



RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit
([Code No. RMD-201, RMD-201T](#))

取扱説明書

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

TOYOBO

—目次—

[1]	はじめに	2
[2]	製品内容	3
[3]	製品のほかに用意するもの	3
[4]	使用方法	4
	1. 細胞溶解または RNA 希釈	4
	2. 熱変性反応	7
	3. ゲノム除去反応	8
	4. cDNA 合成および増幅反応(RT-RamDA [®])	8
[5]	実施例	10
[6]	トラブルシューティング	11
[7]	関連製品	12
[8]	参考文献	13

—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・臨床用試薬としては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。

※RamDA-seq[®]、RT-RamDA[®]、Shin-RamDA-seq[®]は国立研究開発法人理化学研究所の登録商標です。

※その他の登録商標または商標は各所有者に帰属します。

[1] はじめに

RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit はシングルセルや微量の RNA から cDNA を調製することが可能です。本キットで調製した cDNA はリアルタイム PCR の鋳型として使用することができ、高感度に遺伝子発現解析を行うことができます。

本キットでは Reverse Transcription with Random Displacement Amplification (RT-RamDA[®]) 法^{参考文献(1)}を採用しています。RT-RamDA[®]法は逆転写酵素の鎖置換活性を利用した新規 cDNA 増幅方法であり、poly(A) RNA だけでなく、non-poly(A)由来の cDNA の高感度な検出が可能です。このため RT-RamDA[®]法では従来技術に比べ検出遺伝子が多いことが特長です。

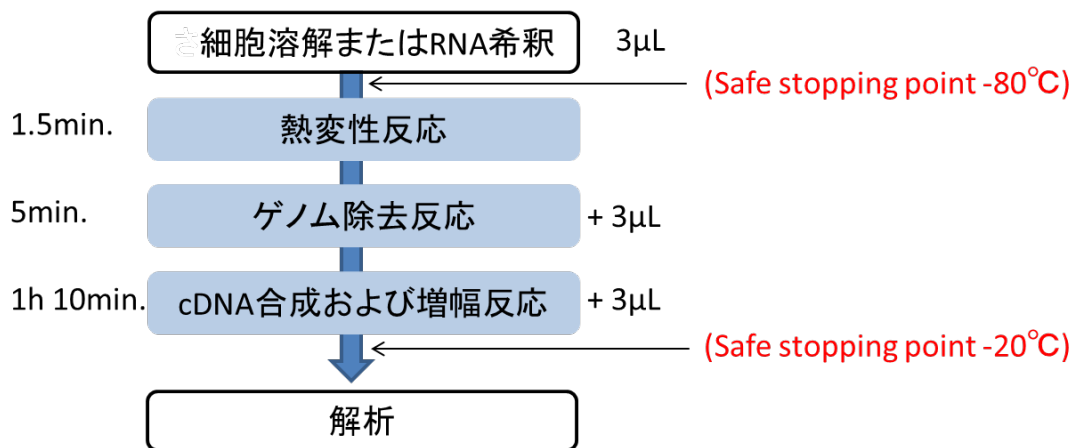


図 1. 本キットのワークフロー

◆本キットの特長◆

1. シングルセルや微量 RNA から cDNA 調製可能

1~100 細胞 または 10pg~1ng total RNA

2. RNA 全長をカバーした解析が可能

10kb 以上のターゲット RNA の全長をリードでカバーできる cDNA を調製可能

3. 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[®] qPCR Mix (Code: QPS-101, QPS-201)、KOD SYBR[™] qPCR Mix (Code: QKD-201)等 を使用することができます。

[2] 製品内容

本キットには、以下の試薬が含まれております。試薬は-20℃で保存してください。

RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit (Code:RMD-201,RMD-201T)

試薬名	保存	容量 (RMD-201)	容量 (RMD-201T)
①Lysis Buffer	-20℃	480μL	120μL
②Lysis Enhancer	-20℃	108μL	27μL
③RNase Inhibitor	-20℃	22μL	6μL
④Nuclease free water	-20℃	960μL	240μL
⑤RT-RamDA [®] Buffer	-20℃	240μL	60μL
⑥RT-RamDA [®] Enzyme Mix	-20℃	54μL	14μL
⑦RT-RamDA [®] Primer Mix	-20℃	54μL	14μL
⑧gDNA Remover	-20℃	54μL	14μL

