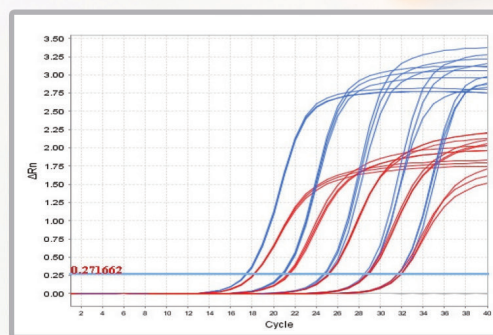


RT-qPCR総合的ソリューション —製品ガイド



最も現実的な定量データをご提供致します

FastKing RT Kit (With gDNase)

— 各種類の配列を効率よく読み通す、少量テンプレートを正確に認識できる

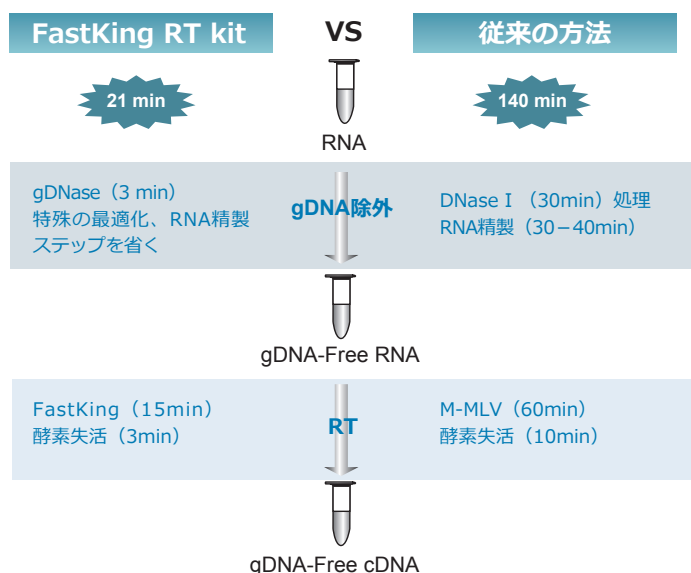
- 新規逆転写酵素が疎水性 motif を修飾したため、RNA テンプレートに対する親和性と耐熱性を大幅に向上させて、逆転写効率が 95%を超える。
- 感度がさらに向上され、1 ng までのテンプレートからも正確に認識できる。
- 高性能: 複雑なテンプレートの読み込みが可能、コンタミの干渉を避けられる。
- 一貫の強みが維持されて、21 分以内にゲノム DNA のない cDNA 合成が可能である。

カタログ番号	内容量
4992223	20 μ l $\times$ 25 rxn
4992224	20 μ l $\times$ 100 rxn
4992250	20 μ l $\times$ 1000 rxn

FastKing RT Kitは、効率的かつ迅速にゲノムDNAを完全に除外できる逆転写システムである。本キットに含まれているFastKing RT Enzymeは、42℃、15分間で相補鎖DNAを合成し、RNAテンプレートに対する高い親和性の特徴を持ち、さらに高いGC含有率且つ複雑な2次構造を有するテンプレートの読み込みが可能である。また、本キットにおいて、ゲノムDNAを除外できるgDNaseが含まれており、42℃、3分間でgDNAを完全に除去でき、トータルRNAをgDNAの干渉から保護し、qPCR定量結果の正確性を保証する。

21分間の「1チューブ式」革命

わずか21min、ゲノムDNA除外と逆転写を一チューブ内に完了可能であり、単独なDNase I処理ステップは不要であり、従来の手順に比べて大幅に簡便化して、時間を大幅に節約できる。



ゲノムDNA除外の必要性

リアルタイムPCR定量の正確性はいつも注目され、ゲノムDNAの汚染は定量結果の非正確性や非特異的な増幅の重要なファクターである。

2008年、Nature Protocolsに発表されたリアルタイムPCRを研究する論文には、リアルタイムPCR定量する時、あらかじめRNAサンプル中に混入したゲノムDNAを除外すべきであることが明確に説明した。

解析結果の正確性を保証するため、リアルタイムPCRを行う前に、ゲノムDNAを除外すべきである。

PROTOCOL

Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method

Thomas D Schmittgen¹ & Kenneth J Livak²

¹Division of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Ohio State University, Parks Hall, 500 West 12th Avenue, Columbus, Ohio, OH 43210 USA; ²Applied Biosystems, 400 Lincoln Center Drive, Foster City, California, CA 94044 USA. Correspondence should be addressed to T.D.S. (tschmittgen.2@osu.edu).

