

TwistDx™

Unwind DNA's possibilities

等温核酸増幅試薬

TwistAmp® Basic RT

Cat.No. TABASRT01KIT

マニュアル ver.01



TwistAmp® Basic RTは、RNAサンプルをテンプレートとして、ワンステップフォーマットで増幅して使用したいユーザー向けに設計されています。TwistAmp® Basicキットの試薬成分と互換性のある逆転写酵素が含まれています。この逆転写酵素は、最初に存在していたRNAテンプレートをcDNAに変換し、そのcDNAが以降の反応の鋳型となります。反応ペレットは、現在RNase阻害剤を含んでいません。

始める前に

TwistAmp® 増幅プロセスには、効率的に機能する適切なオリゴヌクレオチドプライマーが必要です。

PCRアッセイ用に設計されたプライマーは、TwistAmp® 反応にはあまり適していません。

TwistAmp® プライマーは典型的なPCRプライマーよりも長く、PCRとは対照的にオリゴヌクレオチドの融解温度 (T_m 値) はプライマーとしての性能にとって重要な要素ではありません。

アプリケーションに適したTwistAmp® プライマーを決定するために、プライマーのスクリーニングを行ってください。

注記: RPA反応は、標準的な *E. coli* の系の増幅には適していません (現在の製造方法が関係しています)。

TwistAmp® Basic RTには、RNase阻害剤は含まれていません。RNase阻害剤を使用される場合はご自身で準備していただき、製造元のプロトコルに従って使用してください (容量は、50 μ lのPCR反応の場合と同等になります)。

キットコンポーネント

	入数	保存温度	
• 凍結乾燥RPA反応ペレット (96反応)	1本	-20°C	
• TwistAmp® Rehydration バッファー 4ml	1本	-20°C	
• 酢酸マグネシウム (280mM) 500 μ l	1本	-20°C	
• ポジティブコントロールテンプレート (RNA) 100 μ l	1本	-20°C*	*長期間 (6 ヶ月間以上) 保存される場合は、-80°Cで保存してください。
• ポジティブコントロールプライマー / プローブミックス 75 μ l (プライマーから構成されたオリゴミックス)	1本	-20°C	

追加でご用意いただくもの

- 増幅プライマー
- ヒーティングブロックまたはその他のサーマルインキュベーター
- DNA断片化及び精製のための試薬/装置
- アガロースゲル電気泳動一式
- RNase阻害剤

プロトコル

キットコンポーネントの保管に関して

TwistAmp® Basic RTキットのコンポーネントは、適切な条件下で長期間の保管が可能です。

TwistAmp® Basic RT反応ペレットは、8連チューブの中にあらかじめ小分けされ、真空シールされたパウチの中に入っています。密閉された製品を、-20°C以下の状態で保存してください。

使用する際は、真空シールを破った後、30分以内に使用開始してください。残りのペレットは、入っていたパウチに戻し更にそれを密閉袋等に入れて密閉し、-20°C以下の状態で保存してください。

TwistAmp® Basic RT Rehydrationバッファーは、4本の1 mlチューブに分注されています。-20°Cの状態 で保存してください。

TwistAmp® Basic RTキットには、コントロールプライマー溶液とコントロールRNAテンプレートが含まれています。-20°C以下の状態で保存し、必要に応じて再凍結してください。

増幅の実施: 反応ペレットの再水和 (Rehydration) およびマグネシウムによる反応開始

TwistAmp® Basic RTの反応は、供給された凍結乾燥反応ペレットを適切なRehydration溶液で再構成 (再水和) することによって確立されます。この溶液は、TwistAmp® Basic RT rehydration buffer (キット付属)、増幅プライマーおよびテンプレート (サンプルあたり47.5 μ l) で構成されます。

