



09-04



# ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit

(Code No. FSQ-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department  
OSAKA JAPAN

A3736K

— 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
[5] 関連プロトコル	5
[6] トラブルシューティング	8
[7] 関連商品	9

---

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。

# [1] はじめに

**ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit** は、リアルタイム PCR 用鑄型 cDNA 作製のために開発された、高効率かつ簡便な逆転写反応キットです。本製品は、弊社高性能逆転写酵素 ReverTra Ace<sup>®</sup> と、リアルタイム PCR のターゲットとなる短鎖 cDNA の合成に最適化された反応組成を採用しており、リアルタイム PCR 用に適した cDNA 鑄型を効率的に調製することができます。また本製品は、簡略化されたキット構成と迅速な反応プロトコルによって、短時間で簡便に cDNA 合成を行うことが可能となっています。

本製品にはリアルタイム PCR 試薬は添付されていません。リアルタイム PCR には、弊社リアルタイム PCR 用試薬 Realtime PCR Master Mix シリーズのご使用をおすすめします([7] 関連製品の項をご参照下さい)。

## ◆本製品の特長◆

### 1. 幅広いターゲットに対する高効率逆転写

**ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit** は、リアルタイム PCR 用の cDNA 合成に最適化された反応バッファと、最適な混合比を持つプライマーミックスを使用しており、様々なターゲットに対して、条件検討を行うことなく効率的に逆転写反応を行うことができます。

### 2. 短時間・簡便なプロトコール

**ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit** は、わずか 15 分の逆転写反応で、幅広いターゲットに対して効率的に逆転写反応を行うことができます。また、リアルタイム PCR において反応阻害の要因となる残存 RNA の除去においても、追加的な RNase H 処理を必要としません(特許出願中)。

### 3. リアルタイム PCR 試薬との適合性向上

**ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit** は、リアルタイム PCR の反応系への影響を最小限に抑える組成を採用しており、最大で 20% 液量の逆転写反応液を PCR に添加した場合でも、高い直線性を示します(弊社 Realtime PCR Master Mix にて確認)。発現量が少ない mRNA の高感度検出にも最適です。

## [2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれており、10 $\mu$ l 反応で 200 回用としてご使用いただけます。全ての試薬は-20 $^{\circ}$ C で保管してください。

試薬名	保存	容量
5x RT Buffer (Reaction Buffer + MgCl <sub>2</sub> + dNTPs)	-20 $^{\circ}$ C	400 $\mu$ l
Enzyme Mix (ReverTra Ace <sup>®</sup> + RNase inhibitor)	-20 $^{\circ}$ C	100 $\mu$ l
Primer Mix (Random Primer + Oligo(dT) Primer)	-20 $^{\circ}$ C	100 $\mu$ l
Nuclease-free Water	-20 $^{\circ}$ C	1000 $\mu$ l x2

### **5x RT Buffer**

反応バッファー、MgCl<sub>2</sub>、dNTPs などを含んだ 5x 濃度の逆転写反応バッファーです。溶解時に白濁することがありますが、品質には影響ありません。ボルテックスミキサー等で激しく攪拌し、完全に溶解させてからご使用ください。

### **Enzyme Mix**

弊社高性能逆転写酵素 ReverTra Ace<sup>®</sup>と RNase inhibitor を混合した酵素液です。

### **Primer Mix**

Random Primer と Oligo(dT) Primer を混合したプライマーミックスです。様々なターゲットに対して効率よく逆転写を行うことができるよう、混合比が最適化されています。

### **Nuclease-free Water**

Nuclease-free グレードの滅菌蒸留水です。ポリメラーゼ活性に影響を及ぼす恐れのあるジエチルピロカーボネート(DEPC)処理を行わずに調製されています。

### [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。

- ・サーマルサイクラーまたはインキュベーター

本製品の推奨する温度(37°C、98°C、および65°C)を保つことができる機器をご用意ください。

- ・Nuclease-free Water

本製品には、200 回分の反応に必要な量が添付されていますが、鋳型 RNA の希釈などを行う際に、必要に応じて別途ご購入ください。DEPC(ジエチルピロカーボネート)不使用タイプの Nuclease-free Water の使用をおすすめします。DEPC 処理水を使用することも可能ですが、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 を完全に除去してから使用してください。また逆転写反応や PCR に使用する Nuclease-free Water は、核酸の混入を防ぐため、他の実験とは別に保存し、共用しないことをおすすめします。

- ・Total RNA

本製品では、Total RNA を直接、鋳型として用いることができます。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。発現量が極端に低いターゲットの検出を行う場合などを除き、通常は Total RNA を鋳型とすることで十分に検出が可能です。

AGPC(Acid Guanidium - Phenol - Chloroform)法などにより精製された Total RNA には、ゲノム DNA が混入しています。検出するターゲットに偽遺伝子が多く存在する場合や、イントロンをまたぐ位置にプライマーを設定できない場合などには、混入したゲノム DNA に由来する偽陽性シグナルが発生する可能性があります。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。

