

***SuperPrep*[®] II**
Cell Lysis & RT Kit for qPCR
(Code No. SCQ-401)

***SuperPrep*[®] II**
Cell Lysis Kit for qPCR
(Code No. SCQ-501)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

—目次—

[1]	はじめに	2
[2]	製品内容	5
[3]	製品のほかに用意するもの	6
[4]	使用方法	7
	1. 細胞ライセートの調製	7
	(1) 96 ウェルプレートで培養された接着細胞の場合	7
	(2) 96 ウェルプレートで培養された浮遊細胞の場合	8
	(3) 96 ウェルプレート以外の容器で培養された細胞の場合	8
	2. 逆転写(RT)反応	9
[5]	リアルタイム PCR(例)	11
	1. THUNDERBIRD [®] Probe qPCR Mix (Code: QPS-101)	11
	2. KOD SYBR [®] qPCR Mix (Code: QKD-201)	13
	3. THUNDERBIRD [®] SYBR [®] qPCR Mix (Code: QPS-201)	15
	4. 他社 qPCR 試薬をご使用の場合	15
	5. 1-step RT-qPCR 試薬をご使用の場合	16
	A. <i>RNA-direct</i> [™] Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-101)	16
	B. THUNDERBIRD [®] Probe One-step qRT-PCR Kit (Code: QRZ-101)	17
	C. <i>RNA-direct</i> [™] SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-201)	18
[6]	実施例	20
[7]	トラブルシューティング	23
[8]	関連製品	24

—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。

[1] はじめに

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)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。本製品をご使用になることで、96 ウェルプレート等で培養した細胞から、逆転写反応の鋳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いただけます。さらに、本キットに含まれるRT Reagents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。

前バージョンではLysis Solutionの後にStop Solutionを添加する必要がありましたがSuperPrep® IIではLysis Solutionでの処理の後に、そのままcDNA合成ステップに移行することができます。また、より幅広い哺乳類細胞から高感度検出が可能になりました。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用の鋳型cDNAの合成が可能です。

SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR (Code: SCQ-501)は、細胞溶解試薬の別売品です。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になれます。

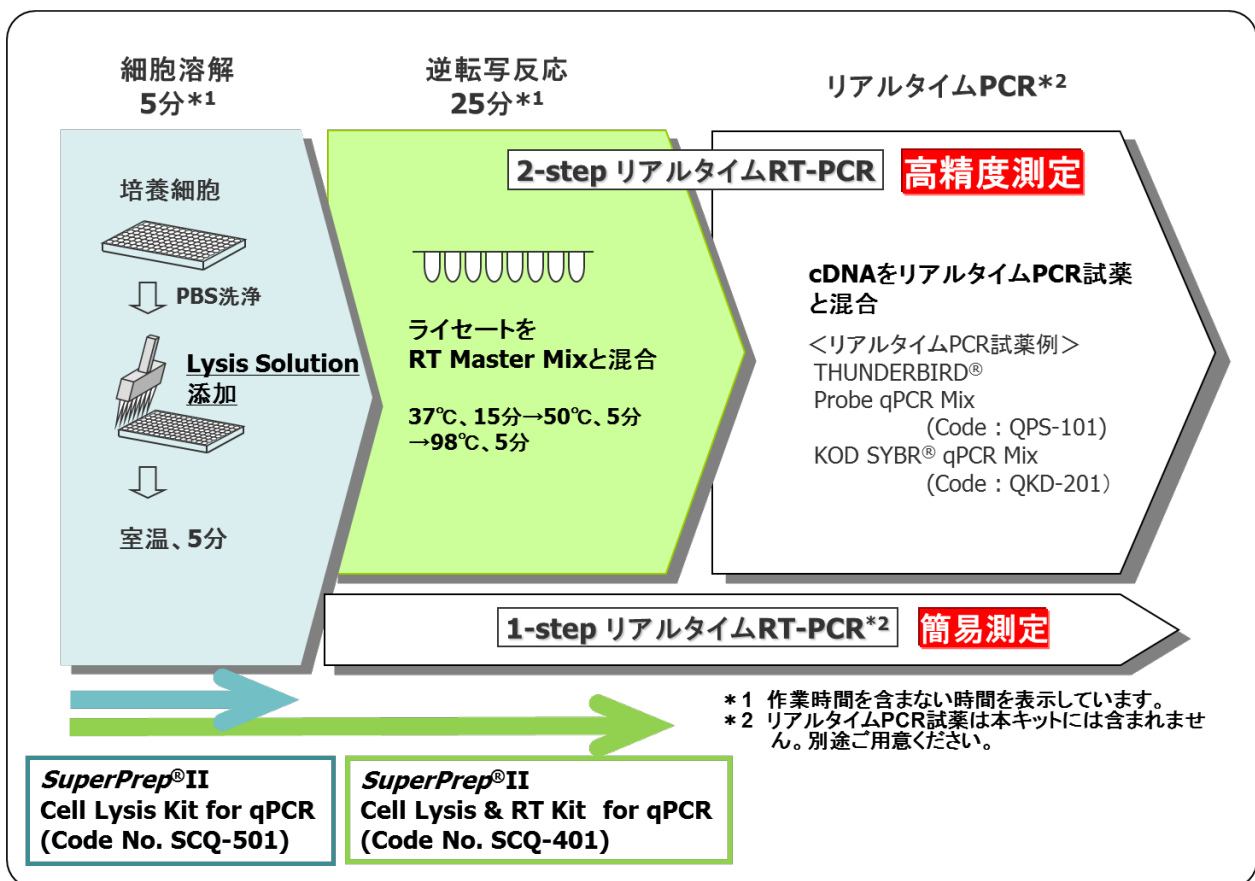


図. 本製品によるリアルタイム PCR 解析フロー

◆本製品の特長◆

1. RNA 精製不要

培養細胞から、逆転写反応の鋳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。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。

