miRNAssay™ qPCR RT Master Mix

(Code No. MIR-101, MIR-101T)

SuperPrep® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR

(Code No. MIR-201, MIR-201T)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

A6674K

ー 目 次 ー

[1] はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

[2] 製品内容・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

[3] 製品のほかに用意するもの・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

[4] 使用方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

1. 精製 RNA をご使用の場合・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

2. 培養細胞をご使用の場合・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

3. 精製した細胞外小胞をご使用の場合・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

[5] リアルタイム PCR(例)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

1. THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix (Code No. QPX-101)・・・ 11

2. THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix (Code No. QPX-201)・ 13

[6] 実施例・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14

[7] トラブルシューティング・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17

[8] 関連商品・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

[9] 参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20

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。

※本資料に掲載している会社名および商品名・ロゴマークなどは、各社の商号、商標または登録商標です。

[1] はじめに

miRNAssay™ qPCR RT Master Mix(Code No. MIR-101)は、高効率逆転写酵素「ReverTra Ace®」を用いて開発された、miRNA 専用のリアルタイム PCR 用逆転写反応試薬です。本製品をお使いになることで、精製された Total RNA から、特異的かつ高感度に miRNA を cDNA に合成することが可能です。

SuperPrep® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. MIR-201)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。本製品をお使いになることで、96 ウェルプレート等で培養した細胞や、精製された細胞外小胞等から逆転写反応の鋳型として利用可能な miRNA を含むライセートを簡便に調製いただけます。

本製品には miRNA 特異的 RT プライマー及びリアルタイム PCR 試薬は添付されていません。リアルタイム PCR には、弊社高効率リアルタイム PCR 試薬 THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix(Code No. QPX-201)あるいは THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix(Code No. QPX-101)のご使用をお勧めします([8]関連商品をご参照ください)。

◆本製品の特長◆

1. プレミックス試薬

逆転写反応試薬(5×RT Master Mix)は、-20℃においても凍結しないプレミックスタイプの試薬です。鋳型 RNA、miRNA 特異的 RT プライマー、水を加えるだけの操作で、簡便に再現性良く cDNA を合成することができます。また、同じくプレミックスタイプの no-RT Control が付属していますので、逆転写反応(-)のコントロールも、容易に調製することができます。

2. 高い特異性

組成最適化により、逆転写反応の特異性が向上しました。非特異反応の低減により低濃度ターゲットの逆転写反応における信頼性が向上しています。

3. 広いレンジで検出可能

高効率、かつ特異的に、広いレンジで逆転写反応が可能です。

4. 短時間・簡便なプロトコール

逆転写反応試薬は、リアルタイム PCR 用の cDNA 合成に最適化されたバッファーを採用しており、わずか 35 分で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 の反応阻害要因となる残存 RNA の除去においても、追加的な RNaseH 処理を必要とせず、簡便なプロトコールとなっています。

5. 培養細胞や細胞外小胞から高品質な cDNA を合成可能

SuperPrep® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. MIR-201)を使用することで、培養細胞や精製された細胞外小胞等から、逆転写反応の鋳型として利用可能な miRNA を含むライセートを簡便に調製することができます。Lysis Solution で処理したライセートを鋳型として、そのまま逆転写反応を行うことができるため、解析時間を大幅に短縮することが可能です。

また、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 miRNA の分解を効果的に抑えます。また、gDNA remover 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。

6. さまざまなリアルタイム PCR 試薬に使用可能

さまざまなリアルタイム PCR 試薬と組み合わせて使用可能です。SYBR™ Green Ⅰ、TaqMan® アッセイ両方に対応しています。

弊社 THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix(Code No. QPX-201)あるいは THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix(Code No. QPX-101)と組み合わせて用いることによって、精製 RNA、培養細胞、精製された細胞外小胞等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。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれています。

miRNAssay™ qPCR RT Master Mix(Code No. MIR-101, MIR-101T)

品名および内容	保存	MIR-101 (200 回用／10μL)	MIR-101T (40 回用／10μL)
5×RT Master Mix	-20°C	400μL	80μL
5×RT Master Mix no-RT Control	-20°C	40μL	10μL
Nuclease-free Water	-20°C	1.1mL×2 本	440μL

SuperPrep® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. MIR-201, MIR-201T)

