

製品コード RR092S
RR092A

研究用

TaKaRa

**PrimeScript™ FAST RT reagent Kit
with gDNA Eraser**

説明書

PrimeScript FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser は、ゲノム DNA 除去反応をプラスしたリアルタイム RT-PCR 専用の逆転写キットです。鋳型 RNA に残存するゲノム DNA を強力な DNA 分解活性を有する gDNA Eraser により 42℃ 2 分の処理で除去した後、DNA 分解活性を完全に抑制する成分を含む逆転写反応試薬を添加し、10 分間逆転写反応を行います。ゲノム除去試薬と逆転写反応試薬はあらかじめブレミックス化してあるため、RNA サンプルに順次試薬を加える簡便な操作でゲノム除去から cDNA 合成までの反応をロスなく進めることができます。

シングルエキソンの遺伝子や大きなイントロンがない遺伝子など適切なプライマーが設計できない、あるいは偽遺伝子の存在、非特異的増幅等によりゲノム DNA からの増幅が避けられない場合など、ゲノムの残存が問題となるリアルタイム RT-PCR による解析に最適です。

本製品を用いて得られた cDNA は、インターカレーター法、プローブ検出法のリアルタイム PCR アッセイのどちらにも利用できます。目的に応じて TB Green® *Premix Ex Taq*™ II Fast qPCR (製品コード RR830S/A/B)、TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)、TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)、Probe qPCR Mix (製品コード RR391A/B)、Probe qPCR Mix, with UNG (製品コード RR392A/B) などの定量 PCR 試薬と組み合わせてご使用ください。

I. 内容 [40 回 (RR092S) / 100 回 (RR092A)、20 µl 反応系]

	製品コード RR092S	RR092A
8X gDNA Eraser Premix*1	80 µl	200 µl
5X RT Premix*2	160 µl	400 µl
RNase Free H ₂ O	1 ml	1 ml × 2
EASY Dilution II (for Real Time PCR)*3,4	1 ml	1 ml

* 1 : 8X gDNA Eraser Premix 成分がその後の逆転写反応に必要なため、ゲノム DNA 除去反応は必ず行ってください。RNase inhibitor を含みます。

* 2 : dNTP mixture、Oligo dT Primer、Random 6 mers を含みます。

* 3 : total RNA や cDNA を段階希釈するための希釈溶液として使用します。水や TE で希釈すると正確な希釈ができない場合がありますが、この EASY Dilution II (for Real Time PCR) を用いると低濃度までの正確な希釈ができます。なお、このバッファーが逆転写や PCR の反応性に影響をおよぼすことはありません。希釈した鋳型溶液をそのまま逆転写反応や PCR 反応の鋳型として使用できます。

* 4 : 単品でも購入できます (EASY Dilution II (for Real Time PCR) (製品コード 9451))。

本製品以外に必要な試薬、器具、機器 (主なもの)

- ・サーマルサイ클ラー
(または 37℃、42℃恒温槽、85℃ヒートブロック)
- ・0.2 ml および 1.5 ml マイクロチューブ (逆転写反応用)
- ・マイクロピペットおよびチップ (オートクレーブ処理したもの)

II. 保存 - 20℃

III. 特長

1. わずか 15 分でゲノム DNA の除去から cDNA 合成までの反応を実現します。
2. プレミックス化された試薬を順次添加する簡便な操作のみで反応が可能です。
3. シングルチューブ反応により鋳型 RNA からロスなく cDNA 合成ができます。
4. 逆転写用のプライマーとして Random 6 mers と Oligo dT Primer が 5X RT Premix にあらかじめ含まれており、RNA の全領域を均一に合成できます。
5. 添付されている EASY Dilution II (for Real Time PCR) は、total RNA や逆転写後の cDNA を低濃度まで正確に希釈することができ、幅広いレンジでリアルタイム PCR 検量線の作成が行えます。

IV. 操作上の注意

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 本製品を用いて調製した cDNA 溶液を鋳型として TB Green アッセイを行う場合は、以下の TB Green Premix シリーズの使用を推奨します。本製品と組み合わせて使用することにより、信頼性の高い結果を得ることができます。
 - TB Green *Premix Ex Taq* II Fast qPCR (製品コード RR830S/A/B)
 - TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
 - TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)

※ TB Green Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/B) との組み合わせは、反応不良となる場合がありますので推奨しません。
2. 8X gDNA Eraser Premix および 5X RT Premix は、使用前に転倒混和をした後、軽く遠心してから使用してください。
3. 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

V. 操作：逆転写反応

1. ゲノム DNA 除去反応

下記に示すゲノム DNA 除去反応液を氷上で調製する。

RNA サンプル以外のコンポーネントを必要本数 + α 分調製し、マイクロチューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
8X gDNA Eraser Premix	2 μ l
RNA サンプル*1	
RNase Free H ₂ O	
Total	16 μ l

