



# 獣医学ラボ特有のニーズにお応えする マスターミックス

## はじめに

PCR 検査の結果の信頼性は、使用する試薬に大きく左右されます。そのため当社の酵素製品は、お客さまにとって最も重要な動物病原体のターゲットの同定に役立つように最適化されています。当社は、最も難しい動物サンプルにおける PCR 阻害物質の存在下でも良好な結果を得ることができる、頑健で一貫性のある試薬の徹底した開発に取り組んでいます。当社のマスターミックス製品群は取り扱いが容易で、ラボのさまざまなニーズに臨機応変に対応し、PCR 検査の経験がないお客さまでも、獣医学アッセイのデザインを何年も手がけてこられたお客さまでも、信頼性が高い結果を得ることができます (図 1)。

## 以下のような製品があります：

- ワンステップRT-PCRマスターミックス
- マルチプレックスワンステップRT-PCRマスターミックス
- 高速サイクリングマルチプレックスワンステップRT-PCRマスターミックス
- 内部ポジティブコントロール (IPC) 含有マスターミックス

### 1. PCR試薬を混合

### 2. 試薬を分注してRNAまたはDNAサンプルを添加

### 3. リアルタイムPCR増幅を実施

RT-PCRまたはPCRのキットおよびターゲット用のPCRプライマーと Applied Biosystems™ TaqMan® プローブ

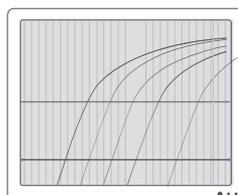
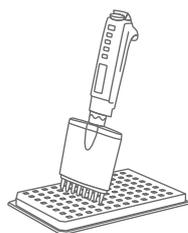


図1. 当社のマスターミックス製品のワークフロー

## ワンステップ RT-PCR マスターミックス

Applied Biosystems™ AgPath-ID™ One-Step RT-PCR キット — 低価格で高品質の、すぐに使える RNA ターゲット増幅用マスターミックスです。

- 一貫性のある確実な増幅により信頼性の高い結果を提供します
- 単一チューブによる簡単なワンステップ反応により手技操作が最小限に抑えられ、クロスコンタミネーションのリスクを低減できます
- 増幅が難しいテンプレート用に、検出エンハンサー（オプション、別売）をご提供しています

## 構成

AgPath-ID One-Step RT-PCR キットは、動物サンプル中に存在することが多い PCR 阻害物質の存在下でも、高感度で安定して RNA ターゲットを増幅できるようにデザインされています。キットには以下のものが含まれます。

- 25X RT-PCR 酵素ミックス
  - Invitrogen™ ArrayScript™ Reverse Transcriptase (RT); 高収量で cDNA を合成する改変 M-MLV RT
  - 優れた特異性および感度を提供する、高精製ホットスタート DNA ポリメラーゼ
- 効率的で安定した逆転写および PCR 反応に最適化された 2X RT-PCR バッファー
  - ノーマライゼーションおよび正確なデータ解析のための内部リファレンスとして Invitrogen™ ROX™ 色素
- 高 GC 含有率あるいは強固な二次構造を有するテンプレートの増幅のための検出エンハンサー（オプション、別売）

## 感度が高く信頼できるパフォーマンス

AgPath-ID One-Step RT-PCR キットの一貫性のあるパフォーマンスを明らかにするために、 $5 \sim 5 \times 10^6$  コピーのウイルス A コントロール RNA を含む段階希釈系列の増幅を行いました（図 2）。増幅プロットでは、PCR 増幅効率が高い時に見られる一貫性のある増幅曲線が示され、グラフでは広範囲のテンプレート量にあわせて高い信頼性および効率が確認できます。

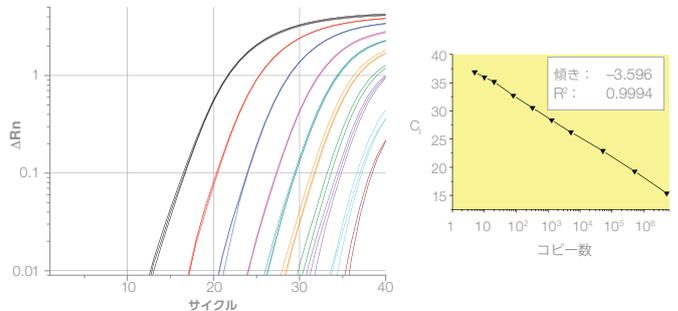


図2. 段階希釈したウイルスAコントロールRNA転写産物 ( $5 \sim 5 \times 10^6$  コピー) をターゲットとしたqRT-PCRの結果。AgPath-ID One-Step RT-PCR キットの高い効率および一貫性のあるパフォーマンスが示されています。

