

リアルタイムPCR用細胞溶解&cDNA合成キット (培養細胞用)

## SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR



NEW

■期間：2013年10月9日～2014年3月20日 (ご注文分)

培養細胞から簡便・短時間にリアルタイムPCR用の鑄型cDNAの調製が可能です。

**SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code:SCQ-101)**は、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析のための細胞溶解試薬 (Lysis Reagents) と逆転写反応試薬 (RT Reagents) からなるキットです。本製品をご使用いただくことで、96ウェルプレートなどで培養した細胞から、逆転写反応の鑄型として利用可能なRNAを含む細胞ライセートを簡便に調製することができます。さらに、本キットに含まれる逆転写反応試薬は、この細胞ライセートからのRT反応に最適化されています。本キットにより、簡便、迅速に培養細胞からリアルタイムPCR用の鑄型cDNAの合成が可能であり、ハイスループットアッセイに適しています。

**SuperPrep™ Cell Lysis Kit for qPCR (Code:SCQ-201)**は、細胞溶解試薬 (Lysis Reagents) の別売品です。1-stepリアルタイムRT-PCRによる簡易アッセイのための細胞ライセートの調製にご使用いただけます。

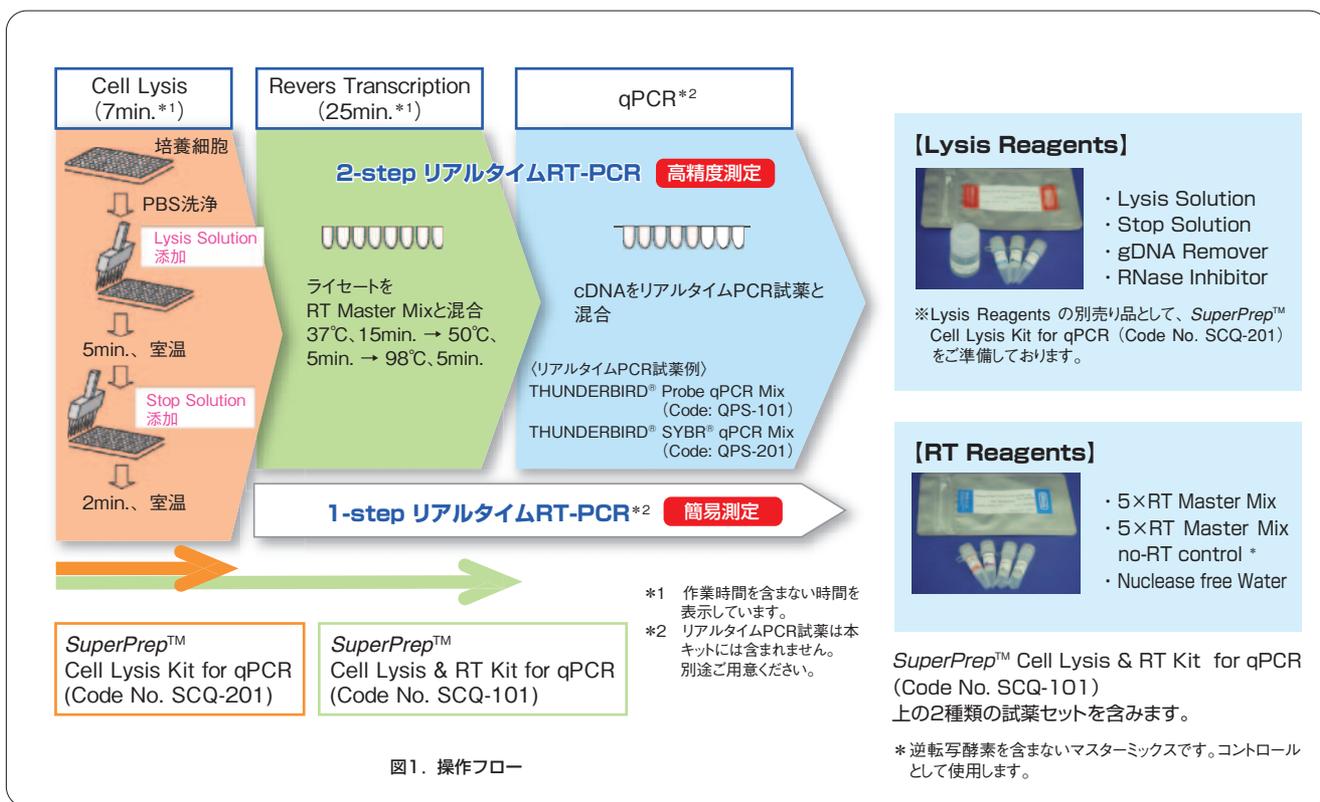


図1. 操作フロー

### 特長1 RNA精製不要

- 細胞をPBS (-) で洗浄後、Lysis Solution (gDNA Remover添加) を細胞に添加、懸濁し、室温で5分間インキュベートすることによって、細胞溶解とゲノムDNAの分解を同時に行います。反応停止はStop Solutionを添加して処理するのみで、熱処理は必要ありません。
- 逆転写反応は、細胞ライセート (希釈不要) を加え、20分間インキュベートします。

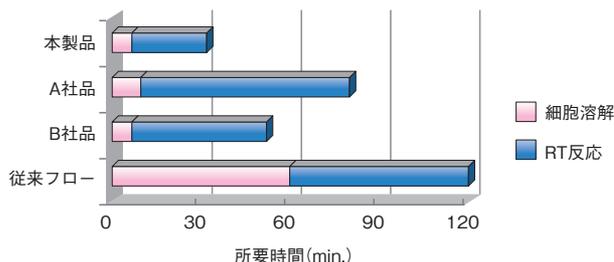


図2. cDNA合成までの所要時間  
 従来フローの細胞溶解時間はRNA抽出作業時間を示します。

## 特長2 ▶ ライセートから高品質なcDNAを合成

最適化されたバッファー組成により、RNase等の細胞成分によるRNAの分解を効果的に抑えます(調製したRNAは氷上で2時間安定です)。また、DNase I 処理後にcDNA合成を行うことから、ゲノムDNAのコンタミの少ない高品質なcDNAを合成することができます。逆転写試薬は弊社の高効率逆転写酵素「ReverTra Ace®」をもとに最適化されたマスターミックス\*となっており、簡便・高効率にcDNA合成を行うことができます。合成したcDNAは長期保存可能です。

本試薬は、幅広い種類の細胞を用いるアッセイに使用可能です。下表の代表的な細胞について適用できることを確認しています。

\*マスターミックスにはランダムプライマーとOligo dTプライマーが最適比率で混合されています。

表1. 本製品の適用確認済み細胞

細胞名	接着/浮遊	種	細胞	由来