Published online 5 June 2008; doi:10.1038/nprot.2008.73

PROCEDURE

1| Isolate RNA as described in Box 1.

2| Expose the RNA with DNase I as described in Box 2.

3| Synthesize cDNA as described in Box 3.

4| Perform PCR as described in Box 4.

▲ CRITICAL STEP As stated in the INTRODUCTION, use of the comparative C_T method relies upon the target gene and internal control gene having similar efficiencies.

BOX 2 | DNase TREATMENT

1. Briefly treat the RNA with RNase-free DNase to remove any residual genomic DNA that may be present in the RNA. Prepare the DNase master mix accounting for 1–2 additional reactions.

Ingredient	Per reaction (μ l)	For x reactions (μ l)
RNase-free DNase I (10 U μ l ⁻¹)	1.8	x $\times$ 1.8
RNA guard	0.3	x $\times$ 0.3
25 mM MgCl ₂	2.4	x $\times$ 2.4
Total	4.5	x $\times$ 4.5

2. Add 1.2 μ l of RNA, 4.5 μ l of master mix and water to 30 μ l into 200- μ l PCR strip tubes.

3. Mix by gentle flicking, and briefly spin on a minicentrifuge that can handle strip tubes. Using a PCR Thermal Cycler, incubate at 37 °C for 10 min and then 90 °C for 5 min to inactivate the DNase.

2009年、リアルタイムPCR定量結果を規範するために、MIQEはリアルタイム定量情報を掲載するような提言を行った。ゲノムDNA除外の重要性を強調し、ゲノムDNA除外したかどうかを報告することが不可欠であると提出した。

gDNaseの伝統を破る

—42℃で3分間インキュベートするだけでgDNAを完全に除去できる

新規、効率的な画期的gNase設計により、わずか三分間でgNaseを除外できる。直接に逆転写反応を行い、後継の複雑なRNA純化ステップは不要である。

ゲノムDNA残基の試料を用いると解析結果が不正確になる。本製品はゲノムDNA残基の妨げを避けられ、正確に遺伝子を検出できる。

Quant家族の優れた品質を相続

高い転写効率

—95%を超える逆転写効率

一般の逆転写酵素の逆転写効率は40–60%であり、cDNA収量を上げるために、通常はRNAテンプレートの添加量を増やすことにする。King逆転写酵素は特有なRNAテンプレートの親和性を持って、逆転写効率は95%を超える。そこで、少量のテンプレートからでも、下流アプリケーションに満足でき、RNAの節約できるし、cDNAの純度と収量を向上できる。

高性能

—高GC含有率、また複雑な2次構造を有するテンプレートの読み込みが可能である

一本鎖RNAは水素結合の駆動力で、幅広い複雑な二次構造を形成する。一般的な逆転写酵素は、複雑な二次構造に対して逆転写反応が終了される可能性があり、cDNA合成を成功させられない可能性がある。

The MIQE Guidelines:

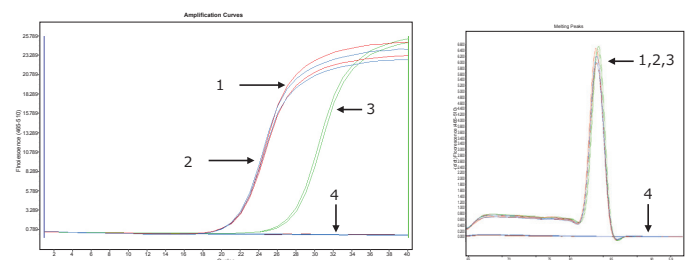
Minimum Information for Publication of Real-Time PCR Experiments

