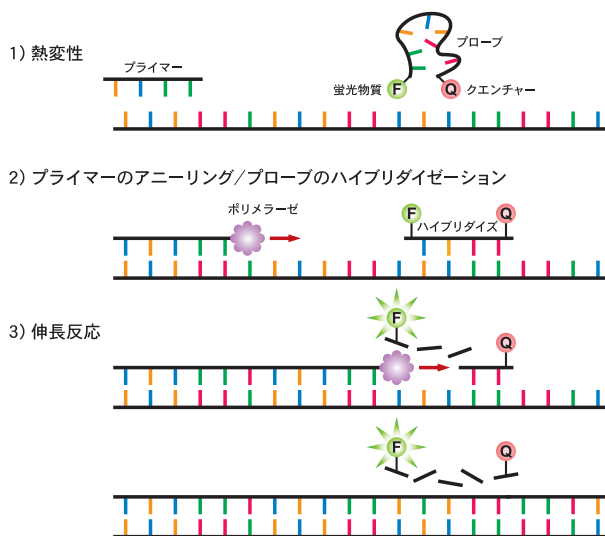


TaqMan[®]プローブ検出によるリアルタイムRT-PCR

TaqMan[®]プローブ検出の原理

5'側をFAMなど蛍光物質で、3'側をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチド(TaqMan[®]プローブ)を反応系に加えます。アニール条件下では、プローブはテンプレートDNAに特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されます。一方、伸長反応時にはTaq DNAポリメラーゼの持つ5'→3'exonuclease活性により、テンプレートにハイブリダイズしたTaqMan[®]プローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されて蛍光を発します。



タカラバイオでは、TaqMan®プローブを用いたリアルタイムRT-PCR実験をトータルにサポートする各種製品をご用意しています。最適な製品をお選びいただくことで、高感度で特異性の高いリアルタイムRT-PCRが可能になります。

TaqMan® プローブ検出によるリアルタイムRT-PCR反応手順

Step 1

鋳型RNAの調製

- 簡単操作で高純度 total RNAの調製が可能なスピンカラムタイプキット
NucleoSpin® RNA II (製品コード 740955.10/.50/.250)
- 大量調製にも適したAGPC法による抽出試薬
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)

Step 2

逆転写反応(2ステップリアルタイムRT-PCRの場合)

- わずか15分でリアルタイムPCRに最適な鋳型cDNAを合成可能。
ゲノムDNA除去反応をプラスした製品もラインナップ
PrimeScript® RTキットシリーズ
(製品コード RR037A/B、RR036A/B、RR047A/B)

Step 3

プライマー・プローブの準備

目的のプライマー、プローブを正規サービスプロバイダーよりご購入ください。

Step 4

リアルタイムPCR/1ステップリアルタイムRT-PCR

【試薬】

- TaqMan®プローブ検出専用
リアルタイムPCR試薬
Premix Ex Taq™
(Probe qPCR)
(製品コード RR390A/B)



- 増幅効率に優れた
1ステップリアルタイムRT-PCR試薬
One Step PrimeScript®
RT-PCR Kit
(Perfect Real Time)
(製品コード RR064A/B)

【装置】

- コンパクトで高性能、ソフトウェアの操作性も抜群
Thermal Cycler Dice® Real Time System //
(製品コード TP900/TP960)