図 3 は異なるコントロール RNA であるウイルス B の段階希釈物の増幅プロットを示しています。AgPath-ID One-Step RT-PCR キットと他社の RT-PCR キットのターゲット増幅の分析感度を比較するために、RNA 量は低く設定されています ( $20 \sim 40,000$  コピー)。AgPath-ID One-Step RT-PCR キットでは、全希釈範囲において、他社キットよりも Ct 値が小さく、より良い分析感度が得られました。

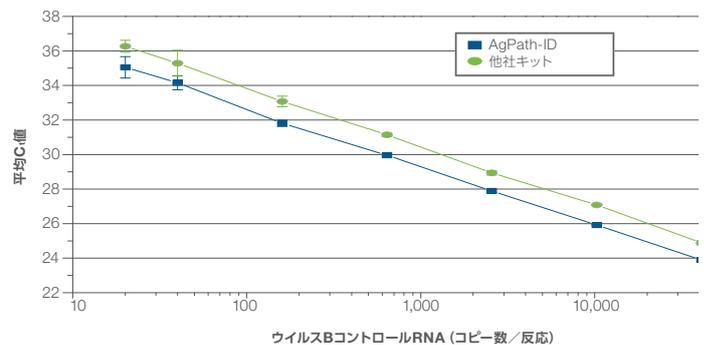


図3. AgPath-ID One-Step RT-PCRキットは、主要な他社キットより高感度です。AgPath-ID One-Step RT-PCR キットおよび主要な他社キットを使用して、ウイルスBコントロールRNAの段階希釈物 ( $20 \sim 40,000$  コピー) を増幅しました。

## マルチプレックスワンステップ RT-PCR マスターミックス

Applied Biosystems™ Path-ID™ Multiplex One-Step RT-PCR キット — RNA 病原体をターゲットとする獣医学ラボ用に最適化された、高感度で使いやすいマスターミックスです。

- 最高 4 種類の異なるターゲットの同時マルチプレックス増幅が可能で、時間短縮およびコスト低減に役立ちます
- 低コピー数 (20 コピー) ターゲットの増幅に最適化されており、難しいサンプルでも良好な結果が得られます
- 7 log を超える広範囲のサンプル量から増幅を行うことができ、常に安定したパフォーマンスを提供します

### 構成

Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットはシンプルなフォーマットで、動物病原体 RNA を高感度かつ安定してマルチプレックス増幅・定量ができるようデザインされています。キットには以下のものが含まれます。

- マルチプレックス酵素ミックス
  - 高収量 cDNA を合成できる M-MLV RT
  - 優れた特異性および感度を提供する、高精製ホットスタート DNA ポリメラーゼ
- 逆転写および PCR 反応で効率的に安定した結果を得られるように最適化されたマルチプレックス RT-PCR バッファ
  - ノーマライゼーションおよび正確なデータ解析のための内部リファレンスとして ROX 色素

### 信頼できるマルチプレックス

図 4 に示す試験では、Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットにより他社製品よりも高いターゲット検出感度が得られています。