Stephen A. Bustin, Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, et al. Clinical Chemistry 55:4 (2009)

Table 1. MIQE checklist for authors, reviewers, and editors.^a

Item to check	Importance	Item to check	Importance
Nucleic acid extraction		Exact chemical composition of the buffer	D
Procedure and/or instrumentation	E	Additives (SYBR Green I, DMSO, and so forth)	E
Name of kit and details of any modifications	E	Manufacturer of plates/tubes and catalog number	D
Source of additional reagents used	D	Complete thermocycling parameters	E
Details of DNase or RNase treatment	E	Reaction setup (manual/robotic)	D
Contamination assessment (DNA or RNA)	E	Manufacturer of qPCR instrument	E
Nucleic acid quantification	E	qPCR validation	
Instrument and method	E	Evidence of optimization (from gradients)	D
Purity (A ₂₆₀ /A ₂₃₀)	D	Specificity (gel, sequence, melt, or digest)	E
Yield	D	For SYBR Green I, C _q of the NTC	E

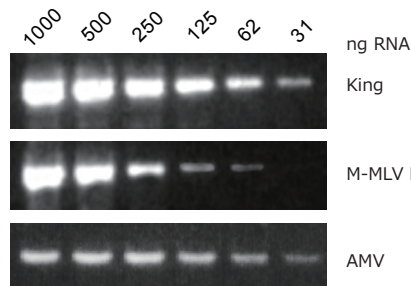
^a All essential information (E) must be submitted with the manuscript. Desirable information (D) should be submitted if available. If primers are from RTPrimerDB, information on qPCR target, oligonucleotides, protocols, and validation is available from that source.



1: ゲノムDNA除外しないで逆転写を行う; 2: ゲノムDNA除外も逆転写もしない; 3: ゲノムDNA除外してから逆転写を行う; 4: ゲノムDNA除外してから逆転写を行わない

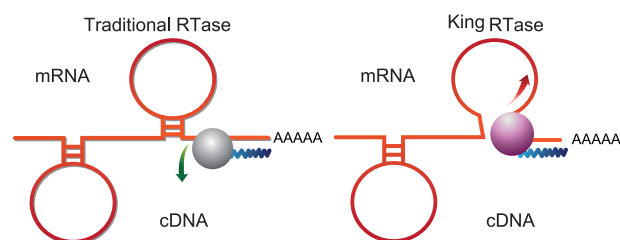
本キットを用いて、1 µg HeLa細胞RNA (ゲノムDNA残基あり) をテンプレートとし、qPCRよりTNF-alpha遺伝子 (エクソン上のプライマー設計、cDNAやDNAをテンプレートとして増幅) を検出した。

結果として、2グループ: ゲノムDNAの残基状況を反映できる。3グループ: TNFalphaの発現レベルを正確に反映できる。1グループ: ゲノムDNA残留のせいで定量結果がエラーが発生した。4グループ: 本製品は優れたゲノムDNA除外能力を有し、DNA残基が完全に除外されたことを示した。



各種由来の逆転写酵素の活性測定: King Reverse Transcriptaseの逆転写効率はRnaseH活性無しM-MLVとAMVシリーズよりも優れている。

複雑なテンプレートが読める秘密



伝統な逆転写酵素はテンプレート中で複雑な二次構造を開けられず、逆転写酵素が抜け落ちて、反応が終了される。

King逆転写酵素は複雑な二次構造を開ける能力を有し、取りやすい逆転写反応に有効である

FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix

— 18分間、1ステップでゲノムDNA除外と逆転写が終わる

- 鋳型 RNA を添加するだけで、1 ステップで gDNA の除外と cDNA の合成を同時に行う。
- 特殊な熱感受性 DNase を使うことで、速めに効果を得られ、効率がよく、時間が短く、cDNA を分解させない。
- 修飾された疎水性モチーフを用いて、逆転写効率が 95% を超え、低濃度のテンプレートに最適である。