品名および内容	保存	MIR-201 (100 回用／40μL)	MIR-201T (20 回用／40μL)
5×RT Master Mix	-20°C	800μL	160μL
5×RT Master Mix no-RT Control	-20°C	80μL	16μL
Nuclease-free Water	-20°C	1.7mL×2 本	440μL
Lysis Solution	-20°C	6.5mL	1.3mL
gDNA Remover	-20°C	33μL	10μL
RNase Inhibitor	-20°C	110μL	22μL

5×RT Mater Mix

高効率逆転写酵素 ReverTra Ace®、RNase Inhibitor、反応バッファー、$MgCl_2$、dNTPs、グリセロールなどを含んだ 5×濃度のマスターミックスです。蓋を開ける前にスピンダウンして、液を底に落としてからご使用ください。また、粘性がありますので、ゆっくりとピペッティングを行ってください。

5×RT Master Mix no-RT Control

5×RT Mater Mix から ReverTra Ace®のみを除いたマスターミックスです。逆転写(-)のコントロールの調製にご使用になれます。5×RT Master Mix と同様に、蓋を開ける前にスピンダウンして、液を底に落としてからご使用ください。また、粘性がありますので、ゆっくりとピペッティングを行ってください。

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。

Lysis Solution

RT-qPCR 用に最適化された細胞溶解液です。RNase 活性を低減する成分を含みます。付属の RNase Inhibitor と gDNA Remover を加えて使用します。細胞溶解とゲノム DNA の分解を同時に行います。

gDNA Remover

本キットに最適化した DNase Ⅰ溶液です。Lysis Solution 58.7μL に 0.3μL の割合で添加して使用します。測定時のバックグラウンドの原因となるゲノム DNA を分解します。

RNase Inhibitor

本キットに最適化した RNase Inhibitor 溶液です。Lysis Solution 58.7μL に 1μL の割合で添加します。サンプル中の RNase 活性を低減します。

[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。

1. サーマルサイクラーまたはインキュベーター

本製品の RT 反応で推奨する温度(16℃, 42℃, 70℃, 95℃)を保つことができる機器をご用意ください。

2. Nuclease-free Water

miRNAssay™ qPCR RT Master Mix(Code No. MIR-101)には200回分、*SuperPrep*® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. MIR-201)には100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用意ください。ジエチルピロカーボネート(DEPC)不使用タイプのNuclease-free Waterの使用をお勧めします。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勧めします。

3. miRNA特異的RTプライマー

目的のmiRNA配列に対応したStem Loop構造を持つRTプライマーをご用意ください。配列特異的RTプライマーを使用して逆転写を行いますので、ランダムプライマーやOligo dTプライマー等を準備する必要はありません。

プライマーの精製純度は反応特異性に大きな影響を与えます。一般的に精製純度が低いプライマーでは品質のばらつきが大きくなり、非特異増幅が発生しやすくなることがあります。可能であれば、HPLC精製、少なくともカートリッジ(OPC)精製以上の精製グレードのプライマーをご使用ください。

4. リアルタイムPCR装置及びリアルタイムPCR試薬

ご使用にあたっては各装置、試薬の取扱説明書に従ってください。

[4] 使用方法

1. 精製 RNA をご使用の場合

（miRNAssay™ qPCR RT Master Mix(Code No. MIR-101)をご使用の場合）

(1)反応液の調製

氷上にて以下のように反応液を調製します。

試薬	10μL 反応 *3	最終濃度
5×RT Master Mix *1	2μL	1×
RT プライマー*4	XμL	50 nM *2
RNA template	YμL	1pg~100ng
Nuclease-free Water	8-X-YμL	-
合計液量	10μL	

*1 ここで逆転写(－)のコントロールを取る場合は、5×RT Master Mix の代わりに、5×RT Master Mix no-RT Control を用います。逆転写(－)のコントロールを取ることによって、シグナルが cDNA に由来するか否かを確認することができます。

*2 50 nM で良好な結果が得られない場合は、RT プライマー濃度を 20nM から 100nM を目安にご検討ください。

*3 必要に応じて適宜スケールアップすることも可能です。

*4 本キットには添付されていません。各自設計頂くか、TaqMan® MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific® 社)などをご使用になれます。

(2)逆転写反応

反応液を軽く撹拌して均一にした後、以下の温度でインキュベートします。

16℃, 30min.
42℃, 5min.　（逆転写反応）
95℃, 5min. ・・・・・・・・・・ (酵素失活反応)
4℃, hold

反応終了後は、4℃または-20℃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*1。

*1 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 10%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、正確な定量ができないことがあります。

2. 培養細胞をご使用の場合（Code No. MIR-201）

（*SuperPrep*® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. MIR-201)をご使用の場合）