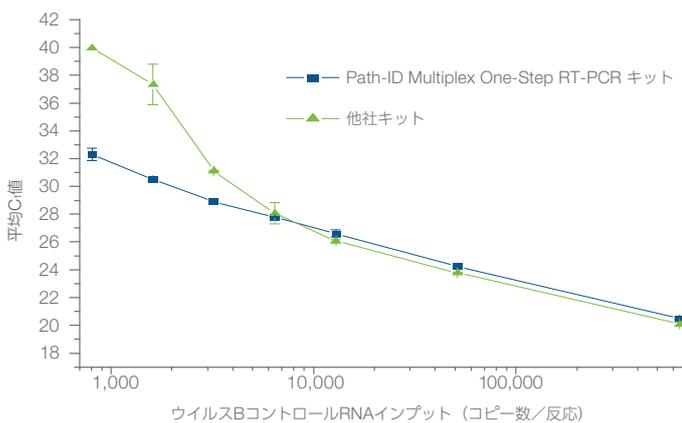


図4. Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットは、他社キットに比べてより少ないサンプル量のターゲットをより優れた感度 (低いCt値) で増幅します。Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットおよび他社キットを使用して、クアドラプレックスRT-PCR実験を行いました。ウイルスBターゲットに関するデータのみを示しています。

図 5 では、Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットが、シングルプレックスおよびデュプレックスのいずれの RT-PCR 反応においてもターゲットを同等に増幅することが示されており、マルチプレックス解析により感度が低下しないことが示されています。

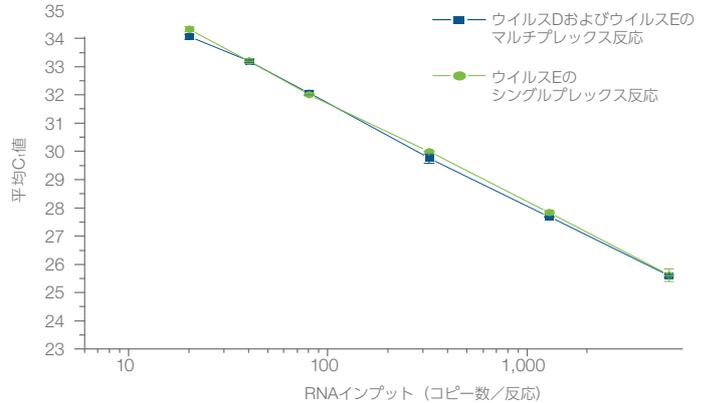


図5. Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットでは、シングルプレックス反応とマルチプレックス反応の間で感度に差は認められません。ウイルスEのRNAを逆転写してシングルプレックスPCR増幅を行い、さらにウイルスDのRNAとウイルスEのRNAをデュプレックス反応により逆転写および増幅しました。いずれの反応にもPath-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットを使用しました。

図 6 では、Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットを使用したマルチプレックス RT-PCR による 4 種類のターゲットの増幅を示しています。実験に使用したターゲットのうち 3 種類は初期量を一定に保ち、4 種類目のターゲットを段階的に希釈して、キットによるマルチプレックス増幅のダイナミックレンジを確認しました。その結果、Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットにより、1 回の反応で 4 種類の動物病原体 RNA ターゲットを安定して増幅できることが示されました。

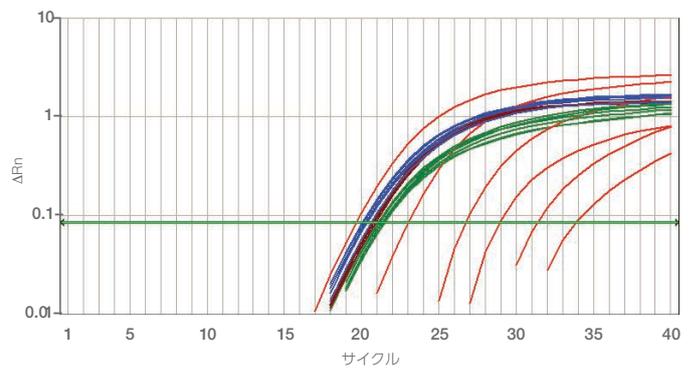


図6. Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットは、1回の反応で複数の動物病原体RNAを安定して増幅します。Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR キットを使用して、Applied Biosystems™ Xeno™ RNA ControlおよびウイルスA、ウイルスBおよびウイルスCのコントロールRNAを単一のマルチプレックス反応により増幅しました。サンプルセットには、初期量が同一の3種類のターゲットおよびウイルスBコントロールRNAの段階希釈系列 (赤い曲線) が含まれます。