—注意事項—

本キットに含まれる試薬の中には、弊社より販売している別キット、GenNext[®] Shin-RamDA-seq[®] Single Cell Kit (Code: RML-101)、QuantAccuracy[®], RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit (Code: RMQ-101)などと名称が同一の試薬が含まれますが、別キットによる試薬の代替はできませんのでご注意ください。

本キットでは微量のサンプルから cDNA の増幅、ライブラリー調製を行うため、作業工程中で環境中の DNA などが混入すると、実験結果が著しく損なわれる可能性があります。清浄度の高い部屋で作業を行うなど、コンタミネーション対策には十分注意してください。

[3] 製品のほかに用意するもの

本キットのほかに、以下の機器・試薬類をご用意ください。

- ・ サーマルサイクラーまたはインキュベーター
ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従ってください。
- ・ リアルタイム PCR 装置及びリアルタイム PCR 用試薬
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

- 全ステップにおいて、試薬の添加後はピペットやミキサー、タッピング等で十分に攪拌を行ってください。

【参考】

試薬添加→遠心→攪拌(ミキサー: 2000 rpm、4°C、1 min)→遠心

試薬添加→攪拌(ピペッティング: 20回 on ice)→遠心 など

- 本キットは細胞または精製済みの total RNA を使用することができます。FACS を用いて細胞を取得する場合はセクション 1. A、FACS 以外の方法にて細胞を取得する場合はセクション 1. B、精製済みの total RNA を使用する場合はセクション 1. C から始めてください。その後、セクション 2. 熱変性反応ステップに進んでください。

サンプル		細胞溶解 / RNA 希釈	熱変性反応～
細胞	FACS	セクション 1. A	セクション 2.
	FACS 以外	セクション 1. B	
精製 RNA		セクション 1. C	

1. 細胞溶解または RNA 希釈 (Cell lysis or RNA dilution)

A. FACS を用いて細胞取得を行う場合

- 細胞溶解に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に必要量より余分量をみて調製してください。

細胞溶解液の調製

	1 反応(μL)	20 反応(μL) [※]	100 反応(μL) [※]
①Lysis Buffer	2	44	220
②Lysis Enhancer	0.45	9.9	49.5
③RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
④Nuclease free water	0.5	11	55
Total	3	66	330

※余分量を 10%とした場合

- 96well プレートまたは 8 連チューブに細胞溶解液を 1well あたり 3μL 分注します。分注は氷上にて行い、分注後すぐに qPCR 用シールや熱圧着式シールにてシーリングを行ってください。
- ソーティングまでプレートを氷上または 4°Cにて保管を行い、ご使用の FACS の取扱説明書や推奨するパラメーターに従い、細胞ソーティングを実施してください。
- ソーティング後、シーリングを行い、遠心を行ってください。

(5) その後、すみやかに次のステップに進むか、-80℃にてサンプルを保管してください。

B. FACS 以外で細胞取得を行う場合

1 サンプルあたり、細胞溶解サンプル 3μL を調製します。マニュアルピッキングなどで細胞を分取する際は、細胞溶解液 2.5μL に 0.5μL の細胞サンプルを添加します。細胞溶解が不十分となるため、細胞とともに持ち込まれる PBS などの持込液量は 0.5μL 以下としてください。

(1) 以下を参考に細胞溶解液をチューブに調製します。(細胞サンプルが 0.5μL 未満の場合、細胞溶解液に Nuclease free water を加え、調整してください)

細胞溶解液の調製

例) 細胞サンプルの液量が 0.5μL の場合

	1 反応(μL)	20 反応(μL)※	100 反応(μL)※
① Lysis Buffer	2	44	220
② Lysis Enhancer	0.45	9.9	49.5
③ RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
Total	2.5	55	275