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(調製したライセート中の RNA は氷上で 6 時間安定です)。また、gDNA Remover (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。

3. 幅広い哺乳類細胞を用いることが可能

SuperPrep[®] II では RNase 耐性を改善し、前バージョンに比べてより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。

表. 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 HPA	接着	<i>H.sapiens</i>	preadipocytes (primary cell)	前駆脂肪細胞
2 HEK	接着	<i>H.sapiens</i>	epidermal keratinocytes (primary cell)	表皮角化細胞
3 HA	接着	<i>H.sapiens</i>	astrocytes (primary cell)	アストロサイト
4 HDF	接着	<i>H.sapiens</i>	dermal fibroblasts (primary cell)	皮膚線維芽細胞
5 HFLS	接着	<i>H.sapiens</i>	fibroblast-like synoviocytes (primary cell)	滑膜細胞
6 HBEpC	接着	<i>H.sapiens</i>	bronchial epithelial cells (primary cell)	気管支上皮細胞
7 HUVEC	接着	<i>H.sapiens</i>	umbilical vein endothelial cells (primary cell)	臍帯静脈内皮細胞
8 HPAEC	接着	<i>H.sapiens</i>	pulmonary artery endothelial cells (primary cell)	肺動脈内皮細胞
9 HC	接着	<i>H.sapiens</i>	chondrocytes (primary cell)	軟骨細胞
10 HOb	接着	<i>H.sapiens</i>	osteoblasts (primary cell)	骨芽細胞
11 HSkMC	接着	<i>H.sapiens</i>	skeletal muscle cells (primary cell)	骨格筋細胞
12 HAOSMC	接着	<i>H.sapiens</i>	aortic smooth muscle cells (primary cell)	大動脈平滑筋細胞
13 HFDPC	接着	<i>H.sapiens</i>	hair follicle dermal papilla Cells (primary cell)	頭髮毛乳頭細胞
14 HMSC	接着	<i>H.sapiens</i>	marrow stromal cell (primary cell)	間葉系幹細胞
15 A431	接着	<i>H.sapiens</i>	epidermoid carcinoma cell line	上皮様細胞がん
16 HeLa S3	接着	<i>H.sapiens</i>	cervix carcinoma cell line	子宮頸がん
17 HepG2	接着	<i>H.sapiens</i>	hepatocellular carcinoma cell line	肝がん
18 C ₂ C ₁₂	接着	<i>M. musculus</i>	myoblast cell line	筋芽細胞
19 NIH-3T3	接着	<i>M. musculus</i>	embryo fibroblast cell line	胎仔由来線維芽細胞
20 MDCK	接着	<i>C. familiaris</i>	kidney cell line	腎臓
21 CHO-K1	接着	<i>C. griseus</i>	ovary cell line	卵巢
22 Jurkat	浮遊	<i>H.sapiens</i>	T lymphocyte cell line	白血病 T 細胞
23 K562	浮遊	<i>H.sapiens</i>	myelogenous leukemia cell line	赤芽球様白血病細胞
24 THP-1	浮遊	<i>H.sapiens</i>	acute monocytic leukemia cell line	単球
25 U937	浮遊	<i>H.sapiens</i>	leukemic monocyte lymphoma cell line	単球
26 HMNC	浮遊	<i>H.sapiens</i>	mononuclear cells (primary cell)	単核細胞

4. ハイスループット解析のバラツキ低減

プロトコー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、細胞溶解時のピペッティング操作を無くし、gDNA Remover 処理を並行して行うことで操作性を向上させました。反応の停止液や、RNA を不安定化する加熱工程などは不要です。

5. 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)、KOD SYBR[®] qPCR Mix (Code: QKD-201)等と組み合わせ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。また、弊社 RNA-direct[™] Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-101, QRT-201)、THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit (Code: QRZ-101)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 (p.16~p.19 をご参照ください)。

[2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれており、100 反应用（96 ウェルプレート使用時）としてご使用になれます。試薬は-20℃で保存してください。

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)

<Lysis Reagents>

試薬名	保存	容量
Lysis Solution	-20℃ または 2~8℃で 5ヶ月以内(注 1)	6.5ml
gDNA Remover	-20℃	33µl
RNase Inhibitor	-20℃	110µl

<RT Reagents>

試薬名	保存(注 2)	容量
5x RT Master Mix	-20℃	860µl
5x RT Master Mix no-RT Control	-20℃	86µl
Nuclease-free Water	-20℃	1.7ml x2

SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR (Code: SCQ-501)

[SCQ-401 の Lysis Reagents の別売品です]

試薬名	保存	容量
Lysis Solution	-20℃ または 2~8℃で 5ヶ月以内(注 1)	6.5ml
gDNA Remover	-20℃	33µl
RNase Inhibitor	-20℃	110µl

注1) gDNA Remover や RNase Inhibitor を添加した Lysis Solution を保存しないでください。必ずご使用の前に必要量の Lysis Solution を分取して gDNA Remover 及び RNase Inhibitor を添加してください。

注2) 長期に渡ってご使用される場合には、-30℃にて保存ください。

Lysis Solution

RT-qPCR 用に最適化された細胞溶解剤です。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 58.7 μ l に 0.3 μ l 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 58.7 μ l に 1 μ l の割合で添加して使用します。サンプル中の RNase 活性を低減します。

5x RT Master Mix

高効率逆転写酵素 ReverTra Ace[®]、RNase Inhibitor、Oligo dT Primer、Random Primer、反応バッファー、MgCl₂、dNTPs、グリセロールなどを含んだ 5x 濃度のマスターミックスです。蓋を開ける前にスピンドウンして、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。

5x RT Master Mix no-RT Control

5x RT Master 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。5x RT Master Mix と同様に、蓋を開ける前にスピンド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。

[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。

- ・ サーマルサイ클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(37°C、50°C、及び 98°C)を保つことができる機器をご用意ください。
- ・ 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

1. 細胞ライセートの調製

(1) 96 ウェルプレートで培養された接着細胞の場合

- ① 96 ウェルプレートに適当な数の細胞を播種します。

細胞数が多すぎると、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 $1 \times 10^1 \sim 7 \times 10^4$ 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薦めいたします。

- ② 実験条件に従って、細胞をインキュベートします。
- ③ ウェルから培地を除去します。
- ④ 各ウェルに PBS(-)を加えます(100 μ l 程度)。
- ⑤ ウェルから PBS を除去します。
- ⑥ 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	58.7 μ l	587 μ l	5635.2 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l	10 μ l	96 μ l
gDNA Remover	0.3 μ l	3 μ l	28.8 μ l

⑥の混合液は実験毎に調製し、RNase Inhibitor 及び gDNA Remover を添加した Lysis Solution の保存は避けてください。

- ⑦ 各ウェルに Lysis Solution (RNase Inhibitor 及び gDNA Remover 含有) 60 μ l を加えます。
- ⑧ プレートミキサーを用いて室温で 30 秒間(飛散しない程度の強さで)振とうしてください。プレートミキサーがない場合はプレートの横を手の甲でたたくなど、軽く振とうしてください。そのまま室温で 4 分 30 秒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。
- ⑨ プレートを氷上に移します。

細胞の種類によっては RNase の活性が強く、処理後も RNase 活性が残存する可能性がありますので、速やかに逆転写(RT)反応を行い、cDNA 化することをお薦めいたします。一時中断される場合は 6 時間以内を目安に逆転写反応を行ってください。細胞ライセートの安定性については、p.22 [6] 3.をご参照ください。

cDNA の状態で保存することで長期保存可能です。細胞ライセートとして保存する場合は-80°C で凍結することで長期保存可能ですが、2 か月以内を目安に逆転写反応を行ってください。

(2) 96 ウェルプレートで培養された浮遊細胞の場合

1 ウェルあたりの細胞数が 7.5×10^4 cells を超える場合は、細胞培養液の一部を新しい 96 ウェルプレートに移して以下の処理を行ってください。

- ① プレート対応の遠心機で 2,000 rpm、5 分間遠心します。
- ② 培地を除去します。

プレートからの培地や PBS の除去はアスピレーターやピペットを用いてください。デカンテーションやペーパータオル上でのタッピングは細胞をロスする原因となります。

- ③ PBS(-) 100 μ l を加え、細胞を洗浄します(ピペッティング操作は不要です)。
- ④ 2,000 rpm、5 分間遠心します。
- ⑤ PBS を除去し、(1) ⑥以降の操作を行います。

(3) 96 ウェルプレート以外の容器で培養された細胞の場合

下表を参考に液量を変更して、接着細胞は(1)、浮遊細胞は(2)の操作を行ってください。

	1 ウェルあたりの細胞数の目安	1 ウェルあたりの洗浄に使用する PBS(-)	1 ウェルあたりの Lysis Solution ^{*1}
384 ウェルプレート	4×10^3 cells	100 μ l	16 μ l
48 ウェルプレート	2×10^4 cells	250 μ l	120 μ l
24 ウェルプレート	4×10^4 cells	500 μ l	240 μ l
12 ウェルプレート	8×10^4 cells	1000 μ l	480 μ l
6 ウェルプレート	1×10^5 cells	2000 μ l	960 μ l

*1: Lysis Solution と RNase Inhibitor 及び gDNA Remover との混合液量を示しています。混合は(1)の⑥をご参照ください。

細胞を回収し、細胞数を計測後に処理する場合は以下の操作を行ってください。

- 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。
- ④ マルチウェルプレートまたはマイクロチューブに 5 μ l ずつ分注し、(1) ⑥以降の操作を行います。