カタログ番号

内容量

4992226	20 μ l x 25 rxn
4992227	20 μ l x 100 rxn
4992251	20 μ l x 1000 rxn

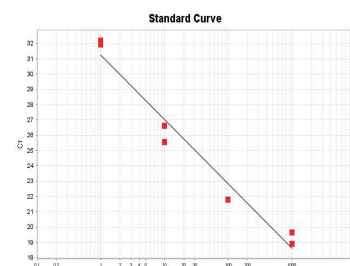
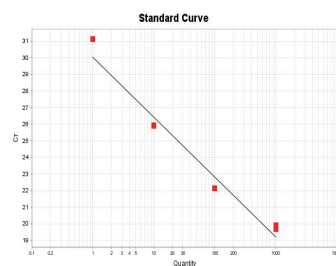
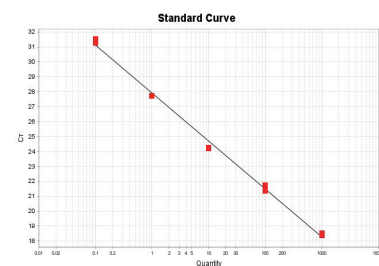
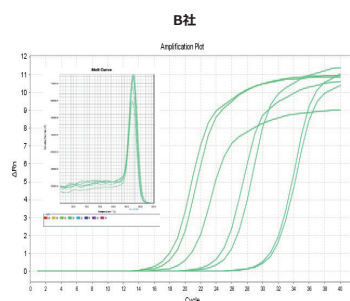
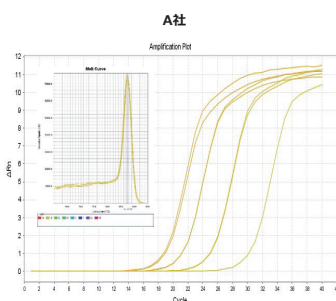
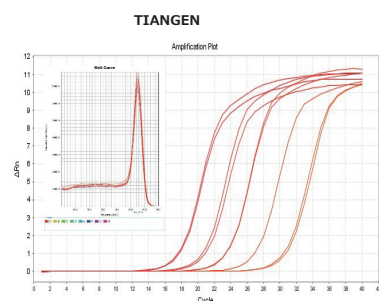
18分間、1ステップで
ゲノムDNA除外と逆
転写が終わる

テンプレートとミックス
を混ぜ合わせて

ゲノムDNA除外+逆転写
42°C 15 分間

酵素失活

95°C 3分間
逆転写完了



実験例 1 TIANGEN の製品及び外国 A 社と国内 B 社同等品を用いて、それぞれ 1 ステップで cDNA を合成して、TIANGEN の Real-Time PCR 試薬によりマウス RN5 遺伝子を検出し、増幅曲線、融解曲線、および基準曲線を示している。結果として、TIANGEN の製品がより多くの cDNA を合成していることを示している。増幅には高い特異性と優れた勾配が観察され、低濃度のテンプレート検出感他社競合試薬よりも優れている。

	ゲノムDNA添加量				
	500 ng	200 ng	100 ng	50 ng	10 ng
本製品	ND	ND	ND	ND	ND
A社	32.78	35.90	ND	ND	ND
B社	29.80	31.38	33.33	33.36	37.03
NRT	23.82	25.30	26.60	28.09	35.04

実験例 2 TIANGEN の製品及び外国 A 社と国内 B 社同等品を用いて、それぞれ 1 ステップで cDNA を合成して、TIANGEN の Real-Time PCR 試薬によりヒト HsG 遺伝子を検出し、人為的に異なる濃度のゲノム DNA を添加し、異なる試薬のゲノム DNA に対する除去能力を検出した。Ct 結果は、TIANGEN の本製品が優れたゲノム DNA 除外能力を有し、500 ng までのゲノム DNA 残基が完全に除外され、結果に影響を及ぼさないことを示した。ND：未検出。NRT：逆転写をしらず、直接混合物を用いて定量的検出を行う。

SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)