total RNAの調製

動物組織・細胞などからのtotal RNA調製

NucleoSpin® RNA II

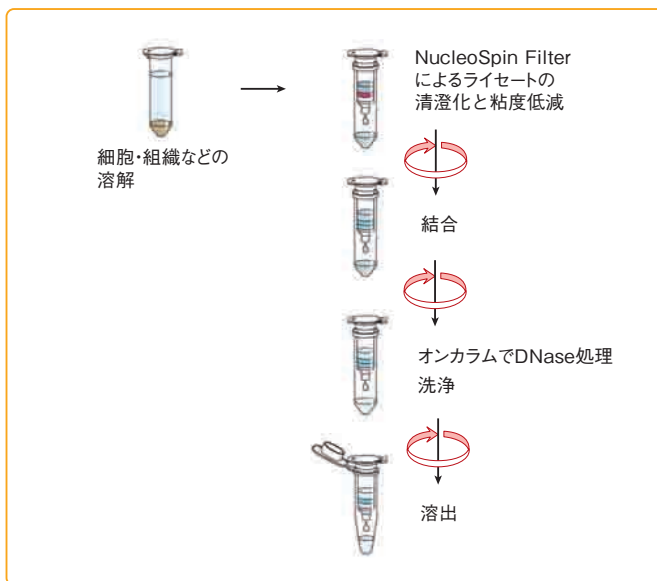
本製品はマッハライ・ナーゲル社の製品です。



| 製品コード | 容量 | 価格(税別) |
|------------|------|----------|
| 740955.10 | 10回 | ¥8,000 |
| 740955.50 | 50回 | ¥31,800 |
| 740955.250 | 250回 | ¥136,800 |

- 動物組織、培養細胞、細菌、酵母などから効率よくtotal RNAを精製
- NucleoSpin® Filterによりライセートを清澄化し粘度を下げることで、ゲノムDNAの混入を低減
- オンカラム処理用の高純度rDNaseを添付

プロトコールの概要



製品仕様

| | |
|----------------------|---|
| 原理 | シリカメンブレン法 |
| 形状 | ミニスピナカラム |
| サンプル量 | 培養細胞：～5×10 ⁶ cells バクテリア：～10 ⁹ cells 酵母：～10 ⁸ cells 動物組織：～30 mg |
| 精製サイズ | >200 bases |
| 回収量 | 14 µg (HeLa細胞、10 ⁶ cells) 70 µg (バクテリア、10 ⁹ cells) |
| A _{260/280} | 1.9～2.1 |
| 標準的 RIN* | >9 |
| 溶出液量 | 40～120 µl |
| 精製時間 | 30分 |
| 結合容量 | 200 µg |

*RIN：RNA Integrity Number

AGPC法によるtotal RNA抽出試薬

RNAiso Plus

| 製品コード | 容量 | 価格(税別) |
|-------|--------|---------|
| 9108 | 100 ml | ¥17,000 |
| 9109 | 200 ml | ¥29,000 |

- 培養細胞、動植物組織から効率よくtotal RNAを抽出
- 実績あるAGPC法による抽出試薬
- サンプル量が多い場合やtotal RNAを大量に回収したい場合に特にお勧め！



有機溶媒層が鮮やかな赤色を呈するので、水層との境目がとてもわかりやすく操作が簡単！

total RNA回収量の目安

| 組織材料 | サンプル量 | total RNA回収量 |
|-------------|-----------------------|--------------|
| マウス肝臓 | 1 g | 約 5,000 µg |
| マウス腎臓 | 1 g | 約 3,000 µg |
| マウス骨格筋 | 1 g | 約 1,500 µg |
| マウス脳 | 1 g | 約 1,500 µg |
| HL60 培養細胞 | 1 × 10 ⁷ 個 | 約 100 µg |
| タバコ葉 | 1 g | 約 1,000 µg |
| 白血球細胞 (全血*) | 1 × 10 ⁷ 個 | 20～40 µg |
| | 1 ml | 15～20 µg |

*全血 100 µl に対し、1 ml の RNAiso Plus を使用した。
注意：回収量はサンプルの状態、ホモジナイズ条件などにより変動します。

逆転写反応(2ステップリアルタイムRT-PCRの場合)

2ステップリアルタイムRT-PCR用逆転写試薬(セパレートタイプ)

PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time)

| 製品コード | 容量 | 価格(税別) |
|--------|------|----------|
| RR037A | 200回 | ¥38,000 |
| RR037B | 800回 | ¥130,000 |

2ステップリアルタイムRT-PCR用逆転写試薬(完全プレミックスタイプ)

PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)

| 製品コード | 容量 | 価格(税別) |
|--------|------|----------|
| RR036A | 200回 | ¥38,000 |
| RR036B | 800回 | ¥130,000 |

● 逆転写反応がわずか**15分**で完了!