- ・poly(A)<sup>+</sup> RNA (mRNA)

poly(A)<sup>+</sup> RNA は、oligo(dT)とのハイブリダイゼーションを利用して poly(A)<sup>+</sup>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。しかしながら、Total RNA と比較してリボヌクレアーゼ(RNase)による分解を受けやすい、ribosomal RNA を内部参照とした相対定量ができないなどの短所があります。

## [4] 使用方法

### (1)RNA の変性

RNA を 65°C で 5 分間インキュベートし、氷上で急冷します。

- ・この処理を行うことで、高次構造を取りやすい RNA に対する逆転写効率が向上する場合があります。
- ・この処理を行う際は、5x RT Buffer や酵素液は添加しないでください。

### (2)反応液の調製

#### 反応液組成

Nuclease-free Water	to 10 $\mu$ l
5x RT Buffer	2 $\mu$ l
RT Enzyme Mix	0.5 $\mu$ l
Primer Mix	0.5 $\mu$ l
RNA	0.5pg~1 $\mu$ g
Total volume	10 $\mu$ l

- ・本試薬に添付の Primer Mix のほか、遺伝子特異的プライマー(Gene Specific Primer)を用いることもできます。その際は、最終濃度 0.5pmol/ $\mu$ l (10 $\mu$ l 反応あたり 5pmol) を目安として反応系に添加してください。

### (3)逆転写反応

37°C で 15 分間インキュベートし、逆転写反応を行います。

↓

98°C で 5 分間インキュベートし、酵素失活反応を行います。

↓

反応終了後、4°C または-20°C で保存します。リアルタイム PCR 実施の際は、鋳型として反応液に直接または希釈して添加してください。

- ・この温度条件は本キットの組成に最適化された条件となっており、温度条件の変更は、酵素活性以外にも、プライマーのアニーリング効率や、RNA 除去効率、逆転写反応後の酵素失活効率などに大きく影響を与えます。条件の検討を行う際も、必ずこの条件を基本として実施してください。
- ・逆転写反応液のリアルタイム PCR 反応液への添加量は、最大で 20%程度としてください。多量の添加は PCR の反応効率を低下させ、正確な定量が行えないことがあります。
- ・遺伝子特異的プライマーを用いる場合において、特に同一の配列を持つ逆転写プライマーと PCR プライマーを使用する場合は、逆転写時の非特異的アニーリングが PCR における非特異的増幅産物を生じさせる原因となることがあります。その際は逆転写反応温度を高温(42-50°C 程度)にすることによって、改善されることがあります。

## [5] 関連プロトコル

### 1. Total RNA の DNase I 処理

AGPC 法などにより精製された Total RNA にはゲノム DNA が混入しています。ゲノム DNA 由来の偽陽性シグナルが発生する可能性がある場合(p.3 参照)、下記の方法によりゲノム DNA を除去してください。

#### (1)反応液調製と反応

##### 反応液組成(一例)

Nuclease-free Water	to 10 $\mu$ l
Total RNA (<10 $\mu$ g)	X $\mu$ l
10x DNase I Buffer (10mM Tris-Cl, pH7.6, 2.5mM MgCl <sub>2</sub> , 0.5mM CaCl <sub>2</sub> )	1 $\mu$ l
RNase-free DNase I (10U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Total volume	10 $\mu$ l

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。

#### (2)精製 (市販の精製キットを用いることもできます)

反応液に 100 $\mu$ l の Nuclease-free Water、100 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

↓

100 $\mu$ l の 5M 酢酸アンモニウム、200 $\mu$ l のイソプロパノールを添加し、混合した後、-20°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 Nuclease-free Water を加え、溶解します。

## 2. poly(A)<sup>+</sup> RNA 精製法

発現量の少ない遺伝子の検出を行う際は、Total RNA から poly(A)<sup>+</sup> RNA を精製し、それを鋳型として用いることで感度を上げることができます。poly(A)<sup>+</sup> RNA の精製法の一例として、oligo(dT)結合磁性ビーズによる専用精製キット MagExtractor<sup>TM</sup> -mRNA- (code No.: NPK-801F)を用いた方法をご紹介します。

### (1)DNase I 反応液調製と精製前処理

#### 反応液組成(一例)

MagExtractor <sup>TM</sup> -mRNA- 溶出液	to 100 $\mu$ l
Total RNA (<100 $\mu$ g)	X $\mu$ g
10x DNase I Buffer	10 $\mu$ l
RNase-free DNase I (10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Total volume	100 $\mu$ l

上記反応組成液を調製し、氷上で 15 分間反応させます。

↓

反応液に 400 $\mu$ l の溶解液(2-メルカプトエタノール含有)と 800 $\mu$ l の吸着液を添加します。

### (2)反応と精製

磁性ビーズ 250 $\mu$ l を新しい 1.5ml チューブに入れます。

↓

磁性スタンド(Magical Trapper (Code No. MGS-101)など)を使用して固液分離(B/F 分離)を行い、上清を廃棄します。

↓

上記の前処理済み Total RNA 液を添加します。

↓

ボルテックス攪拌(均一になる程度)し、10 分間室温で静置します。

↓

固液分離(B/F 分離)を行い、上清を廃棄します。

↓

1ml の洗浄液を添加します。

↓

ボルテックス攪拌(均一になる程度)します。

↓

(次ページに続く)