## 高速マルチプレックスワンステップ RT-PCR マスターミックス Applied Biosystems™ TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix

— 迅速で信頼性および感度の高いリアルタイム RT-PCR を反応阻害物質の存在下でも行えます。

- 単一チューブでのワンステップ反應用の 4x マスターミックスにより、RNA や DNA を高感度で増幅できます
- シングルプレックスを実施可能で、マルチプレックスや、外因性または内因性の内部コントロールを組み込むことも可能です
- ファストモード対応機種でもスタンダードモード対応機種でも qRT-PCR 反応をより迅速に実施できます

### 構成品

TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix により、逆転写および PCR のすべてを単一の反応ウェル内で実行することが可能となります。キットには以下のものが含まれます。

- 迅速なホットスタート PCR のための、Applied Biosystems™ AmpliTaq™ Fast DNA Polymerase UP
- ウイルス核酸ターゲットの検出を高感度を実現するための、迅速で熱安定性が高い M-MLV RT
- 血液、抗凝固剤、土および糞便などの RT-PCR 阻害物質を含むサンプルを使用した評価の成功率を大きく改善させる添加剤
- -20 °C の保存温度で凍結しないバッファー溶液

### 高速サイクリングおよびフレキシビリティ

TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix は、結果が得られるまでの時間短縮に役立ち、リアルタイム PCR 装置を最大限に活用します。4X 組成であるため、反応液中により多くのターゲット核酸サンプルを添加することができます (高速プロトコルに必要です)。このため、低力価のサンプルでも感度を維持することができると同時に、スピードおよび処理能力も改善されます。図 7 は、当社の 4 種類の RT-PCR キットを使用した各実験の所要時間を示しています。TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix では高速サイクリングが可能であるため、標準的なサイクリング試薬と比較して、1/2 にラン時間を短縮できます。さらに、TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix は単一チューブフォーマットであるため、他のワンステップキットよりもハンズオン時間を短縮できます。

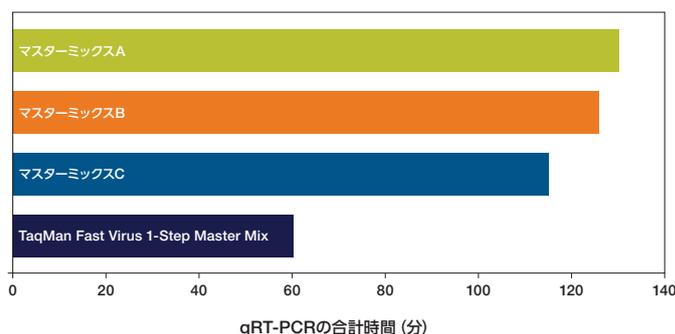


図7. TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mixでは、標準的なサイクリング試薬と比較して1/2にラン時間を短縮できます。同一の装置 (Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCRシステム) を使用して、4種類のApplied Biosystems RT-PCRキットの実験時間を比較しました。試験したすべてのマスターミックスは、各試薬に推奨されるサイクル時間および条件に従ってランを実施しました。

## qPCR マスターミックス

Applied Biosystems™ Path-ID™ qPCR Master Mix — 難しい qPCR 阻害物質存在下での使用に最適化された、動物病原体 DNA 検出用の高感度なマスターミックスです。

- 7 log を超えるサンプル量および、わずか 25 コピーのターゲットでも増幅が行える、信頼性の高い安定したパフォーマンス
- 難しいサンプルからでも正確な結果の入手を可能にする阻害物質耐性
- 広い温度範囲で安定したパフォーマンスを発揮し、反応液調製や試薬の保管が簡単

## 構成

Path-ID qPCR Master Mix は、動物病原体 DNA の高感度で安定した増幅を実施しやすいフォーマットで実行できるようにデザインされています。キットには以下のものが含まれます。

- 室温での反応液調製を可能とし、非特異的 PCR 産物を最小限に抑える高精製ホットスタート DNA ポリメラーゼ
- PCR 阻害物質の存在下で感度と機能性を向上させるように最適化されたバッファーおよび dNTP
- ノーマライゼーションおよび正確なデータ解析のための内部リファレンスとしての ROX 色素

## 簡便性およびパフォーマンス

Path-ID qPCR Master Mix は、6 桁に及びリニアダイナミックレンジを有し、わずか 25 コピーのターゲットでも信頼性の高いターゲット増幅を行います (図 8)。このように Path ID qPCR Master Mix は、非常に初期量の少ないサンプルからの増幅が可能です。