伸長性にすぐれたPrimeScript® RTaseなら、わずか15分で効率よくリアルタイムPCR用の鋳型cDNAを合成できます。

● 広い濃度範囲で高い**リニアリティ**を実現!

1 pg~1 µgのtotal RNAを安定に逆転写できます(10 µl 反応系)。広い濃度範囲で高い直線性が得られます。

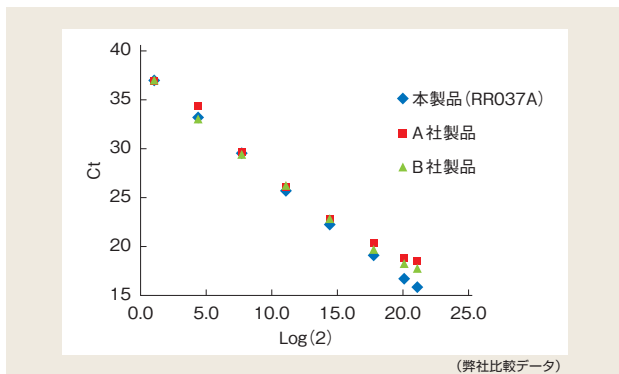
● **2種類のプライマー**でリアルタイムPCRに最適なcDNAを合成!

RR037の標準プロトコール、ならびにプレミックスタイプのRR036では、Oligo dT PrimerとRandom 6 mersにより偏りの少ないcDNA合成を行います。polyAに近いターゲットもpolyAから離れたターゲットでも、効率よくリアルタイムPCR検出が可能です。なお、**RR037ではTaqMan®アッセイ用にさらに最適化したプロトコール**を用意しています。

広い濃度範囲で高いリニアリティを実現

【方法】PrimeScript® RT reagent KitおよびA社、B社の逆転写キットを用いてそれぞれ推奨条件で逆転写反応を行い、リアルタイムPCRにおける検量線の直線性を比較した。

【結果】PrimeScript® RT reagent Kitを使用した場合の検量線が、広範囲にわたり最も高い直線性を示しました。



● 逆転写反応 (20 µl 反応系)

鋳型 : マウス肝臓由来 total RNA 2 pg~2 µg および滅菌水

● リアルタイムPCR (25 µl 反応系)

試薬 : SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)
 鋳型 : 上記の逆転写反応液 各 2 µl
 測定遺伝子 : *Rps18*
 プライマー : Perfect Real Time サポートシステムのプライマーを使用
 装置 : Thermal Cycler Dice Real Time System

RR037とRR036の違い

PrimeScript® RT reagent Kit (RR037)

- ・セパレートタイプの基本キット
- ・逆転写用プライマーの選択が可能
- ・TaqMan®アッセイ用プロトコールあり

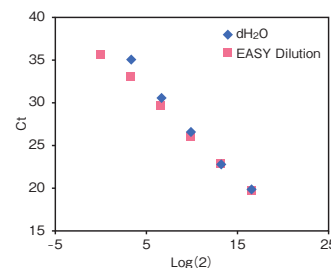
PrimeScript® RT Master Mix (RR036)

- ・5×濃度の完全プレミックスタイプ
- ・鋳型RNAと水を添加するだけ!
- ・操作簡便、ハイスループットにも対応

鋳型希釈用溶液を添付

PrimeScript® RTキットシリーズの各製品(RR037, RR036, RR047)にはtotal RNAやcDNAを段階希釈するための希釈溶液として**EASY Dilution**が添付されています。

<希釈溶液による定量可能な濃度範囲の比較>



EASY Dilutionを用いた希釈系列では、鋳型を安定な状態で低濃度まで正確に希釈でき、dH2Oを用いた場合と比較して定量可能な範囲が拡大していることがわかります。

PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time)