(1)細胞の回収

①細胞数を計測し、遠心して培地を除去します。

②細胞を PBS(-)で洗浄します。

③細胞が 1×10^7 cells/mL 以下になるように PBS(-)に懸濁します。[*1]

④マイクロチューブに 5μL ずつ分注します。

[*1] 細胞が多すぎると、不十分な溶解や RT-PCR の阻害、ゲノム DNA の不十分な分解につながる可能性があります。本試薬では、1×10^1～7×10^4 cells の細胞サンプルを処理することが可能ですが、細胞の種類によって多少異なります。10^4 cells を目安としていただくか、予備実験で上限を確認いただくことをお勧めします。

(2)細胞溶解

①必要量の Lysis Solution に RNase Inhibitor 及び gDNA Remover を添加します。下表を参考に、必要量より若干の余分量をみて調製してください。マルチチャンネルピペットをご使用時は 10%程度の余分量をみて調製してください。

	1 反応	10 反応	96 反応
Lysis Solution	58.7μL	587μL	5635.2μL
RNase Inhibitor	1μL	10μL	96μL
gDNA Remover	0.3μL	3μL	28.8μL

※①の混合液は実験ごとに調製し、RNase Inhibitor 及び gDNA Remover を添加した Lysis Solution の保存は避けてください。

②(1)-④のマイクロチューブに Lysis Solution(RNase Inhibitor 及び gDNA Remover 含有) 60μL を加えます。

③室温でボルテックスを 10 秒間行い、そのまま室温で 5 分間インキュベートします。インキュベート時間は 10 分間まで延長できます。

④70℃で 2 分間インキュベートします。

⑤マイクロチューブを氷上に移します。

(3)逆転写反応

①氷上にて以下の反応液を調製します。

試薬	40μL 反応 [*4]	最終濃度
5×RT Master Mix [*1]	8μL	1×
RT プライマー[*2]	XμL	50 nM [*3]
ライセート[*5]	8μL	-
Nuclease-free Water	24-XμL	-
合計液量	40μL	

[*1] ここで逆転写(－)のコントロールを取る場合は、5×RT Master Mix の代わりに、5×RT Master Mix no-RT Control を用います。逆転写(－)のコントロールを取ることによって、シグナルが cDNA に由来するか否かを確認することができます。

[*2] 本キットには添付されていません。各自設計頂くか、TaqMan® MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific®社)などをご使用になれます。

[*3] 50 nM で良好な結果が得られない場合は、RT プライマー濃度を 20nM から 100nM を目安にご検討ください。

[*4] 必要に応じて適宜スケールアップすることも可能です。

[*5] RT 反応は 20～40μL 反応系にライセートを 20%容量(40μL の場合、ライセート 8μL)添加することをお勧めいたしますが、細胞種によって 15%容量(40μL の場合、ライセート 6μL)添加に変更することで、定量性が改善する場合があります。

②反応液を軽く撹拌して均一にした後、以下の温度でインキュベートします。

16℃, 30min.
42℃, 5min.　（逆転写反応）
95℃, 5min. ・・・・・・・・・・ (酵素失活反応)
4℃, hold

③反応終了後は、4℃または-20℃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[*1]。

[*1] 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 10%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、正確な定量ができないことがあります。

3. 精製した細胞外小胞をご使用の場合（Code No. MIR-201）

（*SuperPrep*® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. MIR-201)をご使用の場合）

(1)テンプレートの調製

①必要量の Lysis Solution に RNase Inhibitor 及び gDNA Remover を添加します。下表を参考に、必要量より若干の余分量をみて調製してください。マルチチャンネルピペットをご使用時は 10%程度の余分量をみて調製してください。

	混合比
Lysis Solution	58.7
RNase Inhibitor	1
gDNA Remover	0.3

※①の混合液は実験ごとに調製し、RNase Inhibitor 及び gDNA Remover を添加した Lysis Solution の保存は避けてください。

②精製された細胞外小胞画分 5μL に対して、Lysis Solution(RNase Inhibitor 及び gDNA Remover 含有)を 10μL 混合します。[*1]

[*1] 細胞外小胞画分：Lysis Solution＝1:2 で混合してください。良好な結果が得られない場合は、1:1 から 1:10 までを目安にご検討ください。