※余分量を 10%とした場合

例) 細胞サンプルの液量が 0.5μL 未満(xμL)の場合

	1 反応(μL)	20 反応(μL)※	100 反応(μL)※
① Lysis Buffer	2	44	220
② Lysis Enhancer	0.45	9.9	49.5
③ RNase Inhibitor	0.05	1.1	5.5
④ Nuclease free water	0.5-x	(1-x)X22	(1-x)X110
Total	3-x	(3-x)X22	(3-x)X110

※余分量を 10%とした場合

(2) 96well プレートまたは 8 連チューブに細胞溶解液を 1well あたり 2.5μL 分注します。分注は氷上にて行い、分注後すぐにシーリングを行い、遠心してください。

(3) 細胞サンプルの添加までプレートを氷上または 4℃にて保管を行い、細胞取得機器のマニュアルに従い、細胞サンプルの添加を行ってください。

(4) 細胞サンプルの添加後、シーリングを行い、遠心を行ってください。

(5) その後、すみやかに次のステップに進むか、-80℃にてサンプルを保管してください。

C. 精製済みの total RNA を使用する場合

次工程に total RNA を 10pg~1ng (3 μ L)インプットするため、RNA 溶液を調製します。RT-RamDA による増幅反応に必要なになりますので、全てのパーツを用いて RNA 希釈液を調製してください。

- (1) 以下を参考に予め RNA 希釈液を必要量チューブに調製し、その後 RNA 液を添加してください。(Nuclease free water の添加量を調整し、液量を 3 μ L/1 反応に合わせてください。またインプットする RNA の推奨量は 10pg~1ng 程度です。使用する RNA 液が高濃度の場合は、予め RNase フリーの滅菌水や TE 緩衝液で RNA 液を希釈してください。)

滅菌水や TE 緩衝液に RNA を溶解した場合、RNA 液を 0.5 μ L/1 反応までアプライできます。

RNA 溶液の調製

	1 反応(μ L)
①Lysis Buffer	2
②Lysis Enhancer	0.45
③RNase Inhibitor	0.05
④Nuclease free water	1-x
RNA 液	x(~0.5)
Total	3

または RNA 希釈液を先に調製し、RNA を希釈することもできます。この場合、まず以下を参考に RNA 希釈液を必要量チューブに作製してください。この RNA の希釈液を用いて、3.3~333 pg/ μ L となるように RNA を希釈してください。

尚、希釈後の RNA 溶液中の RNA 希釈液が 90%以上となるように希釈してください。

RNA 希釈液の調製

	100 反応(μ L) ※
①Lysis Buffer	220
②Lysis Enhancer	49.5
③RNase Inhibitor	5.5
④Nuclease free water	55
Total	330

※余分量を 10%とした場合

RNA 希釈例)

1ng Input を行う場合 (333pg/ μ L total RNA 溶液)

	(μ L)	RNA 希釈液 終濃度
10ng/ μ L total RNA	1	
RNA 希釈液	29	97%
Total	30	

10pg Input を行う場合 (3.3pg/ μ L total RNA 溶液)

	(μ L)	RNA 希釈液 終濃度
333pg/ μ L total RNA	1	
RNA 希釈液	99	99%
Total	100	

- (2) 96well プレートまたは 8 連チューブに希釈した RNA 溶液を 1well あたり 3 μ L 分注します。
- (3) 分注後、シーリングを行い、遠心を行ってください。
- (4) その後、すみやかに次のステップに進むか、-80 $^{\circ}$ Cにてサンプルを保管してください*。

*-80 $^{\circ}$ Cで保存する場合は、分注後の 3 μ L の状態で保存してください。低濃度の状態で長期間保存し再度分注を行う場合、チューブ等への吸着により RNA をロスする恐れがあります。

2. 熱変性反応 (Denature)

- (1) サンプルプレートやチューブを 4 $^{\circ}$ Cにて遠心を行い、以下の温度でインキュベートしてください。

凍結サンプルを使用する場合は熱変性反応前に 4 $^{\circ}$ Cにて融解し、遠心した後に熱変性反応に進んでください。

熱変性反応

Step	Temperature	Time
Denature	74 $^{\circ}$ C	1.5min.
	4 $^{\circ}$ C	hold

3. ゲノム除去反応 (Digestion of genomic DNA)