製品コード RR037A (10 µl 反応系、200回用)

| | |
|--|--------|
| 5×PrimeScript® Buffer (for Real Time) *1 | 400 µl |
| PrimeScript® RT Enzyme Mix I*2 | 100 µl |
| Oligo dT Primer (50 µM) | 100 µl |
| Random 6 mers (100 µM) | 400 µl |
| RNase Free dH2O | 1 ml |
| EASY Dilution (for Real Time PCR) | 1 ml |

*1 : dNTP Mixture および Mg²⁺ を含む。

*2 : RNase Inhibitor を含む。

PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)

製品コード RR036A (10 µl 反応系、200回用)

| | |
|---|--------|
| 5×PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) *1 | 400 µl |
| RNase Free dH2O | 1 ml×2 |
| EASY Dilution (for Real Time PCR) | 1 ml |

*1 : PrimeScript RTase, RNase Inhibitor, Oligo dT Primer, Random 6 mers, dNTP Mixture および反応バッファー (Mg²⁺含有) を含む。

ゲノムDNA除去反応をプラスした2ステップリアルタイムRT-PCR用逆転写試薬 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)

total RNA中のゲノムDNAの残存が問題となる
リアルタイム実験系に最適!

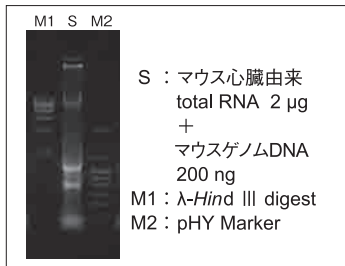
| 製品コード | 容量 | 価格(税別) |
|--------|------|----------|
| RR047A | 100回 | ¥38,000 |
| RR047B | 400回 | ¥130,000 |

- 逆転写反応前に鑄型RNAを添付のgDNA Eraserで処理するだけ! 残存するゲノムDNAを効率よく除去
- ゲノムDNAの除去はわずか**42°C、2分**の処理でOK! 逆転写反応はもちろん**15分**!

ゲノムDNA処理能力の検証

【方法】

ゲノムDNAが多量に混在しているtotal RNA(写真)を鑄型として、本製品とA社製同タイプキットを用いて逆転写反応を行い、さらにリアルタイムPCRを行って結果を比較した。

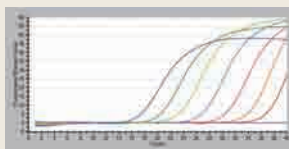


【結果】

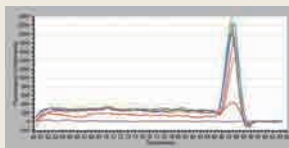
ゲノムDNAが多量に混在しているtotal RNAを鑄型とした場合でも、PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraserに含まれるgDNA Eraserで処理することで、ゲノムDNAが完全に除去されました。

RR047A

増幅曲線

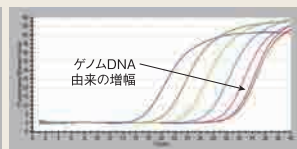


融解曲線



A社キット

増幅曲線



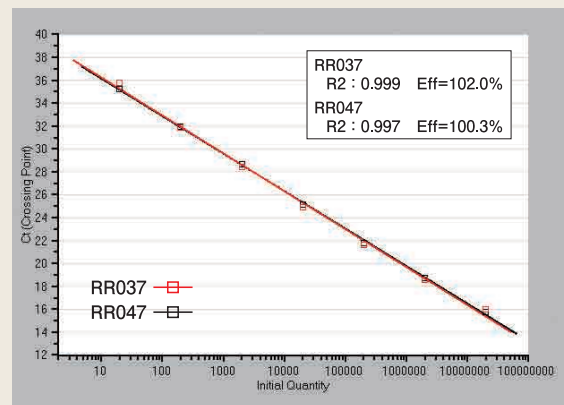
融解曲線



- ・鑄型 : マウス心臓由来 total RNA (0, 2 pg, 20 pg, 200 pg, 2 ng, 20 ng, 200 ng, 2 µg) + マウスゲノムDNA 200 ng
- ・逆転写反応 : 本製品(製品コード RR047A)およびA社製同タイプキット。各推奨条件で使用
- ・リアルタイムPCR : SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)(製品コード RR041A)
- ・リアルタイムPCRの鑄型 : 逆転写反応液各 2 µl
- ・ターゲット : *Rps18*
- ・プライマー : Perfect Real Timeサポートシステムのプライマー(イントロンサイズ: 102 bp)
- ・装置 : Thermal Cycler Dice® Real Time System