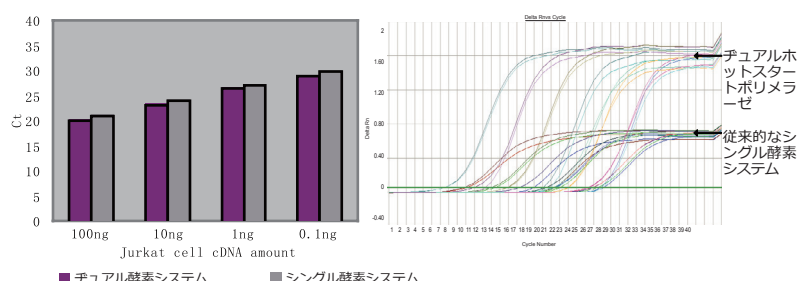
— 最も現実的な定量データをご提供致します

- **2つの優位性**：デュアルホットスタートポリメラーゼを使用し、安定性が高く、より正確な結果を得る。
- **高い特異性**：反応システムを再度アップデートし、増幅の特異性を高めている。
- **優れた再現性**：結果の安定性が高く、高い再現性がある。
- **高感度**：低濃度のテンプレートでも定量検出可能。

カタログ番号	内容量
4992214	20 μ l $\times$ 125 rxn
4992215	20 μ l $\times$ 500 rxn
4992248	20 μ l $\times$ 5000 rxn

デュアル酵素システムを使用し、安定化かつ効率的な増幅を保証

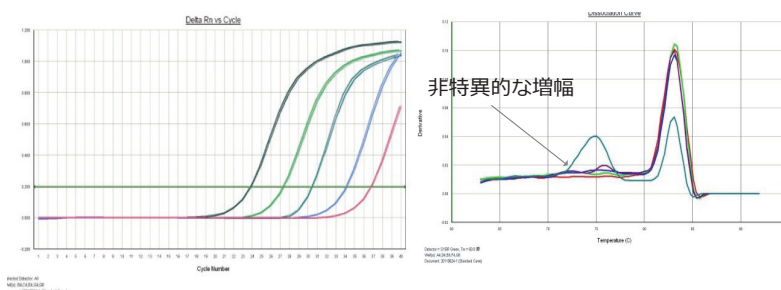
cDNAテンプレートの並行増幅実験において、デュアルホットスタートポリメラーゼにより異なる濃度のテンプレートを検出する時、従来のシングル酵素増幅系と比べて、デュアル酵素システムは増幅効率が高く、検出される傾向値が高い。



特殊な最適バッファースystemにより超高特異性を作る

Bufferには特自のK⁺及びNH₄⁺バランスシステムとH-Bond因子が含まれており、反応システムを再度アップデートし、増幅の特異性を高めている。

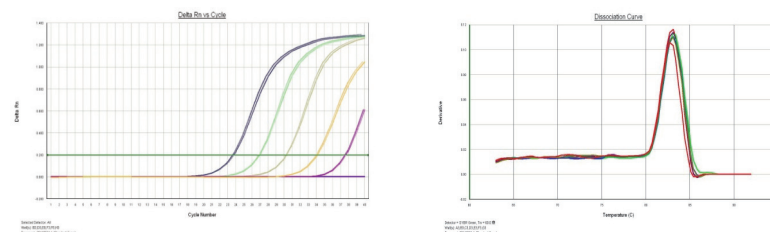
H-Bond因子が含まれたバッファと普通の定量バッファーとの比較:
A社のバッファー液システム:



幅広い汎用性

ABI (PRISM7000/7300/7700/7900HT/StepOn/7500/7500Fast), Stratagene (Mx3000P/Mx3005p/Mx4000), Roche、Bio-Rad及びEppendorf等あらゆる種類の定量PCR機器に適應できる。

TIANGEN社のH-Bond因子バッファー液システム



同じテンプレート、プライマーを用いた反応系について、SuperReal PreMix PlusのH-Bond因子バッファースystemは、他社製品の通常のバッファースystemよりも特異的かつ再現性の高い増幅が可能である。

FastFire qPCR PreMix (SYBR Green)