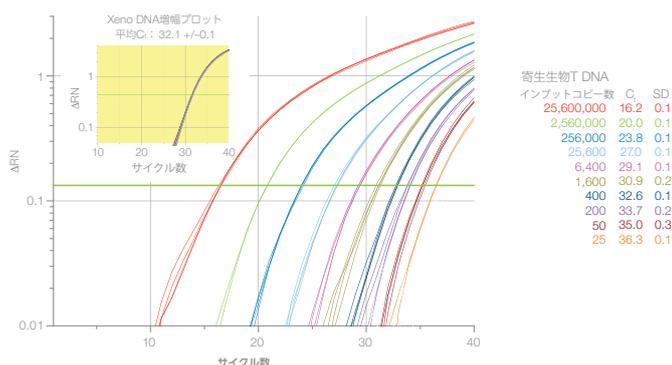


図8. Path-ID qPCR Master Mixを使用した4反復反応による寄生物T DNAの増幅プロットから、最も初期量が少ないサンプルでも容易に増幅できることが示されました。すべての反応において、内部ポジティブコントロールであるXeno DNA Controlの安定した増幅が示されました (挿入図)。

Path-ID qPCR Master Mix は、農業サンプルに含まれることの多い PCR 阻害物質の存在下において、多数の動物病原体 DNA ターゲットの信頼性の高い増幅を可能にします。図 9 では、他社のマスターミックスとは異なり、Path-ID qPCR Master Mix が高濃度のヘマチン(20 μM) およびフミン酸(15 ng/μL) のいずれにも耐性を示すことがわかります。

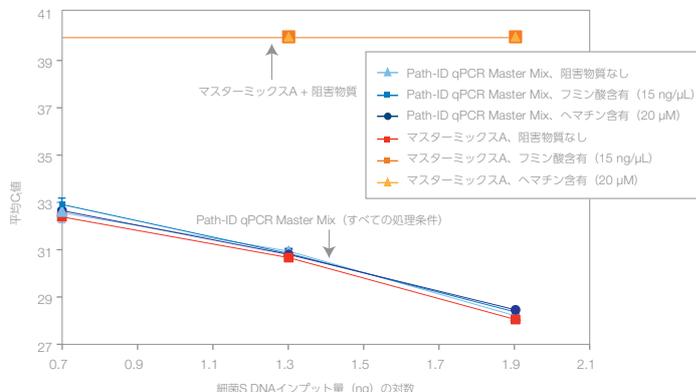


図9. Path-ID qPCR Master Mixは、他社のマスターミックスよりも良好な阻害物質耐性を示します。PCR阻害物質であるヘマチン (20 μM) およびフミン酸 (15 ng/μL) 存在下での、細菌SターゲットDNA段階希釈物の増幅に関するCt値を示します。Ct値の検出限界は40としました。

Path-ID qPCR Master Mix は、過酷な条件にさらされた後も高いパフォーマンスを維持します。図 10 では、Path-ID qPCR Master Mix に複数回の凍結/融解および室温処理を行っています。すべての処理において、Path-ID qPCR Master Mix は同等の増幅を示し、過酷な保存条件や室温条件下でも安定であることが示されました。

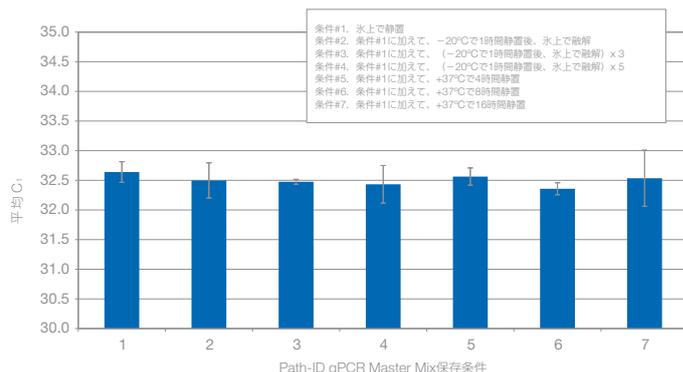


図10. さまざまな取り扱い状況のPath-ID qPCR Master Mixを使用した際の細菌M DNAの増幅のCt値。さまざまな凍結融解サイクル下に置いたPath-ID qPCR Master Mixおよび+37°Cで異なる時間静置したPath-ID qPCR Master Mixを用いて、細菌M DNAのPCRを実施しました。