1 A431	接着	<i>H. sapiens</i>	epidermoid carcinoma cell line	上皮様細胞がん
2 C2C12	接着	<i>M. musculus</i>	myoblast cell line	筋芽細胞
3 Caco-2	接着	<i>H. sapiens</i>	colon adenocarcinoma cell line	大腸がん
4 CHO-K1	接着	<i>C. griseus</i>	ovary cell line	卵巣
5 COLO205	浮遊	<i>H. sapiens</i>	colon adenocarcinoma cell line	大腸がん
6 DLD-1	接着	<i>H. sapiens</i>	colon adenocarcinoma cell line	大腸がん
7 HCT-15	接着	<i>H. sapiens</i>	colon adenocarcinoma cell line	大腸がん
8 HDF	接着	<i>H. sapiens</i>	primary foreskin fibroblasts (primary cell)	皮膚線維芽細胞
9 HEK293	接着	<i>H. sapiens</i>	embryonic kidney cell line	胎児腎
10 HeLa S3	接着	<i>H. sapiens</i>	cervix carcinoma cell line	子宮頸がん
11 HepG2	接着	<i>H. sapiens</i>	hepatocellular carcinoma cell line	肝がん
12 Jurkat	浮遊	<i>H. sapiens</i>	T lymphocyte cell line	白血病T細胞
13 K562	浮遊	<i>H. sapiens</i>	myelogenous leukemia cell line	赤芽球様白血病細胞
14 KUSA-A1	接着	<i>M. musculus</i>	bone marrow stromal stem cell line	骨芽細胞様株
15 L929	接着	<i>M. musculus</i>	aneuploid fibrosarcoma cell line	結合組織
16 MCF7	接着	<i>H. sapiens</i>	breast adenocarcinoma cell line	乳腺がん
17 Neuro2a	接着	<i>M. musculus</i>	neuroblastoma cell line	神経芽細胞腫
18 NIH-3T3	接着	<i>M. musculus</i>	embryo fibroblast cell line	胎仔由来線維芽細胞
19 PC12	接着	<i>R. norvegicus</i>	adrenal pheochromocytoma cell line	副腎褐色細胞腫
20 rMSC	接着	<i>R. norvegicus</i>	bone marrow stromal stem cells (primary cell)	骨髄間質細胞
21 THP-1	浮遊	<i>H. sapiens</i>	acute monocytic leukemia cell line	単球
22 U937	浮遊	<i>H. sapiens</i>	leukemic monocyte lymphoma cell line	単球