↓

42°C 2 分 (もしくは室温 5 分*2)

4°C

* 1 : 次ステップの 20 μ l 逆転写反応系で逆転写できるのは、TB Green Assay (インターカレーター法) の場合はおよそ 1 μ g までの total RNA、Probe Assay の場合はおよそ 2 μ g までの total RNA です。逆転写反応は、必要に応じてスケールアップすることも可能です。

* 2 : 室温反応の場合、30 分程度放置しても問題ありません。

2. 逆転写反応

氷上で 1. の反応液に 4 μ l ずつ 5X RT Premix を添加する。

直ちに反応液を軽く攪拌して均一にした後、逆転写反応を行う。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
1. の反応液	16 μ l
5X RT Premix	4 μ l
Total	20 μ l

↓

37°C 10 分

85°C 5 秒

4°C *3

* 3 : cDNA 合成産物を長期保存する時は、- 20°C 以下で保存してください。

(注) 逆転写反応液をリアルタイム PCR に持ち込む時には、PCR 反応液容量の 10% 以下にしてください。

VI. 備考：リアルタイム PCR

本製品で逆転写反応を行った後、TB Green *Premix Ex Taq II* Fast qPCR (製品コード RR830S/A/B) を用いてリアルタイム PCR を行う場合のプロトコル例を示します。

※ 各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
TB Green <i>Premix Ex Taq II</i> Fast qPCR (2X)	12.5 μ l	1×
PCR Forward Primer (10 μ M)	1.0 μ l	0.4 μ M* ¹
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1.0 μ l	0.4 μ M* ¹
cDNA template (逆転写反応液)* ²	≤ 2.5 μ l	
滅菌精製水	x μ l	
Total	25.0 μ l	

* 1：最終プライマー濃度は 0.4 μ M で良い結果が得られる場合が多いですが、反応性に問題があるときは 0.2 ~ 1.0 μ M の範囲で最適な濃度をご検討ください。

* 2：cDNA template (逆転写反応液) の添加量は、PCR 反応液容量の 10%以下にしてください。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコルで行うことを推奨します。まずはこのプロトコルを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。T_m 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 step PCR を行います。

シャトル PCR 標準プロトコル

Pattern	Hold	2 Step PCR		Dissociation		
Segment	1	1	2	1	2	3
Cycle	1	40		1		
Temperature (deg)	95.0	95.0	60.0	95.0	60.0	95.0
Hold Time (mm:ss)	00:30	00:05	00:10	00:15	00:30	00:15
Data Collection	☐	☐	☒	☐	☐	☒

Hold (初期変性)

Cycle : 1

95°C 30 秒

2 Step PCR

Cycles : 40

95°C 5 秒

60°C 10 秒

Dissociation

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。 解析方法の詳細は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

VII. 参考文献

- 1) 吉崎美和、向井博之 実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」
第3章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ (2005) p120-126
- 2) 吉崎美和、向井博之 実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイムPCR実験ガイド」
[3] 1) リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 (2008) p39-43

VIII. 関連製品

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B)
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II Fast qPCR (製品コード RR830S/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A/B)
TB Green® *Premix DimerEraser*™ (Perfect Real Time) (製品コード RR091A/B)
Probe qPCR Mix (製品コード RR391A/B)
Probe qPCR Mix, with UNG (製品コード RR392A/B)
EASY Dilution II (for Real Time PCR) (製品コード 9451)
Thermal Cycler Dice® Real Time System IV (製品コード TP1000/TP1010/TP1030)
Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)

[Perfect Real Time サポートシステム <https://catalog.takara-bio.co.jp>]

- Perfect Real Time サポートシステム for インターカレーター
ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq
登録遺伝子または Ensembl Plants 登録遺伝子に対してリアルタイム RT-PCR 用プ
ライマーが設計済みです (ご注文によりカスタム合成してお届けします)。本製品
および TB Green Fast qPCR Mix、TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) または
TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) と組み合わせて、インターカレーター法
によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。
詳細は弊社ウェブサイトをご参照ください。
- Perfect Real Time サポートシステム for プローブ
ヒト、マウス、ラットの RefSeq 登録遺伝子に対してリアルタイム RT-PCR 用
プライマーが設計済みです (ご注文によりカスタム合成してお届けします)。本
製品および Probe qPCR Mix または Probe qPCR Mix, with UNG と組み合わせて、
プローブ法によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。
詳細は弊社ウェブサイトをご参照ください。

IX. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断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。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeScript、*Premix Ex Taq*、DimerEraser、CronoSTAR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社