## 内部ポジティブコントロールを含むマスターミックス

Applied Biosystems™ VetMAX™ -Plus マスターミックスは、研究者が期待する高い感度と安定したパフォーマンスを示し、付属する Xeno™ 内部ポジティブコントロール (IPC) によってさらに信頼性および簡便性が強化されます。病原体検出ワークフローに IPC を使用することで、真のターゲット陰性と PCR 阻害物質による陰性を識別することが可能となります。

- Xeno IPC が反応の阻害および核酸精製の有効性の指標となるため、結果の信頼性が高まります
- 難しい動物 RNA または DNA 病原体の検出に最適化された組成です
- お客さま固有のアプリケーションに適合する一連のマスターミックスオプション (RT-PCR、マルチプレックス、qPCR) をご利用頂けます

## 構成成分

Applied Biosystems™ VetMAX™ -Plus の各キットには以下の構成成分が含まれます。

## Applied Biosystems™ VetMAX™ -Plus One-Step RT-PCR キット

- 25X RT-PCR 酵素ミックス
  - ArrayScript Reverse Transcriptase : 高収量で cDNA を合成する改良 M-MLV RT
  - 優れた特異性および感度を提供する、高精製ホットスタート DNA ポリメラーゼ
- 効率的で安定した逆転写および PCR 反応を可能にする 2X RT-PCR バッファー
  - ノーマライゼーションおよび正確なデータ解析のための内部リファレンスとして ROX 色素
- Xeno RNA Control

## Applied Biosystems™ VetMAX™ -Plus Multiplex One-Step RT-PCR キット

- 10X マルチプレックス酵素ミックス:
  - 高収量で cDNA を合成できる M-MLV RT
  - 優れた特異性および感度を提供する、高精製ホットスタート DNA ポリメラーゼ
- 効率的で安定した逆転写および PCR 反応を可能にする 2X マルチプレックス RT-PCR バッファー
  - ノーマライゼーションおよび正確なデータ解析のための内部リファレンスとして ROX 色素
- Xeno RNA Control

## Applied Biosystems™ VetMAX™ -Plus qPCR Master Mix

- 2X qPCR マスターミックス
  - 室温での反応液調製を可能とし、非特異的 PCR 産物を最小限に抑える高精製ホットスタート DNA ポリメラーゼ
  - PCR 阻害物質の存在下で感度と機能性を向上させるように最適化されたバッファーおよび dNTP
  - ノーマライゼーションおよび正確なデータ解析のための内部リファレンスとしての ROX 色素
- Xeno DNA Control

## 結果の適格性の確認

Xeno IPC を使用することで、PCR 阻害を効果的にモニターできるため、検査結果の適格性を簡単に確認できます。図 11 は、異なる濃度の PCR 阻害物質 (ヘマチン) の存在が、Xeno IPC によりどのように同定されるかを示しています。このデータでは、ターゲット分子の阻害による Ct 値の増加傾向が Xeno IPC でも再現されており、反応の阻害の指標として Xeno IPC を使用できることが示されています。正常な反応 (阻害がない場合) において期待される Xeno IPC の Ct 値の範囲が明確であるため、反応に対する阻害の影響を同定することができ、偽陰性結果のリスクを低減させることが可能です。

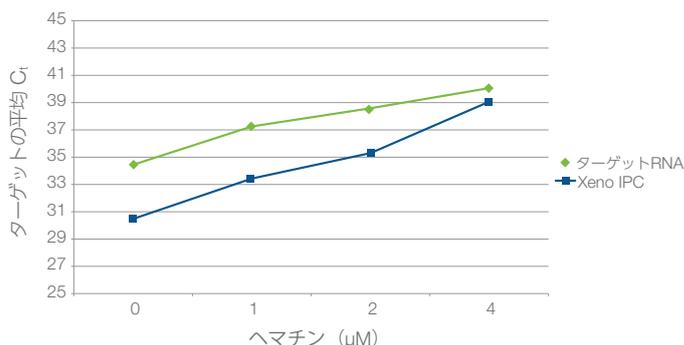


図11. 阻害物質濃度の増大がRNAターゲットおよびXeno IPCに与える影響を示したグラフ。1反応あたりそれぞれ100コピーのRNAターゲットおよび1,000コピーのXeno IPCを異なる濃度のヘマチン (0~4 μM) と混合しました。