2. 逆転写(RT)反応

(SuperPrep[®] II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)をご使用の場合)

- ① 反応液の調製(40 μ l 反応の場合)

下表に従い、必要量より若干の余分量をみて RT マスターミックスを氷上で調製します。穏やかに十分混合し、スピンドウンした後、PCR 用チューブまたはプレートに 32 μ l ずつ分注します。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
5x RT Master Mix	8 μ l	80 μ l	768 μ l
Nuclease-free Water	24 μ l	240 μ l	2304 μ l

RT 反応は、20~40 μ l 反応系にライセートを 20%容量(40 μ l の場合、ライセート 8 μ l) 添加することをお薦めいたしますが、細胞種によって 15%容量(40 μ l の場合、ライセート 6 μ l) 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。

RT(-)サンプルを調製される際は、5x RT Master Mix の代わりに 5x RT Master Mix no-RT Control を使用してください。キットには 10 回用(40 μ l 反応)の no-RT Control が添付されています。

- ② 分注した RT マスターミックスにライセートを 8 μ l 加え、軽く混合した後、スピンドウンして反応容器の底に落とします。
- ③ 以下の温度でインキュベートします。

37°C、15 分^{*1}

50°C、5 分^{*2}

98°C、5 分

4°C、保温

*1: 必要に応じて 60 分まで延長できます。

*2: 本製品の逆転写酵素は、高温反応性に優れます。本工程を入れることにより逆転写効率が向上する場合があります。本工程は必要に応じて省略することができます。

- ④ 反応終了後、4°Cまたは-20°Cで保存します。4°Cで 1 週間程度、-20°Cで長期間保存が可能です。

[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、10～15%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薦めします。以下に弊社試薬を用いた例をご紹介します。

1. THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code: QPS-101)をご使用の場合

詳細は THUNDERBIRD® 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 50µl および 20µl 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て、適宜反応液量を増減させてください。

	20µl 反応	50µl 反応	最終濃度
滅菌水	Xµl	Xµl	
THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	10µl	25µl	1x
Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3µM
Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3µM
TaqMan® Probe	4pmol	10pmol	0.2µM
50x ROX reference dye	0.4 or 0.04µl	1 or 0.1µl	1x / 0.1x ^{*1}
cDNA 溶液 ([4].2.④) ^{*2}	~3µl	~7.5µl	

*1: Applied Biosystems 社製機器、Agilent Technologies 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用います。これらの機器での反応の際にキット添付の 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以下の通りです。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。

*2: リアルタイム PCR 反応液への cDNA 溶液の持ち込みは 15%容量以内にしてください。

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、Agilent Technologies 社製機器(オプション)など	0.1 × (1/500 量)
Roche 社製機器、Bio-Rad 社製機器、QIAGEN 社製機器、TaKaRa 社製機器など	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	
初期変性	95°C	60 秒 ^{*1}	最大	
PCR (40 cycles)	変性	95°C	15 秒 ^{*2}	最大
	伸長	60°C	60 秒	最大

(Data Collection は伸長ステップに設定します)

*1: 本製品では高速ホットスタートシステムを採用しており、極めて短い初期変性時間で酵素が再活性化されます。ただし、鋳型 DNA の変性を完全に行うために、各機器の特性に応じた十分な初期変性時間を設定してください。最適時間がわからない場合は、60 秒に設定してください (初期変性時間の延長は反応効率にはほとんど影響しません)。

表 2. 主な機器における最適な初期変性時間の目安

機器	初期変性時間
Applied Biosystems 社製の高速サイクラー (Applied Biosystems 7500Fast など)	20 秒
キャピラリータイプの高速サイクラー (Roche LightCycler™ 1.x、2.0)	30 秒
一般的なブロックタイプのサイクラー (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(通常ブロック)、 StepOne™、StepOnePlus™、Bio-Rad CFX、 QIAGEN Rotor-Gene、Agilent Technologies 社製機器、TaKaRa 社製 機器など)	60 秒

*2: PCR サイクル中の変性時間は、各機器の特性に応じて、以下の時間に設定してください。不十分な変性時間は、PCR 効率低下の原因となりますのでご注意ください。最適時間がわからない場合は、15 秒に設定してください (変性時間の延長は反応効率にはほとんど影響しません)。

表 3. 主な機器における最適な PCR サイクル中の変性時間の目安

機器	PCR サイクル中の変性時間
Applied Biosystems 社製の高速サイクラー (Applied Biosystems 7500Fast など)	3 秒
キャピラリータイプの高速サイクラー (Roche LightCycler™ 1.x、2.0)	5 秒
一般的なブロックタイプのサイクラー (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(通常ブロック)、 StepOne™、StepOnePlus™、Bio-Rad CFX、 QIAGEN Rotor-Gene、Agilent Technologies 社製機器、TaKaRa 社製 機器など)	15 秒

2. KOD SYBR[®] qPCR Mix (Code: QKD-201)をご使用の場合

本試薬は KOD DNA polymerase を使用しており、優れた合成能を示し、またクルード成分の阻害を受けにくいことから一般的な qPCR 試薬よりも、より感度の高い検出を行うことができます。詳細は KOD SYBR[®] qPCR Mix の取扱説明書をご参照ください。