③ピペッティングまたはボルテックスを行い、そのまま室温で 5 分間インキュベートします。インキュベート時間は 10 分間まで延長できます。

④70℃で 2 分間インキュベートします。

⑤マイクロチューブを氷上に移します。

(2)逆転写反応

①氷上にて以下の反応液を調製します。

試薬	20μL 反応 [*4]	最終濃度
5×RT Master Mix [*1]	4μL	1×
RT プライマー[*2]	XμL	50 nM [*3]
ライセート	4μL	-
Nuclease-free Water	12-XμL	-
合計液量	20μL	

*1 ここで逆転写(－)のコントロールを取る場合は、5×RT Master Mix の代わりに、5×RT Master Mix no-RT Control を用います。逆転写(－)のコントロールを取ることによって、シグナルが cDNA に由来するか否かを確認することができます。

*2 本キットには添付されていません。各自設計頂くか、TaqMan® MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific®社)などをご使用になれます。

*3 50 nM で良好な結果が得られない場合は、RT プライマー濃度を 20nM から 100nM を目安にご検討ください。

*4 必要に応じて適宜スケールアップすることも可能です。

②反応液を軽く撹拌して均一にした後、以下の温度でインキュベートします。

16℃,	30min.	(逆転写反応)
42℃,	5min.	
95℃,	5min.	(酵素失活反応)
4℃,	hold	

③反応終了後は、4℃または-20℃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*1。

*1 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 10%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、正確な定量ができないことがあります。

[5] リアルタイム PCR(例)

リアルタイム PCR は、ご使用になる試薬や機器の取扱説明書をご参照ください。通常、10%容量を目安に cDNA をご使用いただくことで、再現性の高いリアルタイム PCR 反応が可能です。ご使用のリアルタイム PCR 試薬によっては最適な鋳型量が異なる場合もありますので、予備実験を実施していただくことをお勧めします。以下に弊社試薬を用いた例をご紹介いたします。

1. THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix (Code No. QPX-101)をご使用の場合

詳細は THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix の取扱説明書をご参照ください。

(1)反応液の調製

TaqMan® Probe を用いた 20μL および 50μL 反応時の調製例を示します。用いるリアルタイム PCR 装置の特性に合わせ、適宜反応液量を増減させてください。

試薬	20μL 反応	50μL 反応	最終濃度
滅菌水	XμL	XμL	
THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix	10μL	25μL	1×
Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3μM[*1]
Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3μM[*1]
TaqMan® probe	4pmol	10pmol	0.2μM[*2]
50×ROX Reference dye	0.4 /0.04μL[*3]	1/0.1μL[*3]	1×/0.1×[*3]
(Uracil-N-Glycosylase)	0.4unit[*4]	1unit[*4]	
cDNA 溶液	~2μL	~5μL	
合計液量	20μL	50μL	

[*1] 0.3μM で良好な結果が得られない場合は、0.2μM から 0.5μM を目安にご検討ください。

[*2] 0.2μM で良好な結果が得られない場合は、0.2μM から 0.4μM を目安にご検討ください。

[*3] Applied Biosystems®製機器やアジレント・テクノロジーズ社製機器などではウェル間の蛍光強度および分注誤差補正のためにパッシブリファレンスを使用します。これらの機器での反応の際には、ROX Reference dye を添加してください。 最適な添加量は機種により異なります。主な機器の添加量は表 1 の通りです。また、補正を行わない機器では添加する必要はありません。

[*4] Uracil-N-Glycosylase (UNG)処理を実施する場合、熱感受性(heat-labile) UNG を使用してください。
別売りの Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (Code No. UNG-101)をご使用になれます。

表 1：主な機器の最適な ROX Reference dye 濃度

機器	最終濃度（添加量）
Applied Biosystems® 7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™など	1×（1/50 量）
Applied Biosystems® 7500、7500Fast、QuantStudio®、アジレント・テクノロジーズ機器（オプション）など	0.1×（1/500 量）
ロシュ機器、バイオラッド機器、キアゲン機器など	不要

(2)PCR サイクル条件設定(例)

ステップ		温度	時間	昇降速度
(UNG 反応)		(20～25℃*1)	(10 分*1)	(最大)
初期変性		95℃	20 秒	最大
PCR	変性	95℃	5 秒	最大
(40～45cycles)*2	伸長(アニーリング)	60℃	30 秒	最大

*1 UNG 処理を行う場合(UNG は本製品中には含まれません。別売の Uracil-DNA Glycosylase(UNG),Heat-labile(Code No. UNG-101)がご使用になれます。)、初期変性の前に、UNG 反応のステップを設定してください。上記の表に一般的な温度条件および反応時間を示しましたが、各社の推奨条件に従って調製してください。

