

Universal ProbeLibrary Probes, No. 1 - 165

あらゆるリアルタイム PCR 機器で使用できる FAM-ダーククエンチャーでラベルされた加水分解プローブ。

2 × 125 μl (10 μM; 625 反応分/20 μl 反応)

Ver.1/2014.12

保存温度 -15 ~ -25

1. 製品説明

Universal ProbeLibrary Probe は、5'末端を FAM、3'末端付近をダーククエンチャーで標識した、プレバリデートした加水分解プローブです。

オンラインの Assay Design Center

:<http://www.universalprobelibrary.com> でデザインしたプライマーとそれにマッチする Universal ProbeLibrary Probe を組み合わせることで、ヒトやマウスをはじめ、ほぼすべての遺伝子を特異的に定量することが可能です。

2. 構成

2 × 125 μl (10 μM)

最終濃度 200 μM で 20 μl で調製した場合、625 反応分

3. 保存温度

- 未開封のキットは、-15 ~ -25 でラベルに記載の有効期限まで使用可能です。
- +2 ~ +8 で保存する場合は、1 ヶ月以内に使用してください。
- 凍結融解を繰り返さないでください。凍結融解を繰り返す可能性がある場合は小分け分注しておき、凍結融解を最小限にすることをお勧めします。
- 蛍光物質が含まれるため遮光して保存してください。
- 使用時に希釈した試薬は長期保存には適しませんのでできるだけお早めにご使用ください。

4. サンプルについて

サンプル RNA は、あらかじめ cDNA に逆転写します。RNA のクオリティは結果の正確性と再現性に影響を及ぼします。サンプル RNA は高濃度で DNA の混入のない、RNase やその他の阻害物質を含まない高純度のものを調製します。

cDNA は反応液量の 10% (2 μL) を超えて持ち込むと、PCR を阻害する可能性があります。まずは、20 倍、200 倍などに段階希釈したもので阻害がないことを確認します (阻害がある場合は、増幅シグナルが等間隔で得られません)。

5. プライマーについて

まずは、各最終濃度 200 nM ~ で反応させます。必要に応じて 200 ~ 1000 nM で最適化します。

6. プローブについて

まずは、各最終濃度 200 nM ~ で反応させます。必要に応じて 100 ~ 500 nM で最適化します。

7. 反応容量について

使用するリアルタイム PCR 装置の推奨する反応容量で調製します。

反応容量が少なくなると、ピペティングやその他の影響によりデータ誤差が大きくなる可能性がありますのでご注意ください。

8. 反応溶液の調製

反応溶液の調製の一例を示します。実験に合わせて濃度や液量を調整してください。

7-1. LightCycler® (キャピラリタイプ) で LightCycler® TaqMan® Master を用いた場合

組成	液量	最終濃度
H ₂ O (PCR グレード)	9.8 μl	
Universal ProbeLibrary probe (10 μM)	0.4 μl	最終濃度 0.2 μM
Forward primer (10 μM)	0.4 μl	最終濃度 0.2 μM
Reverse primer (10 μM)	0.4 μl	最終濃度 0.2 μM
LightCycler® TaqMan® Master, 5 × 濃度 (バイアル 1a と 1b を混合したもの)*	4.0 μl	1 × 濃度
テンプレート (cDNA)	5.0 μl	cDNA : 20 倍程度希釈したもの
Total 液量	20.0 μl	

*あらかじめ、試薬の 1a と 1b を説明書のとおり調製してください。

プライマーやテンプレートは、サンプル数に応じて希釈して使用ください。プライマーやテンプレートの希釈は、H₂O を使用します (TE を用いると溶液中の Mg²⁺濃度が変化します)。cDNA が反応液量の 10% (2 μl) を超えて持ち込まれると、PCR を阻害する可能性があります。まずは、20 倍、200 倍などに段階希釈したもので阻害がないかを確認します (阻害されている場合は、増幅シグナルが等間隔で得られません)。

7-2. LightCycler® (プレートタイプ) で LightCycler® 480 Probes Master を使用した場合

組成	液量	最終濃度
H ₂ O (PCR グレード)	3.8 µl	
Universal ProbeLibrary probe (10 µM)	0.4 µl	最終濃度 0.2 µM
Forward primer (10 µM)	0.4 µl	最終濃度 0.2 µM
Reverse primer (10 µM)	0.4 µl	最終濃度 0.2 µM
LightCycler® 480 Probe Master 2 × 濃度	10.0 µl	1 × 濃度
テンプレート (cDNA)	5.0 µl	cDNA: 20 倍程度希釈したもの
Total 液量	20.0 µl	

プライマーやテンプレートは、サンプル数に応じて希釈して使用ください。プライマーやテンプレートの希釈は、H₂Oでおこなってください (TE を用いると溶液中の Mg²⁺濃度が変化してしまいます)。

cDNA は反応液量の 10% (2 µl) を超えて持ち込むと、PCR を阻害することがあります。まずは、20 倍、200 倍などと段階希釈したもので阻害がないかを確認ください (阻害されている場合は、増幅シグナルが等間隔で得られません)。

7-3. 他社製のサーマルブロックタイプのリアルタイム PCR システムで FastStart TaqMan® Probe Master または FastStart Universal Probe Master (ROX) を使用した場合