(1) 反応液の調製

50 μ l および 20 μ l 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。

	20 μ l 反応	50 μ l 反応	最終濃度
滅菌水	X μ l	X μ l	
KOD SYBR [®] qPCR Mix	10 μ l	25 μ l	1x
Forward Primer	4pmol	10pmol	0.2 μ M
Reverse Primer	4pmol	10pmol	0.2 μ M
50x ROX reference dye	0.4 or 0.04 μ l	1 or 0.1 μ l	1x / 0.1x ^{*1}
cDNA 溶液 ([4].2.④) ^{*2}	~3 μ l	~7.5 μ l	

*1: Applied Biosystems 社製機器、Agilent Technologies 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用います。これらの機器での反応の際にキット添付の 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以下の通りです。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。

*2: リアルタイム PCR 反応液への cDNA 溶液の持ち込みは 15%容量以内にしてください。

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、Agilent Technologies 社製機器(オプション)など	0.1 × (1/500 量)
Roche 社製機器、Bio-Rad 社製機器、QIAGEN 社製機器、TaKaRa 社製機器など	不要

(2) PCR サイクル条件設定(例)

KOD SYBR[®] qPCR Mix の取扱説明書では 3 ステッププロトコルを標準としておりますが、本試薬と組み合わせてご使用いただく場合は 2 ステッププロトコルをお薦め致します。

ステップ	温度	時間	昇降速度
初期変性	95°C	60 秒 ^{*1}	最大
PCR (40 cycles)	変性	95°C	最大
	伸長	60°C	最大
(Data Collection は伸長ステップに設定します)			
融解曲線分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis) ^{*3}			

*1: 本製品では高速ホットスタートシステムを採用しており、極めて短い初期変性時間で酵素が再活性化されます。ただし、鋳型 DNA の変性を完全に行うために、各機器の特性に応じた十分な初期変性時間を設定してください。最適時間がわからない場合は、60 秒に設定してください (初期変性時間の延長は反応効率にはほとんど影響しません)。

表 2. 主な機器における最適な初期変性時間の目安

機器	初期変性時間
Applied Biosystems 社製の高速サイクラー (Applied Biosystems 7500Fast など)	20 秒
キャピラリータイプの高速サイクラー (Roche LightCycler™ 1.x, 2.0)	30 秒
一般的なブロックタイプのサイクラー (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(通常ブロック)、 StepOne™、StepOnePlus™、Bio-Rad CFX、 QIAGEN Rotor-Gene、Agilent Technologies 社製機器、TaKaRa 社製 機器など)	60 秒

*2: PCR サイクル中の変性時間は、各機器の特性に応じて、以下の時間に設定してください。不十分な変性時間は、PCR 効率低下の原因となりますのでご注意ください。最適時間がわからない場合は、15 秒に設定してください (変性時間の延長は反応効率にはほとんど影響しません)。

表 3. 主な機器における最適な PCR サイクル中の変性時間の目安

機器	PCR サイクル中の変性時間
Applied Biosystems 社製の高速サイクラー (Applied Biosystems 7500Fast など)	3 秒
キャピラリータイプの高速サイクラー (Roche LightCycler™ 1.x, 2.0)	5 秒
一般的なブロックタイプのサイクラー (Applied Biosystems 7700、7500、7900HT(通常ブロック)、 StepOne™、StepOnePlus™、Bio-Rad CFX、 QIAGEN Rotor-Gene、Agilent Technologies 社製機器、TaKaRa 社製 機器など)	15 秒

*3: 融解曲線分析の設定は、各機器の標準設定に従ってください。詳しくは、各機器の取扱説明書をご覧ください。

3. THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code: QPS-201)をご使用の場合

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

(1) 反応液の調製

50µl および 20µl 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。

	20µl 反応	50µl 反応	最終濃度
滅菌水	Xµl	Xµl	
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	10µl	25µl	1x
Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3µM
Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3µM
50x ROX reference dye	0.4 or 0.04µl	1 or 0.1µl	1x / 0.1x* ¹
cDNA 溶液 ([4].2.④)* ²	~2µl	~5µl	

*1: 2(1)表 1 をご参照ください。

*2: リアルタイム PCR 反応液への cDNA 溶液の持ち込みは 10%容量以内にしてください。

(2) PCR サイクル条件設定

2.(2)をご参照ください。

4. 他社 qPCR 試薬をご使用の場合

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)で調製した cDNA を qPCR 反応系の 10~15%容量を目安にご使用ください。本キットの逆転写反応試薬以外の試薬で合成した cDNA の量や qPCR 反応の詳細は、お使いの試薬の取扱説明書に従ってください。

化学修飾系ホットスタート qPCR 試薬をご使用の場合、本製品の RT 反応液の持込を最大 10%を目安としてご使用ください。使用する qPCR 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。RT 反応液の添加量を減らしてください。