(弊社比較データ)

検量線の比較(RR037とRR047)



- ・鑄型 : RNAiso Plus(製品コード 9108)で調製したマウス脳由来total RNA(2 pg ~ 2 µg)。RR047Aの場合は上記の各RNAにマウスゲノムDNA 200 ngを添加したものを使用
- ・逆転写反応 : RR037AおよびRR047Aそれぞれ推奨条件で使用
- ・リアルタイムPCR : SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)(製品コード RR081A)
- ・リアルタイムPCRの鑄型 : 上記の逆転写反応液 各 2 µl
- ・ターゲット : *Rps18*
- ・プライマー : Perfect Real Timeサポートシステムのプライマー(イントロンサイズ: 102 bp)
- ・装置 : Thermal Cycler Dice® Real Time System

PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)

製品コード RR047A (20 µl 反応系、100回用)

| | |
|---|----------|
| gDNA Eraser | 100 µl |
| 5 × gDNA Eraser Buffer | 200 µl |
| 5 × PrimeScript® Buffer 2 (for Real Time)*1 | 400 µl |
| PrimeScript® RT Enzyme Mix 1*2 | 100 µl |
| RT Primer Mix | 400 µl |
| RNase Free dH ₂ O | 1 ml × 2 |
| EASY Dilution (for Real Time PCR) | 1 ml |

- *1 : dNTP Mixtureを含む。
- *2 : RNase Inhibitorを含む。

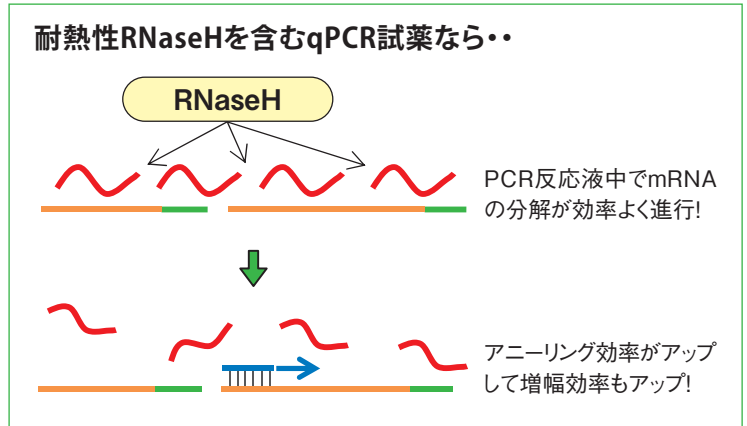
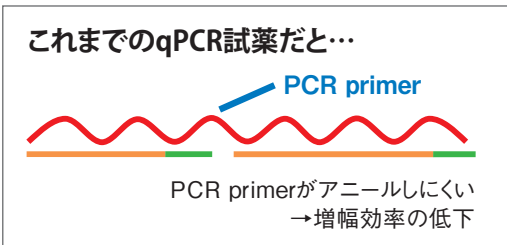
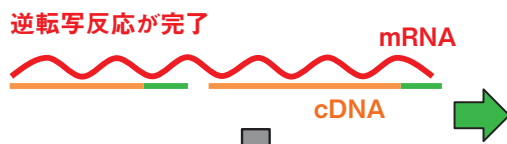
リアルタイムPCR試薬(2ステップリアルタイムRT-PCR用)