— 最快速のSYBR Green試薬

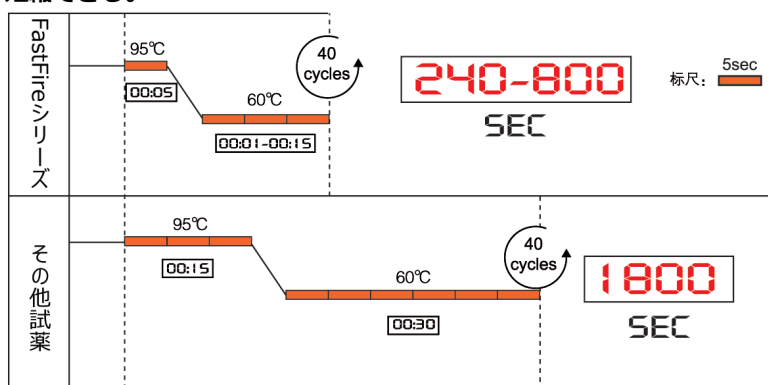
- **最快速**：現在市販の最もスピード速いSYBR Green 試薬の一つである。
- **高い増幅性**：強い蛍光シグナルにより、信頼性と正確性の高い結果を提供する。
- **優れた安定性**：バッファーにはPCR 安定剤とエンハンサーが含まれており、結果の安定性、再現性、正確性、信頼性をより高める。
- **幅広い汎用性**：快速定量 PCR 機器に適用できるし、通常の定量 PCR 機器にも適用できる。

カタログ番号	内容量
4992217	20 μ l $\times$ 125 rxn
4992218	20 μ l $\times$ 500 rxn
4992249	20 μ l $\times$ 5000 rxn

最もスピード速い——実験効率を向上させ、qPCR装置の耐用年数を延ばさせ、省エネルギー可能

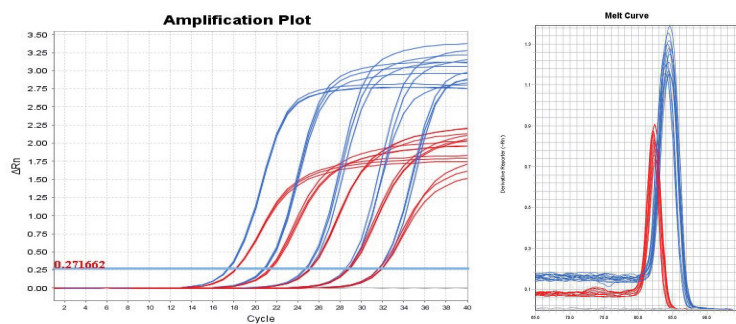
速めに活性化できる抗体修飾のAnti Taqポリメラーゼと独自の高速バッファーシステムにより、現在市販の最もスピード速いSYBR Greenとなり、実験効率を向上できる。

現在、最もスピード速いSYBR Green試薬であり、反応時間を**1000 sec**短縮できる。



高い増幅性——増幅の蛍光シグナルより強い

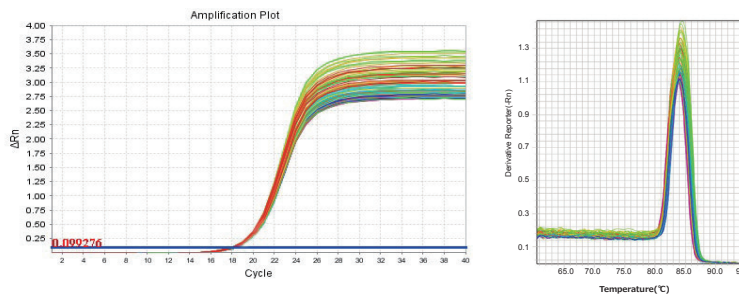
増幅の蛍光シグナルがより強く（増幅能力が高い）、基準により近い増幅曲線を有し、感度が高く、低濃度のテンプレートにおけるターゲット遺伝子を定量的に検出できる。一方、T社製品は、シグナルが弱く、Ct値が低く、不正確な結果を招く可能性がある。



ヒトcDNAテンプレート(濃度100-0.01 ng/ μ l)中の β -アクチン遺伝子を検出した。

優れた安定性——結果の再現性より強い

96 Well Plate 再現性試験の結果、本試薬の結果安定性が高く、高い再現性がある。



1 ng/ μ lのヒトcDNAテンプレート中のGAPDH遺伝子を検出した。

SuperReal PreMix (Probe)