5. 1-step RT-qPCR 試薬をご使用の場合

本試薬で調製した細胞ライセート(p.7~9)を 1-step RT-qPCR の鑄型として簡易測定が可能です。1-step RT-qPCR 用試薬としては、弊社 *RNA-direct*TM Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-101)、THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit (Code: QRZ-101)、*RNA-direct*TM SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-201)をご使用いただけます。詳細は、各製品添付の取扱説明書をご参照ください。

A. *RNA-direct*TM Realtime PCR Master Mix (Code: QRT-101)をご使用の場合

(1) 反応液の調製

50 μ l および 20 μ l 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。

	20 μ l 反応	50 μ l 反応	最終濃度
滅菌水 (RNase-free grade)	X μ l	X μ l	
<i>RNA-direct</i> TM Realtime PCR Master Mix	10 μ l	25 μ l	1x
50mM Mn(OAc) ₂	1 μ l	2.5 μ l	2.5 mM
Forward Primer	6pmol	15pmol	0.3 μ M
Reverse Primer	6pmol	15pmol	0.3 μ M
TaqMan [®] Probe	4pmol	10pmol	0.2 μ M
細胞ライセート ([4].1.(1)⑨)	1~2 μ l	2.5~5 μ l	

(2) PCR サイクル条件設定

ステップ	温度	時間	昇降速度	
初期変性	90°C	30 秒	最大	
逆転写反応	55°C	20 分	最大	
変性	95°C	60 秒	最大	
PCR (40 cycles)	変性	95°C	15 秒	最大
	伸長	60°C	60 秒	最大

(Data Collection は伸長ステップに設定します)

B. THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit (Code: QRZ-101)をご使用の場合

(1) 反応液の調製

50 μ l および 20 μ l 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	20 μ l 反応	50 μ l 反応	最終濃度
RNase free water	X μ l	X μ l	
2xReaction Buffer	10 μ l	25 μ l	1x
DNA Polymerase	0.5 μ l	1.25 μ l	
RT Enzyme Mix	0.5 μ l	1.25 μ l	
Forward Primer	10pmol	25pmol	0.5 μ M
Reverse Primer	10pmol	25pmol	0.5 μ M
TaqMan [®] probe	4pmol	10pmol	0.2 μ M
50xROX Reference dye (Uracil-N-Glycosylase)	0.4 / 0.04 μ l* ¹	1/0.1 μ l* ¹	1x/0.1x* ¹
細胞ライセート ([4].1.(1)⑨)	1~2 μ l	2.5~5 μ l	

- *1: Applied Biosystems 社製機器や Agilent Technologies 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。
- *2: Uracil-N-Glycosylase(UNG)処理を実施する場合は、熱感受性(heat-labile)UNG を使用してください。各社の推奨条件に従って、酵素量を調整することができます。

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	1x(1/50 量)
Applied Biosystems 7500、7500Fast、Agilent Technologies 社製機器(オプション) など	0.1x(1/500 量)
Roche 社製機器、Bio-Rad 社製機器、QIAGEN 社製機器、TaKaRa 社製機器 など	不要

(2) PCR サイクル条件設定

ステップ		温度	時間	昇降速度
(UNG 反応)		(25~25°C * ¹)	(10 分 * ¹)	(最大)
逆転写反応		50°C	10 分	最大
初期変性		95°C	60 秒	最大
PCR (40~45 cycles) * ²	変性	95°C	15 秒	最大
	伸長	60°C	45 秒	最大

(Data Collection は伸長ステップに設定します)

*1: UNG 処理を行う場合は、逆転写反応の前に、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整してください。

*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。

C. *RNA-direct*TM SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix(Code: QRT-201)をご使用の場合

(1) 反応液の調製

50µl および 20µl 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。

	20µl 反応	50µl 反応	最終濃度
滅菌水 (RNase-free grade)	Xµl	Xµl	
<i>RNA-direct</i> TM SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	10µl	25µl	1x
50mM Mn(OAc) ₂	1µl	2.5µl	2.5 mM
Forward Primer	4pmol	10pmol	0.2µM
Reverse Primer	4pmol	10pmol	0.2µM
細胞ライセート ([4].1.(1)⑨)	1~2µl	2.5~5µl	

(2) PCR サイクル条件設定

ステップ	温度	時間	昇降速度	
初期変性	90°C	30 秒	最大	
逆転写反応	55°C	20 分	最大	
変性	95°C	60 秒	最大	
PCR (40 cycles)	変性	95°C	15 秒	最大
	アニーリング	55°C	15 秒	最大
	伸長	74°C	60 秒	最大
(Data Collection は伸長ステップに設定します)				
融解曲線分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis)				