RT-RamDA による増幅反応に必要なになりますので、ゲノム除去反応はスキップせず必ず実施して下さい。

- (1) ゲノム除去反応に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製して下さい。

* ERCC RNA 等コントロール RNA を使用する場合は④Nuclease free water の添加量を調整して下さい。

ゲノム除去反応液の調製

	1 反応(μL)	20 反応(μL) *	100 反応(μL) *
⑤RT-RamDA® Buffer	0.3	6.6	33
⑧gDNA Remover	0.45	9.9	49.5
④Nuclease free water *	2.25	49.5	247.5
Total	3	66	330

※余分量を 10%とした場合

- (2) 熱変性反応を行った 96well プレートまたは 8 連チューブにゲノム反応液を 1well あたり 3μL 添加し、遠心後、以下の温度でインキュベートして下さい。

ゲノム除去反応

Step	Temperature	Time
Genomic DNA digestion	30°C	5min.
	4°C	hold

- (3) ゲノム反応後、すみやかに次のステップに進んでください。

4. cDNA 合成および増幅反応 (RT-RamDA®)

- (1) RT-RamDA®反応に必要な試薬をチューブに作製します。以下を参考に調製して下さい。

* NSR Primer を使用する場合は⑦RT-RamDA® Primer Mix の代わりに 1st NSR Primer Mix for human または 1st NSR Primer Mix for mouse を使用して下さい。

RT-RamDA[®]反応液

	1 反応(μL)	20 反応(μL) ※	100 反応(μL) ※
⑤RT-RamDA [®] Buffer	1.5	33	165
⑥RT-RamDA [®] Enzyme Mix	0.45	9.9	49.5
⑦RT-RamDA [®] Primer Mix*	0.45	9.9	49.5
④Nuclease free water	0.6	13.2	66
Total	3	66	330

※余分量を 10%とした場合

- (2) ゲノム除去反応を行った 96well プレートまたは 8 連チューブに RT-RamDA[®]反応液を 1well あたり 3μL 添加し、遠心後、以下の温度でインキュベートしてください。

RT-RamDA[®]反応

Step	Temperature	Time
Priming 1	25°C	10min.
Priming 2	30°C	10min.
Reverse transcription and amplification	37°C	30min.
	50°C	5min.
Inactivation	98°C	5min.
	4°C	hold

- (3) RT-RamDA[®]反応後、すみやかに次のステップに進むか、-20°C~-30°Cにて保管してください。
- (4) 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。

RT-RamDA[®]反応液(9μL)の 1/10~1/25(0.9~0.36μL)を鋳型量としてください。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。

例) 1/25 量を鋳型量とする場合

	(μL)
RT-RamDA [®] 反応液	9
Nuclease free water	41
Total	50

希釈した反応液 2μL をリアルタイム PCR の鋳型として使用してください。

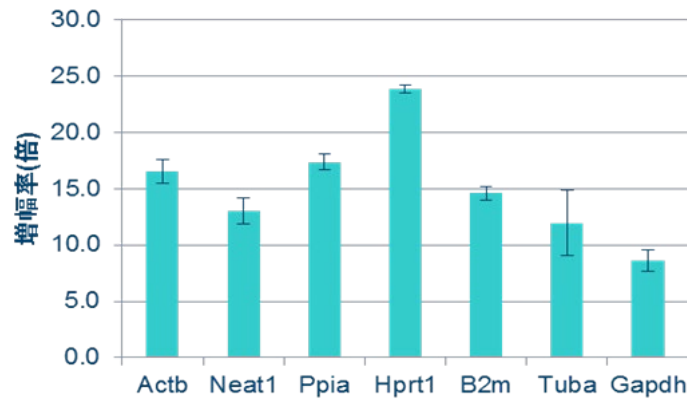
[5] 実施例

1. 従来の逆転写反応との cDNA 量比較

<方法>

NIH3T3 細胞から抽出した Total RNA 10pg を用いて RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit (Code: RMD-201)と従来の逆転写反応試薬である ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code: FSQ-301)を用いて、cDNA 合成を行いました。その後、それぞれの cDNA を鋳型に THUNDERBIRD[®] SYBR[™] qPCR Mix (Code: QPS-201)を用いて 7 種類の House Keeping Gene についてリアルタイム PCR 解析を行い比較しました。Ct 値から算出される RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit の cDNA 量を従来の逆転写反応の cDNA で割った際の数値を増幅率として算出しました。