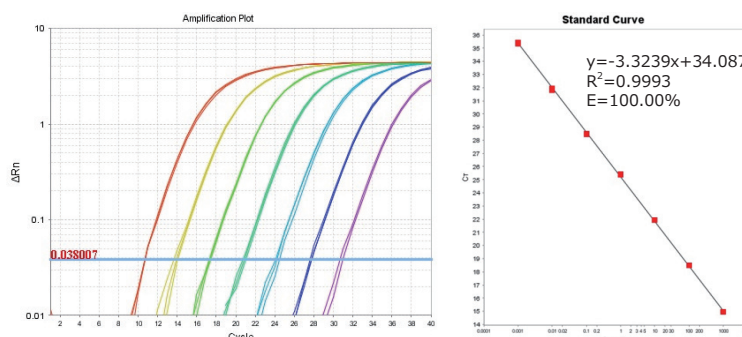
— 高感度な定量結果を提供する

- **2種類の酵素システム**：2種類のポリメラーゼホットスタートシステムにより、安定性、正確性を高める。
- **広いリニアレンジ**：リニア検出の範囲は 10^{-10} までカバーできる。
- **高感度**：ウイルスや微生物など低濃度のテンプレートを簡単に検出する。
- **高い増幅能力**：より強い蛍光シグナル。

カタログ番号	内容量
4992290	20 μ l $\times$ 125 rxn
4992211	20 μ l $\times$ 500 rxn

広いリニアレンジ

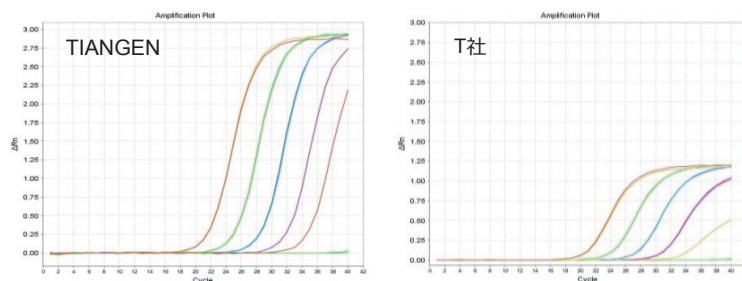
広い線形検出範囲を有し、1 fg/ μ lまでの低いテンプレート濃度の λ DNAに対してでも検出でき、増幅効率が高く、再現性がよく、直線性が優れた。



λ DNAをテンプレートとしてPCR検出を行った。(1 ng/ μ l ~ 1 fg/ μ l)

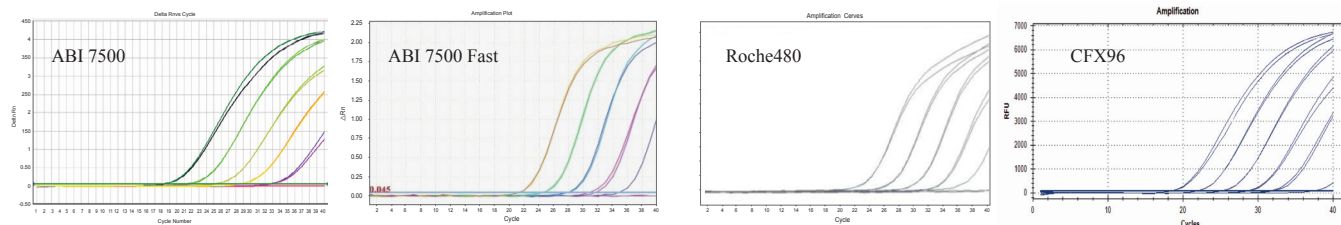
強い増幅能力、増幅曲線より正確、さらなる高感度

増幅の蛍光シグナルがより強く（増幅能力が高い）、基準により近い増幅曲線を有し、感度が高く、低濃度のテンプレート(0.01 ng/ μ l)を定量的に検出できる。一方、T社製品は、シグナルが弱く、感度が低く、低濃度テンプレートを未検できない可能性があり、誤った実験結果に繋がる可能性がある。