2.5 μ lの酢酸マグネシウム溶液 (キット付属) を添加することによって反応が開始され、最終反応容量は1サンプルあたり50 μ lとなります。

rehydration溶液の成分は、必要なサンプル数のマスターミックスで組み合わせることができます。プライマースクリーニングを行う場合は、プライマーペアーの数に応じていくつかの異なるrehydration溶液を作製してください。この場合、すべての反応に共通の成分（テンプレート、rehydration/バッファー、水）はマスターミックスとして調製し、それを対応する容量で新鮮なチューブに分配した後、必要な容量の異なるプライマーペアーと混合します。次に、これらの異なるrehydration溶液をプロトコルに従って通常通り使用してください。

注意：組換えフィラメント形成の偏りを避けるために、プライマーとプローブをペレットに同時に添加する必要があります。

プロトコル詳細

1. 各サンプルについて、次のようにrehydration溶液を調製します。

Primer A (10 μ M)	2.4 μ l
Primer B (10 μ M)	2.4 μ l
Rehydration Buffer	29.5 μ l
Template, RNase阻害剤, dH ₂ O	13.2 μ l
(Total Volume)	47.5 μ l)

よく攪拌して短時間スピンドウンします。

2. 各サンプルについて、47.5 μ lのrehydration溶液を反応ペレットに移します
ペレット全体が再懸濁されるまでピペットで上下に混合します。

3. 各サンプルについて、2.5 μ lの280mM酢酸マグネシウムを添加し、よく混合します。
これを同時に多数のサンプルに対して行う場合は、反応チューブ（8連ストリップ）のキャップに酢酸マグネシウムを入れ、注意深くチューブにキャップして酢酸マグネシウムを再水和したサンプルに添加してスピンドウンさせてください。その後、激しく反転させて8～10回混合してから再びスピンドウンします。

4. 適切なインキュベーターブロック（最適40～42 $^{\circ}$ C）にチューブを挿入し、5分間インキュベートします。

5. 5分後、サンプルをインキュベーターから取り出し、8～10回激しく逆転させて混合してからスピンドウンし、サンプルをインキュベーターブロックに戻します（サンプル攪拌時間を変えることで、産物の形成が改善されることもあります）。

6. トータル20～40分を目安にインキュベーション/検出を続けます。
TwistAmp[®] Basic RT反応で経時変化が見られる場合は、必要に応じてインキュベーション時間を調整する必要があります。
インキュベーションの終了後、TwistAmp[®] Basic RT増幅反応のモニタリングに進みます。

TwistAmp[®] 技術とプローブを利用して、最適な増幅および蛍光シグナル発生を達成するための超高感度検出が要求される場合は、インキュベーション反応中に攪拌工程を追加することをお勧めします（少量で少数のコピーから急速に増幅すると、局在した基質が枯渇する可能性があります）。ここで記載されているプロトコルでは、反応開始から4分後にマニュアル操作により混合するとしていますが、長い（または遅い）アンプリコンを増幅する場合は、更に遅い時間に攪拌工程を加えることで、より良い結果を得られることがあります。

注意：TwistAmp[®] 反応ペレットは、rehydration溶液と酢酸マグネシウム溶液を使用して活性化されます。RPA反応は、室温でも酢酸マグネシウムが添加されるとすぐに開始します。選択されたインキュベーション温度でのサンプルのインキュベーションまで、ペレットの再懸濁から迅速に進めてください。ヒートリッド付きの装置を使用する場合は、このスイッチをオフにする必要があります。

TwistAmp[®] Basic RT増幅反応のモニタリング

TwistAmp[®] Basic RTの反応の結果は、アガロースゲル電気泳動（AGE）のようなエンドポイント法によって分析されます。AGEの代替方法も使用することができますが、その場合は下記のプロトコルを適宜変更してください。増幅産物は、ダウンストリームのアプリケーションを妨害する可能性のある反応成分を除去するために、反応終了後に精製する必要があります。

- 市販のPCR精製キットのプロトコルに従って増幅産物を精製します。
あるいは、反応液（増幅産物を含む）を水で10分の1に希釈し、標準的な分子生物学の方法に従ってフェノール/クロロホルムで抽出することができます。
- 増幅産物の必要量は、標準的なプロトコルに従って適切なアガロースゲル上で電気泳動によって分離し、それに応じて可視化することができます。これらの操作は、同等のサイズのPCR産物のAGE分析の操作と非常によく似ています。