TaqMan®プローブ検出に最適なリアルタイムPCR用試薬 **Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)**

| 製品コード | 容量 | 価格(税別) |
|--------|------|---------|
| RR390A | 200回 | ¥41,000 |
| RR390B | 400回 | ¥79,000 |

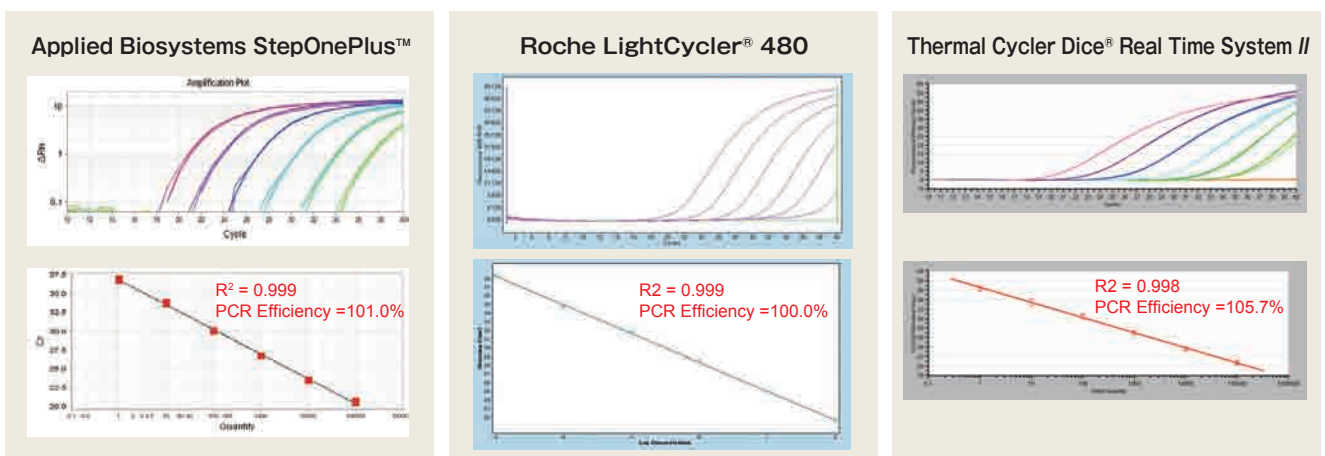
- 高い精度と幅広いダイナミックレンジ
 - 高速リアルタイムPCRにも対応
- PrimeScript® RTキットと組み合わせて使用することで、発現解析の所要時間を短縮できます。

2×プレミックス試薬中に耐熱性RNaseHを添加(特許出願中)



★ 逆転写反応後のRNaseH処理操作はもう不要です。

各種リアルタイムPCR装置で安定した反応



鑄 型：マウス肝臓由来cDNA (total RNA 1 pg~100 ng相当)
ターゲット：Ywhae (TaqMan Gene Expression Assays 使用)

(弊社取得データ)

Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)

製品コード RR390A (50 µl 反応系、200回用)

Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (2 × conc.) *1 1 ml × 5
ROX Reference Dye (50 × conc.) *2 200 µl
ROX Reference Dye II (50 × conc.) *2 200 µl

*1 : TaKaRa Ex Taq HS, dNTP Mixture, Mg²⁺, Tli RNaseHを含む。
*2 : Life Technologies社製リアルタイムPCR装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用する。

1ステップリアルタイムRT-PCR用試薬

TaqMan®プローブ検出に最適な1ステップリアルタイムRT-PCR用試薬

One Step PrimeScript® RT-PCR Kit(Perfect Real Time)

| 製品コード | 容量 | 価格(税別) |
|--------|------|----------|
| RR064A | 100回 | ¥42,000 |
| RR064B | 500回 | ¥165,000 |