## 特長3 ▶ ハイスループット解析のバラツキ低減

プロトコルから少量の分注工程や希釈工程を減らすことで、ハイスループット解析におけるバラツキを低減しました。また、細胞溶解時のピペティング操作を無くし、DNaseI 処理を並行して行うことで操作性を向上させました。DNase Iの反応の停止はStop Solutionを加えるのみで、RNAを不安定化する加熱工程などは不要です。

## 特長4 ▶ 様々なリアルタイムPCR試薬に使用可能

様々なリアルタイムPCR試薬(SYBR® Green I、TaqMan®アッセイ両方に対応可能)と組み合わせて使用可能です。また、弊社THUNDERBIRD® qPCR Mix (Code No. QPS-101、QPS-201)等と組み合わせて用いることによって、培養細胞から簡便かつ高精度の遺伝子発現解析が可能であることを確認しています。(p.5~p.6をご参照ください) さらに、弊社RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix (Code No. QRT-101、QRT-201)等の1-stepリアルタイムPCR試薬と組み合わせる簡易アッセイも可能です。

## 実施例1 データのバラツキを考慮したアッセイ系の質の評価

HeLa S3細胞を96ウェルプレートに $2 \times 10^4$  cells/wellずつ播種し、100nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を加えて 24 時間インキュベートしました。その後、PMA処理した12ウェル、未処理の12ウェルについてPBS (-) で細胞を洗浄し、SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCRで処理してcDNA合成を行いました。このcDNAを鋳型にTHUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No.QPS-101) を用いてIL-6、IL-1 $\beta$ 、 $\beta$ -actin遺伝子についてTaqMan®プローブアッセイを行いました (n=12にて実施)。同様にA社同等品を用いてリアルタイムPCR解析を行いました (逆転写反応試薬とリアルタイムPCR試薬もA社キット付属品を使用)。IL-6、IL-1 $\beta$ 遺伝子のCt値を $\beta$ -actin遺伝子で補正し ( $\Delta$ Ct)、PMA処理の有無の差 ( $\Delta\Delta$ Ct) を算出しました。続いてZ'-factorを算出し、比較を行いました。

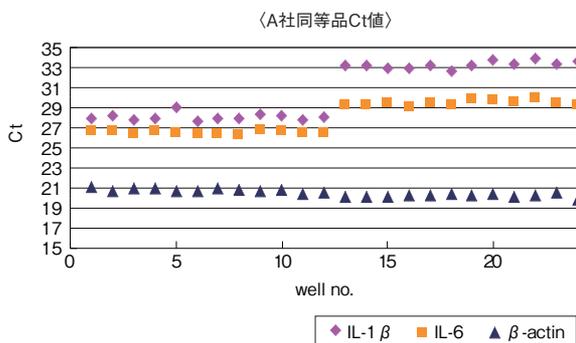
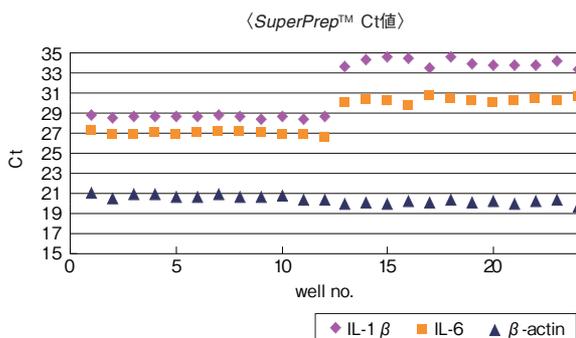