組成	液量	最終濃度
H ₂ O (PCR グレード)	3.8 µl	
Universal ProbeLibrary probe (10 µM)	0.4 µl	最終濃度 0.2 µM
Forward primer (10 µM)	0.4 µl	最終濃度 0.2 µM
Reverse primer (10 µM)	0.4 µl	最終濃度 0.2 µM
FastStart TaqMan Probe Master 2 × 濃度	10.0 µl	1 × 濃度
テンプレート (cDNA)	5.0 µl	cDNA: 20 倍程度希釈したもの
Total 液量	20.0 µl	

プライマーやテンプレートは、サンプル数に応じて希釈して使用ください。プライマーやテンプレートの希釈は、H₂Oでおこなってください (TE を用いると溶液中の Mg²⁺濃度が変化してしまいます)。

cDNA は反応液量の 10% (2 µl) を超えて持ち込むと、PCR を阻害することがあります。まずは、20 倍、200 倍などと段階希釈したもので阻害がないかを確認ください (阻害されている場合は、増幅シグナルが等間隔で得られません)。

ROX リファレンス色素による補正が必要な装置を使用する場合は、ROX 色素があらかじめ含まれているマスターミックス試薬、またはマスターミックスへ色素を別途添加してご利用ください。ROX 補正の必要の有無については各リアルタイム PCR システムのマニュアルを参照ください。

8. 反応プロトコール

反応プロトコールの一例を示します。プライマーの T_m 値や増幅長に合わせてアニリング温度や伸長時間を調整します。

8-1. LightCycler® システム (キャピラリタイプ) で LightCycler® TaqMan® Master を使用した場合

解析モード	サイクル数	セグメント	温度	保持時間	蛍光取得
熱変性					
None	1	酵素活性化	95	10 分 (600 秒)	None
増幅					
Quantification	45	熱変性	95	10 秒	None
	(ターゲットのコピー数に合わせて設定)	プライマーのアニリングと伸長反応	60	20 秒	None
		シグナル取得	72	1 秒	Single
冷却 (Cooling)					
Cooling	1	冷却	40	30 秒	None

Ver.3.3 以前のソフトウェアでは、Gain を以下のように設定してあります (ラン終了後の変更はできません)。Ver.3.5 以上のソフトウェアでは設定の必要はありません。

F1=5、F2=1、F3=1

8-2. LightCycler® システム (プレートタイプ) で LightCycler® 480 Probes Master を使用した場合

検出フォーマット					
Mono Color Hydrolysis Probes または Multi Color Hydrolysis Probes					
解析モード	サイクル数	セグメント	温度	保持時間	蛍光取得
熱変性					
None	1	酵素活性化	95	10 分 (600 秒)	None
増幅					
Quantification	45	熱変性	95	10 秒	None
	(ターゲットのコピー数に合わせて設定)	プライマーのアニリングと増幅	60	30 秒	None
		シグナル取得	72	1 秒	Single
冷却 (Cooling)					
Cooling	1	冷却	50	10 秒	None

Ramp Rate (/s) の変更は必要ありません。デフォルトで設定されます。

8-3. 他社製のサーマルブロックのリアルタイム PCR 装置で FastStart TaqMan® Probe Master または FastStart Universal Probe Master (ROX) を使用した場合

検出フォーマット					
FAM(SYBR Green Iと同じです)を検出するよう設定します。					
クエンチャーは None や MGB など非蛍光のものを選択します					
解析モード	サイクル数	セグメント	温度	保持時間	蛍光取得
熱変性					
None	1	酵素活性化	95	10分 (60秒)	None
増幅 ¹⁾					
Quantification	45	熱変性	95	15秒	None
	(ターゲットのコピー数に合わせて設定)	プライマーのアニリングと増幅	60	60秒	取得

1) 使用するリアルタイム PCR 装置の推奨する加水分解プロトコールでおこなってください。

本製品は、Fast モードにも対応しております。使用する装置の推奨に従って設定してください。

9. よくある質問

Q1. 増幅しません。

A1-1. サンプルが cDNA の場合、原液を反応液量の 10% (2 μl) を超えて持ち込むと、PCR を阻害することがあります。まずは、20 倍、200 倍などと段階希釈したもので阻害がないか確認します (阻害されている場合は、増幅シグナルが等間隔で得られません)。

A1-2. デザインを確認します。特にデザインの元となる遺伝子情報が適切かどうか、また、プライマーとプローブの組み合わせが適切かどうか確認します。

A1-3. 増幅が弱い場合、プライマーやプローブの濃度を増量したり検討すると改善することがあります。

Q2. 増幅されているが、検出できません。

A2-1. 装置が正しくの設定されているか確認します。

A2-2. プローブの保存状態が適切か、分解が起こっていないか確認します。

A2-3. プライマーとプローブの組み合わせが適切かどうか確認します。

Q3. 1-Step リアルタイム RT-PCR にも使用できますか？

A3. RNA をテンプレートとした 1-StepPCR でも検出用プローブとしてご使用いただけます。試薬調製や設定については、反応試薬の説明書をご参照ください。

まれに、遺伝子配列上の予期しない変異や RT 反応条件などにより、増幅部位特異的な増幅不良が起こることがあります。このような場合はデザイン(増幅部位)の変更により改善することがあります。

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社

〒105-0014 東京都港区芝 2 丁目 6 番 1 号

www.roche-biochem.jp

TEL. No. : 03-5443-5287 FAX. No. : 03-5443-7098

E-Mail : tokyo.as-support@roche.com

本製品能書 (英語版) は下記 URL よりご覧頂けます。

<http://www.roche-applied-science.com/shop/Instructions4Use>