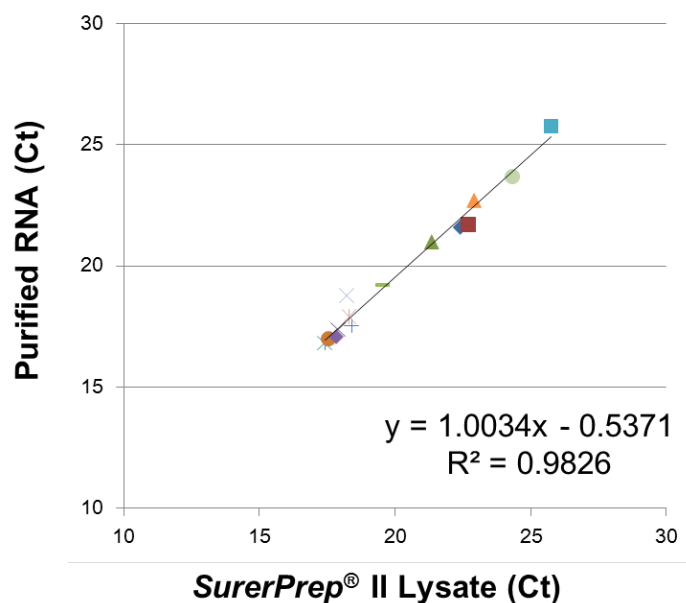
[6] 実施例

1. 精製 RNA を用いた検出との比較

<方法>

SuperPrep[®] II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)を用いて、HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞) 2.5×10^4 cells から細胞ライセートを調製した後、cDNA 合成(40 μ l 反応系)を行いました。また同時に、HUVEC から抽出した Total RNA 66.6ng から ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (Code: FSQ-201)を用いて cDNA 合成(40 μ l 反応系)を行いました。それぞれの cDNA を鋳型に THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix (Code: QPS-201)を用いて 15 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。

<結果>



15 種類のターゲットに対して、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、簡便にリアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行えることが分かります。

2. アッセイ精度の評価

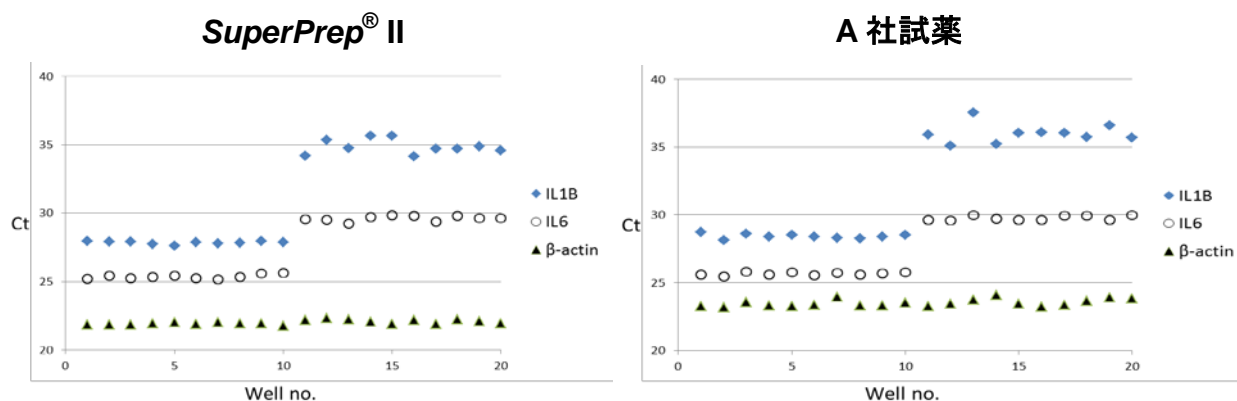
<方法>

HeLa S3 細胞を 96 ウェルプレートに 2×10^4 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 10 ウェル、未処理の 10 ウェルを PBS(-)で細胞を洗浄し、SuperPrep[®] II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)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: QPS-101)を用いて IL-6、IL-1 β 、 β -actin 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR を行って解析しました。同様に A 社細胞処理試薬を用いてリアルタイム PCR 解析を行いました。IL-6、IL-1 β 遺伝子の Ct 値を β -actin 遺伝子で補正し (Δ 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。

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。

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

<結果>



IL-1β	PMA	Ct(IL-1β) 平均	ΔCt(IL-1β-β-actin)		ΔΔCt	Z'
			平均	標準偏差		
SuperPrep® II	(+)	27.83	5.93	0.18	-6.81	0.66
	(-)	34.85	12.75	0.59		
A社試薬	(+)	28.42	5.01	0.28	-7.38	0.59
	(-)	35.98	12.39	0.74		

IL-6	PMA	Ct(IL-6) 平均	ΔCt(IL-6-β-actin)		ΔΔCt	Z'
			平均	標準偏差		
SuperPrep® II	(+)	25.35	3.45	0.20	-4.05	0.66
	(-)	29.60	7.50	0.26		
A社試薬	(+)	25.64	2.24	0.19	-3.94	0.64
	(-)	29.76	6.18	0.29		