(前ページからの続き)



固液分離(B/F 分離)を行い、上清を廃棄します。



1ml の洗浄液を添加します。



ボルテックス攪拌(均一になる程度)します。



固液分離(B/F 分離)を行い、上清を廃棄します。



1ml の洗浄液を添加します。



ボルテックス攪拌(均一になる程度)します。



固液分離(B/F 分離)を行い、上清を廃棄します。



スピンドウンを行い、再度上清を除去します。



適量の溶出液を添加します。



ボルテックス攪拌(均一になる程度)します。



65°C で 2 分間インキュベートします。



ボルテックス攪拌(均一になる程度)します。



スピンドウンします。



固液分離(B/F 分離)を行い、poly(A)<sup>+</sup> RNA を含む上清を回収します。

- ・MagExtractor<sup>TM</sup> -mRNA-の標準プロトコルでは、上記の精製を 2 回繰り返します。2 回繰り返すことにより、1 回精製では除ききれなかった rRNA やゲノム DNA を除去することができます。通常は 1 回精製でも十分ですが、精製度の高い poly(A)<sup>+</sup> RNA を得たい場合は、2 回精製を行ってください。
- ・その他、精製法に関する詳細は MagExtractor<sup>TM</sup> -mRNA-添付の取扱説明書をご参照ください。

## [6] トラブルシューティング

### 1. リアルタイム PCR でシグナルが出ない、あるいは遅れて検出される

原因	対策
RNA の純度が低い	RNA 調製時に残留した不純物によって逆転写反応が阻害されている可能性があります。鋳型 RNA を再精製してください。
RNA が分解している	RNase の混入によって RNA が分解している可能性があります。RNA の再調製を行ってください。また RNA を低濃度で保存した場合、RNase による分解をより受けやすくなるほか、反応容器への吸着によって実質的な RNA 量が減少する場合があります。希釈した RNA は、使用後に凍結保存して再使用することは避け、毎使用時に高濃度保存液から調製することをおすすめします。
RNA の量が少なすぎる、あるいは多すぎる	本製品では、0.5pg から 1 $\mu$ g までの RNA を用いた場合で安定的な効率で逆転写が可能であることを確認していますが、RNA の種類や品質によっては、反応可能な RNA 量は変動する可能性があります。鋳型 RNA の添加量を増減させてください。
反応温度が不適切	反応条件の変更は、プライマーのアニーリング効率、酵素活性、逆転写反応後の酵素失活、鋳型 RNA の除去効率など広範囲に影響します。反応温度は必ず本説明書に記載の条件に従って実施してください。
逆転写反応液の添加量が多すぎる	本製品では、逆転写反応液を PCR 反応液へ最大 20% 添加しても直線性には問題がないことを確認していますが、使用する PCR 試薬の性質によっては、この値は低下する可能性があります。逆転写反応液の添加量を減らしてください。

### 2. リアルタイム PCR で非特異的シグナルが検出される

原因	対策
プライマーの非特異的アニーリングが発生している (遺伝子特異的プライマー使用時)	遺伝子特異的プライマーを使用した逆転写では、プライマーの非特異的アニーリングが PCR における非特異的シグナルの発生要因となる場合があります。アニーリングの特異性を向上させるためには、逆転写反応温度を上げることが効果的な場合があります。42 $^{\circ}$ C から 50 $^{\circ}$ C の範囲を目安として反応温度を設定してください。

## [7] 関連商品

### リアルタイム PCR 試薬

品名	容量	Code No.
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 <b>THUNDERBIRD™ Probe qPCR Mix</b>	1ml x 1 (40 回用)	QPS-101T
	1.67ml x 3 (200 回用)	QPS-101
SYBR® Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 <b>THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix</b>	1ml x 1 (40 回用)	QPS-201T
	1.67ml x 3 (200 回用)	QPS-201

※THUNDERBIRD™ qPCR Mix では、50X ROX reference dye が別容器で添付されます。

※容量は、50µl 反応の場合の反応回数です。

※1000 回用の QPS-101X5、QPS-201X5 (QPS-101 または QPS-201 の 5 セット組) もご用意しています。

### 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 mRNA 精製キット <b>MagExtractor™ -mRNA-</b>	5 回用	NPK-801F
磁性ビーズを用いる簡便な Total RNA 精製キット <b>MagExtractor™ -RNA-</b>	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 <b>Magical Trapper</b>	1 個	MGS-101

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆

<http://www.toyobo.co.jp/bio>



【製造・販売元】

## **TOYOBO** 東洋紡績株式会社

－納期・注文に関するお問い合わせ－

ライフサイエンス事業部（大阪）  
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号  
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833  
E-mail : order\_lifescience@toyobo.jp

ライフサイエンス事業部（東京）  
〒141-8633 東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号 東五反田スクエア  
TEL 03-6422-4819 FAX 03-6422-4951  
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、祝を除く)  
E-mail : tech\_osaka@toyobo.jp  
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>