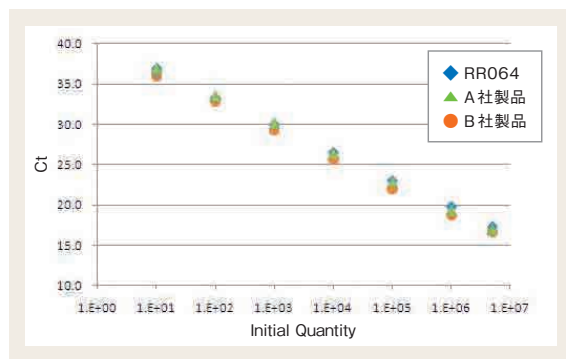
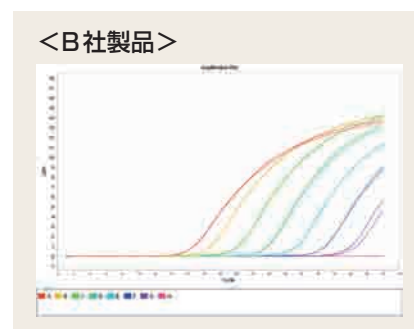
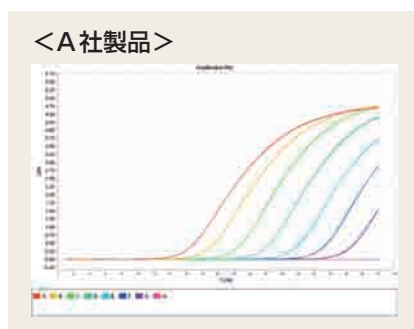
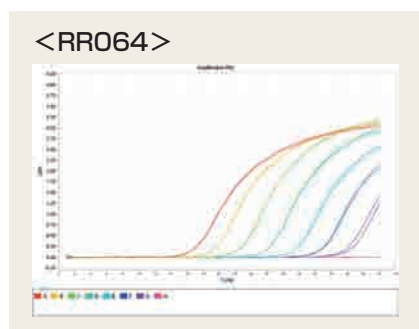
- 1ステップで操作が簡単

サンプル数が多い場合やコンタミネーションを防ぎたい遺伝子検査などに特に最適

- 低発現mRNAの高感度検出に威力を発揮

2ステップRT-PCRに比べて、1ステップRT-PCRでは使用できるtotal RNA量が多く、鑄型のロスも少ないため、低発現mRNAの解析を効率よく行うことができます。特定遺伝子を高感度に検出するために有利です。

他社製品より短時間で解析完了



鑄 型：マウス肝臓由来 total RNA 1 pg~500 ng
ターゲット：Actb (TaqMan Gene Expression Assays 使用)
機 器：ABI 7500 Fast Real-Time PCR System

| | RR064 | A社製品 | B社製品 |
|---------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| RT | 42°C 5分 | 48°C 15分 | 50°C 10分 |
| Preheat | 95°C 10秒 (Denature) | 95°C 10分 (Activation) | 95°C 5分 (Activation) |
| qPCR | 95°C 3秒 60°C 25秒 40 cycles | 95°C 15秒 60°C 60秒 40 cycles | 95°C 10秒 60°C 30秒 40 cycles |
| 解析時間 | 41分 | 114分 | 60分 |

(弊社取得データ)

各種装置で反応性を確認済み

RR390 および RR064 は、以下の各種リアルタイムPCR装置で良好に反応できることを確認しています。

- ABI PRISM® 7000/7700 (Life Technologies 社)
- Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System および StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies 社)
- LightCycler® 480 (Roche Diagnostics 社)
- CFX96/MyiQ2 (Bio-Rad Laboratories 社)
- Thermal Cycler Dice® Real Time System II
- Smart Cycler® System / Smart Cycler® II System

One Step PrimeScript® RT-PCR Kit (Perfect Real Time)

製品コード RR064A (50 µl 反応系、100回用)

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| 2 × One Step RT-PCR Buffer III *1 | 840 µl × 3 |
| TaKaRa Ex Taq® HS (5 U/µl) | 100 µl |
| PrimeScript® RT enzyme Mix II | 100 µl |
| RNase Free dH ₂ O | 1.25 ml × 2 |
| ROX Reference Dye (50 × conc.) *2 | 100 µl |
| ROX Reference Dye II (50 × conc.) *2 | 100 µl |