*2 サイクル数は 40 サイクルで実施し、増幅が不十分な場合は 45 サイクルまで上げてください。

2. THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix (Code No. QPX-201)をご使用の場合

詳細は THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix の取扱説明書をご参照ください。

(1)反応液の調製

以下に、20μL および 50μL 反応時の調製例を示します。用いるリアルタイム PCR 装置の特性に合わせ、適宜反応液量を増減させてください。

試薬	20μL 反応	50μL 反応	最終濃度
滅菌水	XμL	XμL	
THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix	10μL	25μL	1×
Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3μM[*1]
Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3μM[*1]
(Uracil-N-Glycosylase)	0.4unit[*2]	1unit[*2]	
cDNA 溶液	~2μL	~5μL	
合計液量	20μL	50μL	

[*1] 増幅効率が不十分な場合は、プライマー濃度を増やすことで、また非特異反応が発生する場合は、プライマー濃度を減らすことで、反応結果が改善することがあります。プライマー濃度は、最終濃度 0.2μM から 0.6μM を目安にご検討ください。

[*2] Uracil-N-Glycosylase 処理を実施する場合、熱感受性(heat-labile) UNG を使用してください。
別売りの Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (Code No. UNG-101)をご使用になれます。

(2)PCR サイクル条件設定(例)

ステップ		温度	時間	昇降速度
(UNG 反応)		(20～25℃[*1])	(10 分[*1])	(最大)
初期変性		95℃	30 秒	最大
PCR	変性	95℃	5 秒	最大
(40～45cycles)[*2]	伸長(アニーリング)	60℃	30 秒	最大

[*1] UNG 処理を行う場合(UNG は本製品中には含まれません。別売の Uracil-DNA Glycosylase(UNG),Heat-labile(Code No. UNG-101)がご使用になれます。)、初期変性の前に、UNG 反応のステップを設定してください。上記の表に一般的な温度条件および反応時間を示しましたが、各社の推奨条件に従って調製してください。

[*2] サイクル数は 40 サイクルで実施し、増幅が不十分な場合は 45 サイクルまで上げてください。

[6] 実施例

1. 検出原理

本試薬は、ループ状の構造を持つ RT プライマーを使用し、miRNA を逆転写する際、アダプターを付加する形で鎖長を伸ばし、リアルタイム PCR での検出を可能にする原理を用いています[参考文献 1]。RT プライマーは miRNA 特異的となりますので、他原理と比較して、高い特異性があります[図 1]。

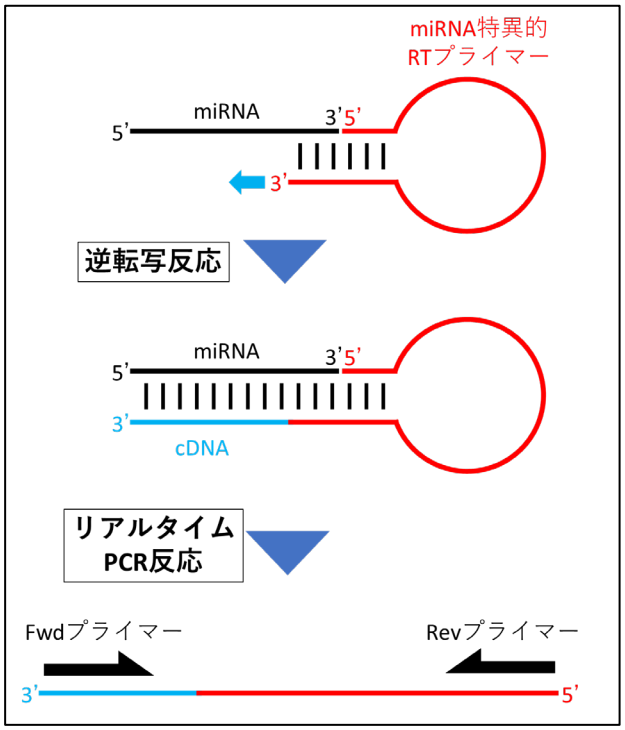


図 1 本試薬の検出原理

2. 高い特異性と広いダイナミックレンジ

＜方法＞

miRNAssay™ qPCR RT Master Mix(Code No. MIR-101)を用いて、HeLa Total RNA 1pg から 100ng において miRNA の一種である let-7a について cDNA 合成反応(10μL 反応系)を行い、弊社リアルタイム PCR 試薬の THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix(Code No. QPX-201)を用いてリアルタイム PCR による解析を行いました(持ち込み量 5%)。同様に A 社逆転写試薬を用いて、let-7a について cDNA 合成反応を行い、リアルタイム PCR 解析を行いました。実験の際に用いたプライマーの配列は下記に示します[参考文献 2]。