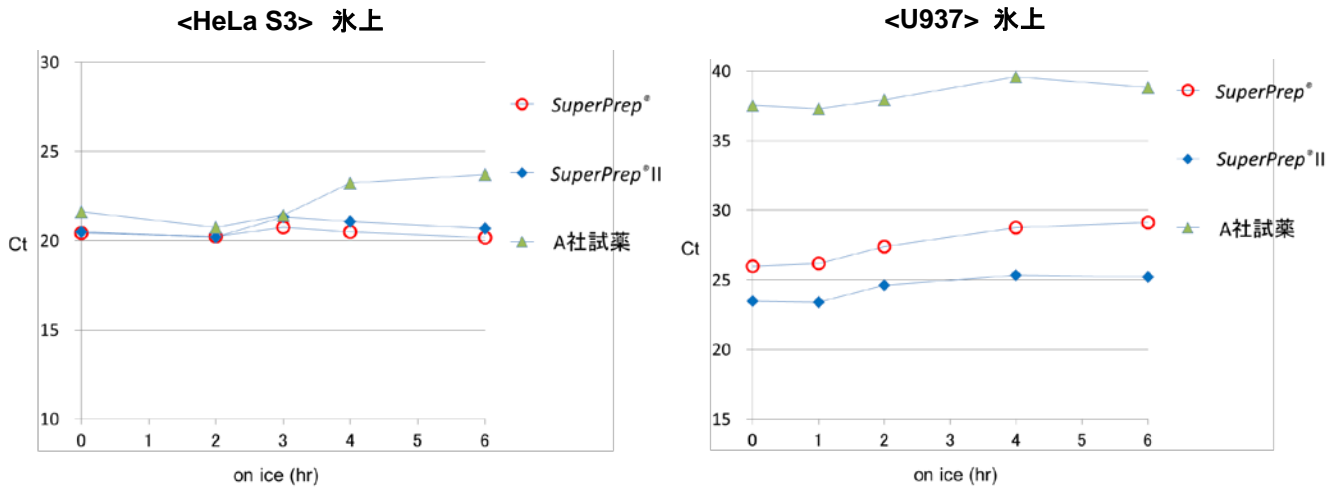
その結果、いずれも Z'-factor としては良好なアッセイ系の目安となる 0.5 をクリアしました。SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)と THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code: QPS-101)を用いた弊社試薬系では、他社の試薬と比較して高い Z'-factor を示し、より質の高いアッセイが可能であることが分かりました。

3. 細胞ライセートの氷上安定性の確認

<方法>

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401)を用いて、HeLa S3 細胞及び U937 細胞 4×10^4 cells から細胞ライセートを調製し、氷上にサンプルを移した後、0~6 時間後に細胞ライセートをサンプリングし、すぐに cDNA 合成を行いました。同様に弊社従来品 (SuperPrep®) 及び A 社試薬を用いて細胞ライセートを調製し、同様にサンプリングして、cDNA 合成を行いました。この cDNA を鋳型に THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code: QPS-101)を用いて、GAPDH 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR を行って解析しました。

<結果>



HeLa S3 細胞や RNase 活性のより強い U937 細胞において氷上に 6 時間放置しても顕著な Ct 値の遅れは認められませんでした。

細胞の種類や処理細胞数が多いと RNase 活性の影響をより強く受ける場合があります。細胞ライセート調製後はサンプルを速やかに氷上又は 4°Cに移し、すぐに cDNA 合成を実施いただくことをお勧めいたします。また、必要に応じて、ご使用の細胞で予備検討をお勧めします。

[7] 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	細胞数が多すぎる	<ul style="list-style-type: none"> ・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。播種する細胞を低減するか、ライセートを Lysis Solution にて希釈して RT 反応に添加してください。
	RNA が分解している	<ul style="list-style-type: none"> ・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、細胞溶解後、ライセートを氷上に移し、速やかに RT 反応を行い、cDNA 化することをお薦めいたします。一般的なセルラインではライセートは氷上で6時間程度安定です。 ・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	<ul style="list-style-type: none"> ・本製品の RT 反応液を qPCR 反応液へ最大 15%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。THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix (Code: QPS-201)をご使用の場合 RT 反応液の qPCR 反応液への添加は最大 10%までとしてください。 ・本製品以外の RT 試薬をご使用の場合、qPCR 反応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。
定量性が低い	細胞溶解が不十分	<ul style="list-style-type: none"> ・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] 関連製品

品名	容量	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 反応	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 反応	SCQ-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[®] Probe qPCR Mix	1mlx1 (40 回用)	QPS-101T
	1.67mlx3 (200 回用)	QPS-101
	1.67mlx15 (1000 回用)	QPS-101X5
高効率 SYBR [®] Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 KOD SYBR[®] qPCR Mix	1mlx1 (40 回用)	QKD-201T
	1.67mlx3 (200 回用)	QKD-201
	1.67mlx15 (1000 回用)	QKD-201X5
高効率 SYBR [®] Green I 検出系用リアルタイム PCR 試薬 THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix	1mlx1 (40 回用)	QPS-201T
	1.67mlx3 (200 回用)	QPS-201
	1.67mlx15 (1000 回用)	QPS-201X5
高効率 One-step qRT-PCR Kit THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit	100 回用	QRZ-101
One step qRT-PCR kit (TaqMan [®] アッセイ・プローブアッセイ用) RNA-direct[™] Realtime PCR Master Mix	0.5mlx5 (100 回用)	QRT-101
	0.5mlx25 (500 回用)	QRT-101X5
One step qRT-PCR kit (SYBR [®] Green I アッセイ用) RNA-direct[™] SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix	0.5mlx5 (100 回用)	QRT-201
	0.5mlx25 (500 回用)	QRT-201X5

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆

<http://lifescience.toyobo.co.jp/>



【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 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (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、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://lifescience.toyobo.co.jp/>