*1 : dNTP Mixture、Mg²⁺を含む

*2 : Life Technologies 社製リアルタイムPCR装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用する。

リアルタイムPCR装置

96ウェルプレート対応リアルタイムPCR装置

スタンダードモデル

Thermal Cycler Dice® Real Time System //

| 製品コード | 価格(税別) |
|-------|------------|
| TP900 | ¥3,750,000 |

Multiplate RQ搭載モデル

Thermal Cycler Dice® Real Time System // MRQ

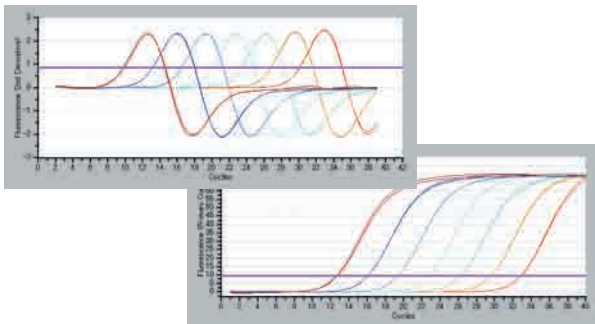
| 製品コード | 価格(税別) |
|-------|------------|
| TP960 | ¥3,900,000 |

- 高い定量性、高い再現性を実現
- 本体制御用のコンピューターは日本語 OS を搭載
- 便利な2種類のソフトウェアを標準装備
 - ・ MIQE ガイドラインに準拠した新時代のソフトウェア (Software Ver.4)
 - ・ 直感的に操作できる食品環境検査用ソフトウェア (日本語表示)
- 多様なニーズに応える様々な検出方法や解析手法に対応



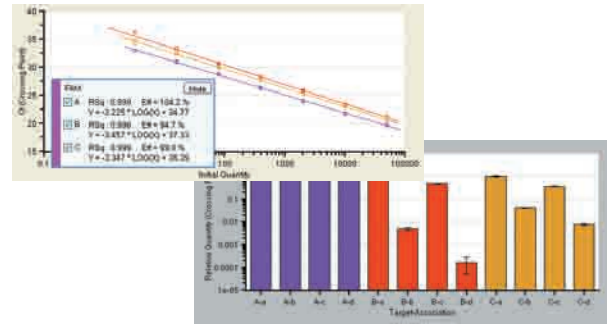
解析結果画面の例

2nd Derivative Maximum法



Crossing Point法

検量線



相対定量結果

★ 相対定量解析ソフトウェア「Multiplate RQ」とは？

相対定量解析ソフトウェア「Multiplate RQ」は、複数プレートのデータをまとめて相対定量解析するためのソフトウェアです。サンプル情報の設定に従って自動的に解析を行い、結果をビジュアルに表示します。複数リファレンスによる解析や検量線法および $\Delta\Delta Ct$ 法による解析など、さまざまな解析手法に対応しています。

PCR Notice: Purchase of this instrument conveys a limited non-transferable immunity from suit for the purchaser's own internal research and development and applied fields other than human *in vitro* diagnostics only under U.S. Patent No. 5,475,610 and non-U.S. counterpart claims, as applicable.

Hot Start PCR: Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

その他のライセンス(最新のライセンス情報)に関しては弊社ウェブサイトにてご確認ください。

TaqManはRoche Molecular Systems Inc.の登録商標です。その他、本パンフレットに記載されている商品名等は、特に記載はなくても各社の商標、または登録商標です。

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。

・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

・本パンフレットの内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することをご遠慮ください。

・本パンフレット記載の価格は2011年11月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

タカラバイオ株式会社

東日本販売課 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
西日本販売課 TEL 077-543-7297 FAX 077-543-7293

TaKaRa テクニカルサポートライン

製品の技術的なご質問に専門の係がお応えします。
TEL 077-543-6116 FAX 077-543-1977

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

取扱店