3. データ分析：予想される増幅産物サイズのバンドは検出可能です。少ない標的コピー数を使用した場合、使用したプライマーによっては反応中に非特異的産物も形成されてしまう可能性があります。このようなプライマーノイズについては、別紙のTwistAmp®キットAppendixを参照してください。これらのアーチファクトは、通常NTCおよび非常に低い標的コピー数の場合に見られます。必要に応じて、主産物を非特異的産物から分離し、ダウンストリームのアプリケーション（サブクローニング、配列決定など）のために精製してください。

注意：反応液の増幅後の処理は、増幅産物による機器、作業面などのコンタミネーションの危険性が非常に高いことに注意してください。このリスクを軽減するための対策については、以下に記載のテンプレートクロスコンタミネーション防止に関する注意事項を参照してください。

ポジティブコントロール反応

TwistAmp® Basic RTキットには、ポジティブコントロールのプライマーとテンプレートが含まれており、キットコンポーネントの活性をテストすることができます。ポジティブコントロールは、TwistAmp® Basic RT反応ペレットおよびrehydrationバッファーと共に使用されます。

1. ポジティブコントロールのプライマーミックスを解凍します。
2. ポジティブコントロールRNAの1/10希釈液10μlを調製します。
3. 8μlのプライマー溶液を新しい1.5 mlマイクロ遠心チューブにピペットで移します。
4. ステップ3のプライマー溶液に29.5μlのrehydrationバッファーを加えます。短時間攪拌してスピンドウンします。
5. ステップ4の溶液に希釈したポジティブコントロールRNA10μlを添加します。短時間攪拌してスピンドウンします。この混合物がrehydration溶液となります。
6. 凍結乾燥されたTwistAmp® Basic RT反応ペレットが入っているチューブのキャップを外し、キャップをチューブの前に逆さまに置きます。
7. 各ペレットをプライマーおよびテンプレートRNAを含む47.5μlのrehydration溶液に再懸濁します。ペレット全体が再懸濁されるまでピペットで上下に混合します。
8. ステップ7のチューブに280mM酢酸マグネシウム2.5μlを添加し、よく混合して反応を開始します。チューブキャップに2.5μlの酢酸マグネシウム溶液（キット付属）をピペッティングし、酢酸マグネシウム溶液がキャップ内に残っていることを確認してからチューブを慎重にリキャップします。酢酸マグネシウム溶液が再水和したサンプルと確実に混合するように、チューブをスピンさせます。その後、激しく反転させて8～10回混合し、再びスピンドウンしてください。
9. チューブをインキュベーターブロック（最適40～42℃）に置き、5分間インキュベートします。
10. 5分後、サンプルをインキュベーターから取り出し、8～10回激しく逆転させて混合してからスピンドウンし、サンプルをインキュベーターブロックに戻します。
11. トータル20分間のインキュベーション時間の間、インキュベーション/検出を続けます。インキュベーション終了後、TwistAmp® Basic RT増幅反応のモニタリングに進みます。
12. TwistAmp® Basic RT増幅反応のモニタリングに進むことにより、ポジティブコントロール反応の増幅産物のAGE分析へと続けます。ポジティブコントロール反応は、141 base pairsの増幅産物を生成し、ゲル電気泳動において対応するバンドを発生させます。

注意：続けて別の実験を行う際は、核酸のキャリーオーバーの可能性を最小限に抑えるための注意を払ってください。前処理ステップと後処理ステップには別々の作業領域とピペッターを使用してください。ポジティブディスプレイメント方式ピペットまたはエアゾール耐性フィルターピペットチップを使用してください。使用済みのピペットチップや反応に使った容器などは気密容器に回収してください。アンプリコンを精製し、アガロースゲル上でそれらを分析するときは、特別な注意を払ってください。

 **日本ジェネティクス株式会社**

☎ <http://www.n-genetics.com>

✉ info@genetics-n.co.jp

〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-14 後楽森ビル18階
Tel. 03 (3813) 0961 Fax. 03 (3813) 0962