VetMAX-Plus マスターミックスを VetMAX™ 試薬およびコントロールとともにご使用いただくことにより、動物の RNA および DNA 病原体検出の品質および安定性をさらに向上させることができます。

## Xeno IPC

Applied Biosystems™ VetMAX™ Xeno™ IPC は、核酸抽出プロセスのインターナルポジティブコントロールとして、あるいは、qPCR の阻害物質のモニターとして機能します。また、qPCR のポジティブコントロールとしても役立ちます。Xeno IPC として、RNA あるいは DNA フォームをご利用頂けます。濃度：10,000 copies/ $\mu$ L までのご提供となります。

## Xeno IPC アッセイ

Applied Biosystems™ Xeno™ IPC アッセイは、Xeno IPC を検出するためのプライマー/プローブの混合物です。得られた Xeno™ データは qPCR 結果の有効性を判断するために使用されます。Xeno IPC アッセイの新しく完全に人工合成されたデザインは、これまでに数百種類のゲノムにおいてもその有効性が確認されています。その中には動物衛生に関連する製品も含まれます。これらの製品は 25 倍の濃度で提供され、マルチプレックス qPCR で利用可能です。

## 利点

- どの qPCR のワークフローにも簡単に組み込むことができます
- qPCR 結果が正確で信頼できるかどうか、確認を得るのに役立ちます
- 偽陰性 (false negative) の可能性を減らすのに役立ちます

## 特長：フレキシブルなフォーマット

個別の IPC やアッセイが入手可能です。Xeno IPC はお客さまに各種ソリューションのフレキシブルなポートフォリオを提供します。

- RNA IPC および DNA IPC
- Applied Biosystems™ VIC™ チャンネル、あるいは Cy™ 5 / LIZ™ チャンネルのフォーマットを利用可能
- 100 反応分と 500 反応分を選択可能

## 実績ある品質

- AAVLD (米国獣医診断医協会) のガイドラインで推奨されています
- Xeno IPC は USDA からライセンスを受けた Applied Biosystems™ VetMAX™ -Plus キットで使用されています

## さまざまな試薬と同時に使用可能

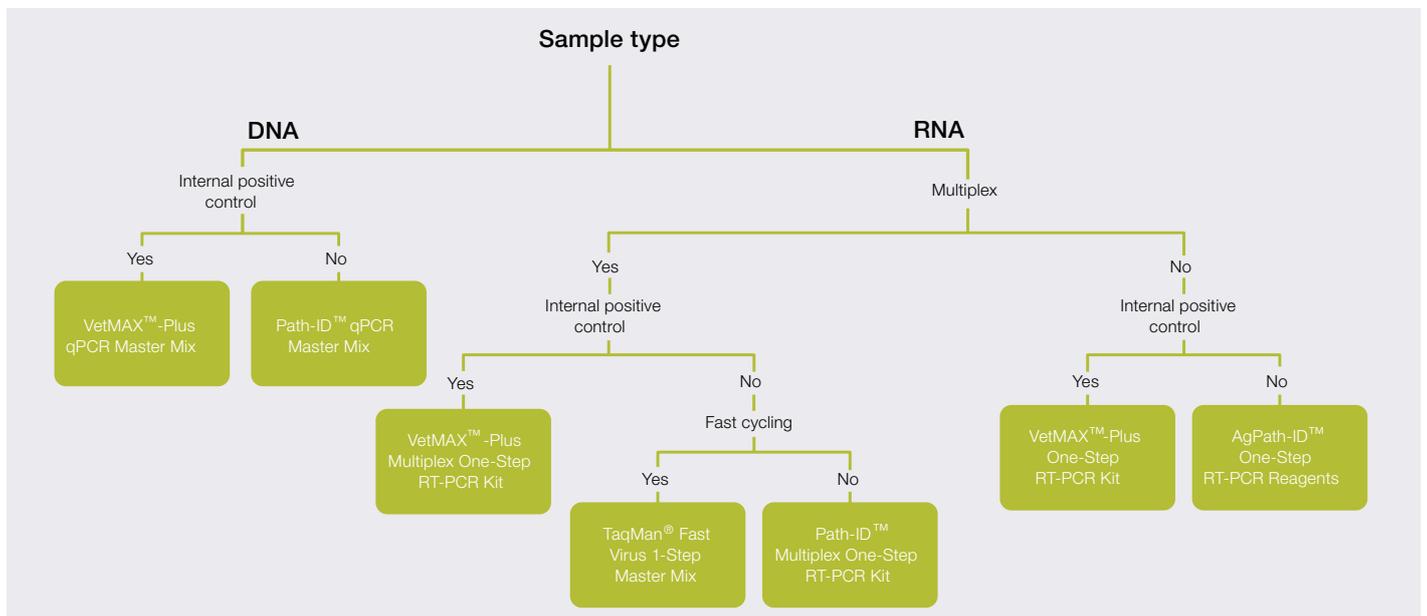
Xeno IPC は qPCR のワークフローで使用されるさまざまなキットと互換性があります。