RT プライマー

CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACTATAC

リアルタイム PCR 用 Forward プライマー

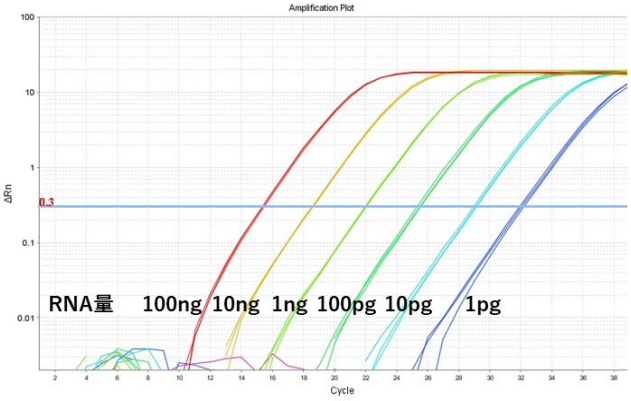
CCAGCTGGGTGAGGTAGTAGGTTGT

リアルタイム PCR 用 Reverseプライマー

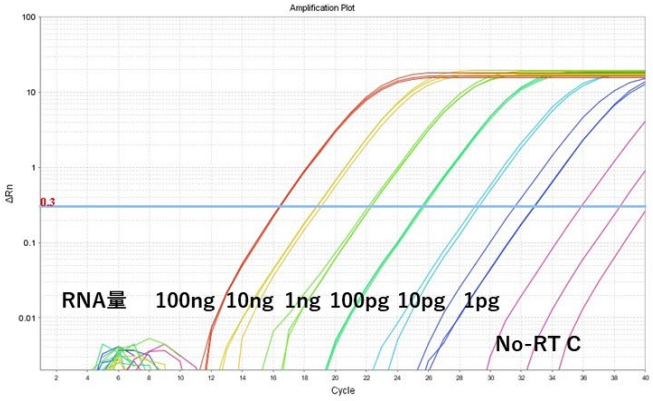
CTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATT

＜結果＞

miRNAssay™ qPCR RT Master Mix(Code No. MIR-101)を用いて合成した cDNA を使用した場合



A 社逆転写試薬を用いて合成した cDNA を使用した場合



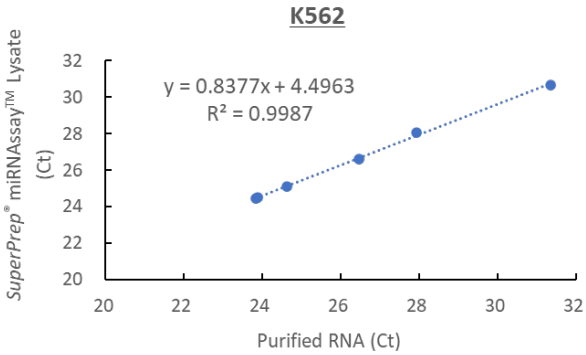
その結果、miRNAssay™ qPCR RT Master Mix(Code No. MIR-101)では、RT(－)のコントロールである No-RT Control にて増幅シグナルは検出されず、他社試薬よりも特異性が高いことが分かりました。また、テンプレート量に応じた増幅シグナルの間隔が 1pg から 100ng まで均一であり、広い範囲で逆転写が可能であることが分かりました。

3. 培養細胞と精製 RNA との比較

＜方法＞

SuperPrep® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. MIR-201)を用いて K562（ヒト慢性骨髄性白血病細胞株）、HepG2（ヒト肝癌由来細胞株）、A431（ヒト上皮様細胞癌由来細胞株）、Jurkat（ヒト白血病 T 細胞由来細胞株）、HeLa（ヒト子宮頚部癌由来細胞株）5×10^4 cells から細胞ライセートを調製した後、cDNA 合成反応を行いました。また同時に、各細胞種から RNA を精製し、Total RNA 10ng から miRNAssay™ qPCR RT Master Mix(Code No. MIR-101)を用いて 6 種類の miRNA をターゲットに cDNA 合成反応を行いました。それぞれの cDNA を鋳型に、THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix(Code No. QPX-201)を用いて、合成した 6 種類の cDNA について、リアルタイム PCR 解析を行い、比較しました。