<結果>



従来の逆転写反応試薬を使用した際の cDNA 量に対して RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit では約 10 倍程度の cDNA を得ることが可能です。

[6] トラブルシューティング

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 が分解している	<ul style="list-style-type: none"> ・RNA が分解していないか確認してください。 ・チップやチューブなどに RNase がコンタミしていないか確認してください。 ・細胞溶解や RNA 希釈のステップは氷上にて行ってください。
	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 10pg から 1ng までの RNA を用いた場合に逆転写増幅反応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 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。
	反応温度が不適切	反応条件の変更は、プライマーのアニーリング効率、酵素活性、逆転写反応後の酵素失活など広範囲に影響します。反応温度は必ず本説明書に記載の条件に従って実施してください。
	逆転写反応液の添加量が多すぎる	添加量が多すぎる場合、PCR 反応が阻害される可能性があります。逆転写反応液のリアルタイム PCR 反応液への添加量は、PCR 反応液の液量の 10% 以下にしてください。

[7] 関連製品

品名	内容	Code No.
RT-RamDA®法による NGS 解析用ライブラリー調製キット GenNext® Shin-RamDA-seq® Single Cell Stranded Kit	96 回用	RML-101
	24 回用	RML-101T
次世代シーケンサー解析用 cDNA 合成キット GenNext® RamDA-seq® Single Cell Kit	96 回用*	RMD-101
	24 回用*	RMD-101T
RamDA Cell Lysis Kit	1,152 回用*	RMD-301
NSR Primer Set for human	96 回用*	NSR-101
NSR Primer Set for mouse	96 回用*	NSR-102

*96 well プレーットの 1 well での使用回数になります。

品名	内容	Code No.
イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット GenNext® NGS Library Quantification Kit	500 回用/20 μ L 反応	NLQ-101

リアルタイム PCR 用試薬

品名	内容	Code No.
蛍光プローブ検出用リアルタイム PCR Master Mix THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	1mL × 1 本 (100 回用/20 μ L 反応)	QPS-101T
	1.67ml × 3 本 (500 回用/20 μ L 反応)	QPS-101
	(1.67ml × 3 本) × 5 (500 回用/20 μ L 反応) × 5	QPS-101X5
高効率蛍光プローブ検出用リアルタイム PCR Master Mix THUNDERBIRD® NEXT Probe qPCR Mix	1mL × 1 本 (100 回用/20 μ L 反応)	QPX-101T
	1.67ml × 3 本 (500 回用/20 μ L 反応)	QPX-101
	(1.67ml × 3 本) × 5 (500 回用/20 μ L 反応) × 5	QPX-101X5
長鎖・GC リッチ対応リアルタイム PCR Master Mix KOD SYBR™ qPCR Mix	1mL × 1 本 (100 回用/20 μ L 反応)	QKD-201T
	1.67ml × 3 本 (500 回用/20 μ L 反応)	QKD-201
	(1.67ml × 3 本) × 5 (500 回用/20 μ L 反応) × 5	QKD-201X5

SYBR™ Green I 検出系用リアルタイム PCR Master Mix THUNDERBIRD® SYBR™ qPCR Mix	1mL × 1 本 (100 回用/20 μL 反応)	QPS-201T
	1.67ml × 3 本 (500 回用/20 μL 反応)	QPS-201
	(1.67ml × 3 本) × 5 (500 回用/20 μL 反応) × 5	QPS-201X5
高効率 SYBR™ Green I 検出系用リアルタイム PCR Master Mix THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix	1mL × 1 本 (100 回用/20 μL 反応)	QPX-201T
	1.67ml × 3 本 (500 回用/20 μL 反応)	QPX-201
	(1.67ml × 3 本) × 5 (500 回用/20 μL 反応) × 5	QPX-201X5

[8] 参考文献

- (1) Hayashi .T et al. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. Nature Communications. 9: 619 (2018)

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/>

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 —

東洋紡株式会社 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/>