本製品とT社製品を用いて、大豆のgDNAをテンプレートとして、Lectin遺伝子を検出した。

幅広い汎用性



ABI、Stratagene、Roche、Bio-Rad、Eppendorfなどあらゆる種類の定量PCR機器に適応することができる。

FastFire qPCR PreMix (Probe)

— 最もスピード速いProbe試薬

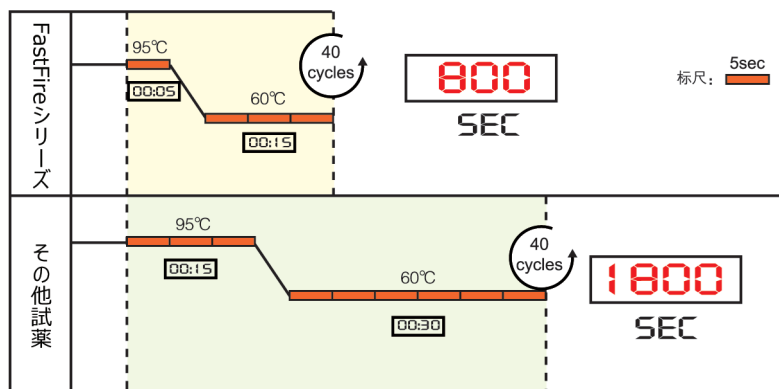
- **最も速い**：現在市販の最もスピード速い Probe 試薬の一つである
- **高感度**：低濃度のテンプレートの定量が可能
- **優れた安定性**：バッファーには PCR 安定剤とエンハンサーが含まれており、結果の安定性、再現性、正確性、信頼性を高める。
- **幅広い汎用性**：快速定量 PCR 機器に適用できるし、通常の定量 PCR 機器にも適用できる。

カタログ番号	内容量
4992220	20 μ l $\times$ 125 rxn
4992221	20 μ l $\times$ 500 rxn

最もスピード速い—実験効率を向上させ、qPCR装置の耐用年数を延ばさせ、省エネルギー可能。

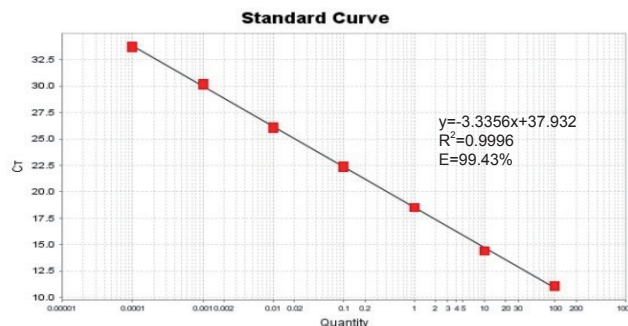
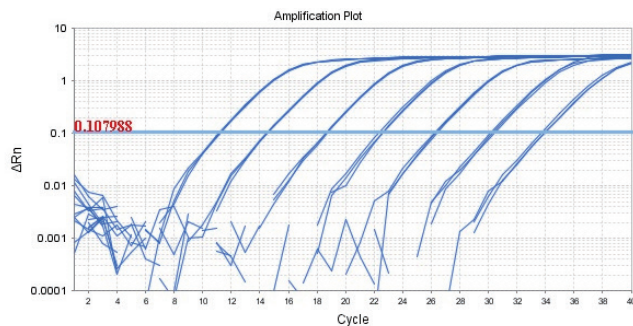
速めに活性化できる抗体修飾のAnti Taqポリメラーゼと独自の高速バッファースystemにより、現在市販の最もスピード速いProbe試薬となる。

現在市販の最もスピード速いProbe試薬、反応時間を**1000 sec**縮める。



より広いリニアレンジ

広い線形検出範囲を有し、1 pg/ μ lまでの低いテンプレート濃度でも検出できる、増幅効率が高く、再現性がよく、直線性が優れた。



1 pg/ μ lから100 ng/ μ lまでのヒトcDNAをテンプレートを検出を行った。