＜結果＞



細胞種	相関係数
K562	0.99
HepG2	0.99
A431	0.99
Jurkat	0.97
HeLa	0.99

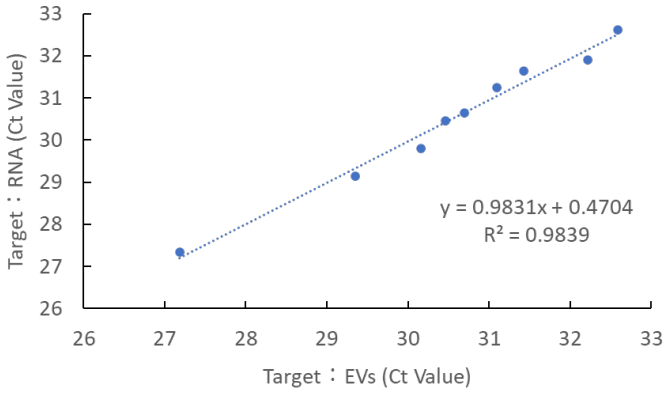
6 種類のターゲット及び 5 種類の細胞種に対して、ライセートから調製した cDNA と精製 RNA から調製した cDNA との間で高い相関性が認められました。このことから、本キットを用いることで、煩雑な RNA 精製を行うことなく、リアルタイム PCR による miRNA 発現解析を行えることが分かります。

4. 細胞外小胞と精製 RNA との比較

＜方法＞

48 時間培養した HeLa 細胞の培養上清 20mL を遠心濃縮器（ザルトリウス社)を用いて 1mL まで限外濾過濃縮し、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2（和光純薬社)を用いて細胞外小胞画分(EVs)を単離しました。単離した細胞外小胞画分から microRNA Extractor® SP Kit（和光純薬社)を用いて miRNA を含む RNA を精製しました。精製した RNA を用いて、9 種類の miRNA から cDNA 合成を行い、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix(Code No. QPS-101)を用いて、リアルタイム PCR 解析を行いました。また、同時に細胞外小胞画分から *SuperPrep*® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. MIR-201)を用いてライセートを調製後、9 種類の miRNA に対して cDNA 合成反応を行い、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix(Code No. QPS-101)を用いて、リアルタイム PCR 解析を行いました。

＜結果＞



9 種類のターゲットに対して、細胞外小胞画分から直接調製した cDNA と精製 RNA から調製した cDNA との間で、高い相関性が認められました。このことから、本キットを用いることで、煩雑な RNA 精製を行うことなく、リアルタイム PCR による miRNA 発現解析を行えることが分かります。

[7] トラブルシューティング

miRNAssay™ qPCR RT Master Mix(Code No. MIR-101)

現象	原因	対策
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	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	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勧めします。
	RNA の量が少なすぎる、あるいは多すぎる	本製品では、およそ 1pg から 100ng までの RNA (10μL 反応系)を用いた場合に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 の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。
	ターゲットの発現量が低すぎる、あるいは多すぎる	本製品では、逆転写反応時にターゲットとする miRNA のみを逆転写します。そのため、ターゲットの発現量によって最適な RNA 量が変動する可能性があります。鋳型 RNA 量を増減させ、予備検討を行ってください。
	逆転写反応液の添加量が多すぎる	本製品では、逆転写反応液をリアルタイム PCR 反応液へ最大 10%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、使用するリアルタイム 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。
	RT プライマーが適切でない	RT プライマーの設計が適切でない可能性があります。参考文献 3, 4 を参照して設計いただくか、市販品の TaqMan® MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific®社)をご使用になることをお勧めします。
リアルタイム PCR で no-RT Control を用いた反応液に増幅が見られる	プライマーダイマーの発生	融解曲線分析において、no-template Control のピークが標的配列よりも低温側に存在する場合は、プライマーダイマーの発生が疑われます。プライマーダイマーは、プライマー配列の他、プライマーの品質不良によっても発生する可能性があります。まず、PCR 反応条件の再検討を行い、改善が見られない場合には、プライマーの再設計や再合成を検討してください。また、再合成の際は、精製グレードを HPLC 以上にしてください。

SuperPrep® miRNAssay™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(Code No. MIR-201)