図3. Ct値の比較

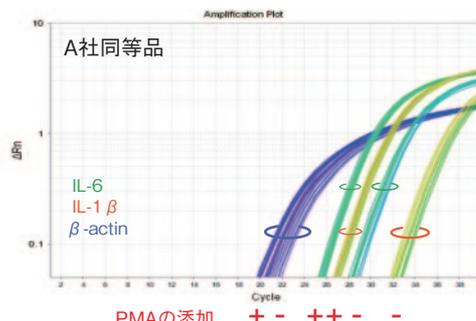
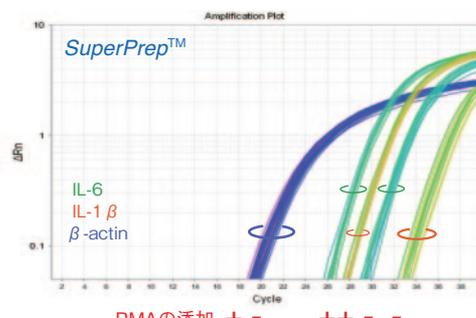


図4. 増殖曲線の比較

表2. 解析結果からのZ'の算出

### 〈IL-6〉

	PMA	Ct (IL-6) 平均	$\Delta$ Ct (IL-6 - $\beta$ -actin)		$\Delta\Delta$ Ct	Z'
			平均	標準偏差		
SuperPrep™	(+)	26.96	6.27	0.14	-3.85	0.62
	(-)	30.24	10.12	0.35		
A社同等品	(+)	26.50	4.30	0.34	-3.88	0.59
	(-)	29.44	8.18	0.19		

### 〈IL-1 $\beta$ 〉

	PMA	Ct (IL-1 $\beta$ ) 平均	$\Delta$ Ct (IL-1 $\beta$ - $\beta$ -actin)		$\Delta\Delta$ Ct	Z'
			平均	標準偏差		
SuperPrep™	(+)	28.62	7.93	0.15	-5.94	0.74
	(-)	33.99	13.87	0.38		
A社同等品	(+)	28.00	5.80	0.47	-6.19	0.61
	(-)	33.26	11.99	0.34		

### \* Z'-factor :

データのバラツキを考慮した、ハイスループットアッセイ系の質の目安となる数値です。一般に0.5以上で良好と考えられます。今回は下記の式で算出しました。

Z'-factor=

$$1 - 3 \times (\Delta Ct(+)\text{標準偏差} + \Delta Ct(-)\text{標準偏差}) / |\Delta\Delta Ct|$$

この結果、いずれもZ'-factorとしてはアッセイ系の質の目安となる0.5をクリアしましたが、SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101) を用いた実験において、A社同等品と比較して高いZ'-factorを示し、アッセイ系としてよりバラツキが少なく良好であることが分かりました。

## 実施例2 精製RNAと細胞ライセートでのCtの相関の検証

SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCRを用いて、HEK293 細胞 $2.5 \times 10^4$  cells からcDNAを合成しました(40 $\mu$ l反応系)。また、HEK293細胞から抽出したTotal RNA 66.6ngからReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201)を用いてcDNA合成(40 $\mu$ l 反応系)を行いました。

その後、それぞれのcDNAを鋳型にTHUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)を用いて15種類のHouse Keeping GeneについてリアルタイムPCRを行い、得られたCt値の相関性を検証しました。この結果、今回解析した15種類の遺伝子において、精製RNAと細胞ライセートを用いた解析に良好な相関が認められました。