- Applied Biosystems™ MagMAX™ キットおよびその他の磁気ビーズやスピンカラムを利用したサンプル調製キット
- VetMAX キットもしくは自家調製したアッセイ
- Applied Biosystems™ AgPath-ID™ キット、Path-ID™ キット、および VetMAX Plus キット、その他の市販キット類

## 高品質な結果

Xeno IPC によって qPCR 阻害を効果的にモニターすることができ、これによってテスト結果を容易に判定することができます。また新規の人工合成配列デザインにより、非特異ターゲット由来の偽陽性反応を回避することができます。Xeno IPC を使用した際に、通常反応 (阻害なし) における予測される範囲の Ct の値はわかっているので、阻害が反応に与える影響を測定することができ、偽陰性のリスクを低減することができます。

## qPCRマスターミックス選択ガイド



## Ordering information

製品名	サイズ	製品番号
<b>qPCRマスターミックス</b>		
Path-ID qPCR Master Mix	500 反応	4388644
AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit	100 反応	AM1005
AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit	500 反応	4387424
AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit	1,000 反応	4387391
Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR Kit	100 反応	4442135
Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR Kit	500 反応	4442136
Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR Kit	1,000 反応	4442137
VetMAX-Plus One-Step RT-PCR Kit	100 反応	4415328
VetMAX-Plus Multiplex One-Step RT-PCR Kit	100 反応	4415330
VetMAX-Plus qPCR Master Mix	100 反応	4415327
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	200 反応	4444432
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	1,000 反応	4444434
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	2,000 反応	4444436
<b>Xeno IPCマスターミックス</b>		
VetMAX Xeno Internal Positive Control RNA	100 反応	A29763
VetMAX Xeno Internal Positive Control DNA	100 反応	A29764
VetMAX Xeno Internal Positive Control—VIC Assay	100 反応	A29765
VetMAX Xeno Internal Positive Control—LIZ Assay	100 反応	A29766
VetMAX Xeno Internal Positive Control RNA	500 反応	A29761
VetMAX Xeno Internal Positive Control DNA	500 反応	A29762
VetMAX Xeno Internal Positive Control—VIC Assay	500 反応	A29767
VetMAX Xeno Internal Positive Control—LIZ Assay	500 反応	A29768

※本製品は本邦では、試験研究用製品としての販売をしております。診断および治療の目的での使用はできません。

詳細はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/animalhealth](https://thermofisher.com/animalhealth)

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。  
 © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
 All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.  
 実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。  
 価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。  
 標準販売条件はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/jp-tc](https://thermofisher.com/jp-tc) **SDR145-A20110B**

販売店

サーモフィッシャーサイエンティフィック  
 ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ [jptech@thermofisher.com](mailto:jptech@thermofisher.com)  
 オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584  
 営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://facebook.com/ThermoFisherJapan) [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

[thermofisher.com](https://thermofisher.com)

**ThermoFisher**  
 SCIENTIFIC