現象	原因	対策
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	細胞数が多すぎる	過剰の細胞由来成分により RT 反応や qPCR 反応が阻害される場合があります。溶解する細胞数を減少させてください。
	RNA が分解している	・細胞の種類によっては RNase の活性が強く、ライセート中の RNase を完全に失活できない場合があります。このような細胞では、Lysis Solution 添加を行い、室温・70℃でのインキュベート後、ライセートを氷上に移し、速やかに RT 反応を行い、cDNA 化することをお勧めいたします。 ・ライセートを保存する場合は−80℃で凍結し、凍結融解はできる限り少なくしてください。 ・細胞は用時調製したものをご使用ください。アッセイ用に凍結保存しておく場合は、培養後、PBS(−)で洗浄した細胞から PBS(−)を除去し、−80℃で凍結してください。
	逆転写反応液の添加量が多すぎる	・本製品の RT 反応液を qPCR 反応液へ最大 10%添加しても直線性には問題ないことを確認していますが、使用する qPCR 試薬の性質によっては、この許容量が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。 ・本製品以外の RT 試薬をご使用の場合、リアルタイム PCR 試薬への持込許容量が変わる可能性があります。予備実験をしてご使用ください。
	RT プライマーが適切でない	RT プライマーの設計が適切でない可能性があります。参考文献 3, 4 を参照して設計いただくか、市販品の TaqMan® MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific®社)をご使用になることをお勧めします。
定量性が低い	細胞溶解が不十分	Lysis Solution 添加後に攪拌ムラが生じないように十分攪拌してください。

[8] 関連商品

リアルタイム PCR 試薬

品名	内容	Code No.
SYBR™ Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 **THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix**	1mL×1 本 (100 回用 /20 μL 反応)	QPX-201T
	1.67mL x 3 本 (500 回用 /20 μL 反応)	QPX-201
各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出用リアルタイム PCR 試薬 **THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix**	1mL×1 本 (100 回用 /20 μL 反応)	QPX-101T
	1.67mL x 3 本 (500 回用 /20 μL 反応)	QPX-101

キャリーオーバー対策・偽陽性防止用試薬

品名	内容	Code No.
熱感受性(Heat-labile) UNG **Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile**	200 U	UNG-101

SuperPrep® シリーズ

品名	内容	Code No.
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**	100 回用	SCQ-101
リアルタイム PCR 用細胞溶解液（培養細胞用） ***SuperPrep®* Cell Lysis Kit for qPCR**	100 回用	SCQ-201
リアルタイム PCR 用細胞溶解&cDNA 合成キット（培養細胞用） ***SuperPrep®* II Cell Lysis & RT Kit for qPCR**	100 回用	SCQ-401
リアルタイム PCR 用細胞溶解液（培養細胞用） ***SuperPrep®* II Cell Lysis Kit for qPCR**	100 回用	SCQ-501

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください
https://lifescience.toyobo.co.jp/

[9] 参考文献

参考文献 1
Caifu Chen, Dana A. Ridzon, Adam J. Broomer, Zhaohui Zhou, Danny H. Lee, Julie T. Nguyen, Maura Barbisin, Nan Lan Xu, Vikram R. Mahuvakar, Mark R. Andersen, Kai Qin Lao, Kenneth J. Livak and Karl J. Guegler
「Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR」
Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, No. 20

参考文献 2
YILIN WANG, JIANWEN ZHOU, YANLIAN CHEN, CHUNHUA WANG, ENYIN WU, LIANG FU and CHEN XIE
「Quantification of distinct let-7 microRNA family members by a modified stem-loop RT-qPCR」
MOLECULAR MEDICINE REPORTS 17: 3690-3696, 2018

参考文献 3
Martha F. Kramer
「STEM-LOOP RT-qPCR for miRNAS」
Curr Protoc Mol Biol. 2011 July ; CHAPTER: Unit15.10.

参考文献 4
Zsolt Czimmerer, Julianna Hulvely, Zoltan Simandi, Eva Varallyay, Zoltan Havelda, Erzsebet Szabo, Attila Varga, Balazs Dezso, Maria Balogh, Attila Horvath, Balint Domokos, Zsolt Torok, Laszlo Nagy, Balint L. Balint
「A Versatile Method to Design Stem-Loop Primer-Based Quantitative PCR Assays for Detecting Small Regulatory RNA Molecules」
PLoS One. 2013;8(1):e55168.

TOYOBO

【製造・販売元】

－価格・在庫に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部（大阪）
〒530-0001　大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　バイオプロダクト営業部（東京）
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号　住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819　FAX 03-6887-8951
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 （土日祝日、休日を除く）
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ https://lifescience.toyobo.co.jp/