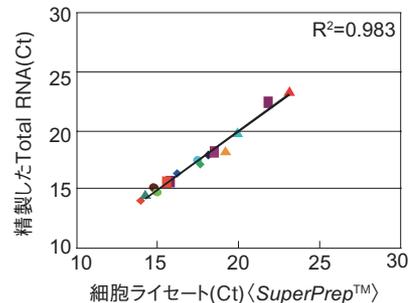


図5. 精製RNAとの定量的比較

## 実施例3 RNase活性が強い細胞における解析効率の検証

単球由来の細胞株U937は比較的RNaseの活性が高く、細胞溶解液を用いるアッセイは困難であるとされてきました。

本実験では、U937細胞 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10$  cellsから調製した細胞ライセート8 $\mu$ lを用いてcDNA合成(40 $\mu$ l 反応系)を行った後、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)を用いて、 $\beta$ -actin遺伝子についてリアルタイムPCRを行いました。

同様に、A社同等品を用いて同様のアッセイを行いました(逆転写反応試薬とリアルタイムPCR試薬もA社キット付属品を使用)。

また、同じサンプルから精製したTotal RNAの相当量を用いて解析を行いました(ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix [Code No. FSQ-201]、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix [Code No. QPS-201] 使用)。

この結果、弊社品での解析においてのみ、精製RNAを用いた場合同様に高い直線性を示しました。

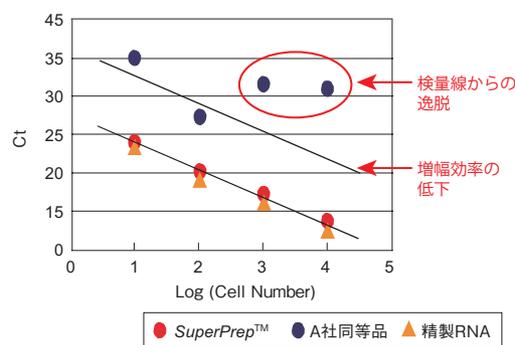


図6. U937細胞における $\beta$ -actin遺伝子の検出

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	通常価格	キャンペーン価格
<b>SuperPrep™ Cell Lysis &amp; RT Kit for qPCR</b> 〈Lysis Reagents〉 〈RT Reagents〉 ・Lysis Solution ・5 x RT Master Mix ・Stop Solution ・5 x RT Master Mix no-RT control ・gDNA Remover ・Nuclease free Water 評価用サンプル ・RNase Inhibitor ございます	100回用*1	-20℃	SCQ-101	¥76,000	¥45,600
	100回用×5	-20℃	SCQ-101X5	¥325,000	対象外
<b>SuperPrep™/THUNDERBIRD® Probe qPCR set*3</b> ・SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (SCQ-101)と THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (QPS-101) *2とのセット	1セット	-20℃	SCQ101/ QPS101	¥99,750	¥59,850
<b>SuperPrep™/THUNDERBIRD® SYBR® qPCR set*4</b> ・SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (SCQ-101)と THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (QPS-201) *2とのセット	1セット	-20℃	SCQ101/ QPS201	¥99,750	¥59,850
<b>SuperPrep™ Cell Lysis Kit for qPCR*5</b> ・Lysis Solution ・gDNA Remover 評価用サンプル ・Stop Solution ・RNase Inhibitor ございます	100 回用	-20℃	SCQ-201	¥39,000	対象外

\*1 40 $\mu$ lで逆転写反応をした場合に100回用としてご使用いただけます。

\*2 50 $\mu$ l反応で 200回用、20 $\mu$ l反応で 500回用としてご使用いただけます。

\*3 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (100回用) [¥76,000 → ¥72,450]とTHUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101: 200回用) [¥29,000 → ¥27,300]とのセット販売品です。

\*4 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (100回用) [¥76,000 → ¥72,450]とTHUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201: 200回用) [¥29,000 → ¥27,300]とのセット販売品です。

\*5 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCRに含まれるLysis Reagentsの別売り品です。

### 関連商品 高効率1-step用リアルタイムPCR試薬

品名	包装*	保存温度	Code No.	価格
(TaqMan® アッセイ用) <b>RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix</b>	0.5ml×5本	-20℃	QRT-101	¥33,000
(SYBR® GreenI アッセイ用) <b>RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix</b>	0.5ml×5本	-20℃	QRT-201	¥33,000

\* 50 $\mu$ l反応で100回用、20 $\mu$ l反応で250回用としてご使用いただけます。

\* SYBR® は Molecular Probe Inc.の登録商標です。TaqMan®は Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。