

リアルタイムPCR解析用cDNA合成キット

QuantAccuracy[®], RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit

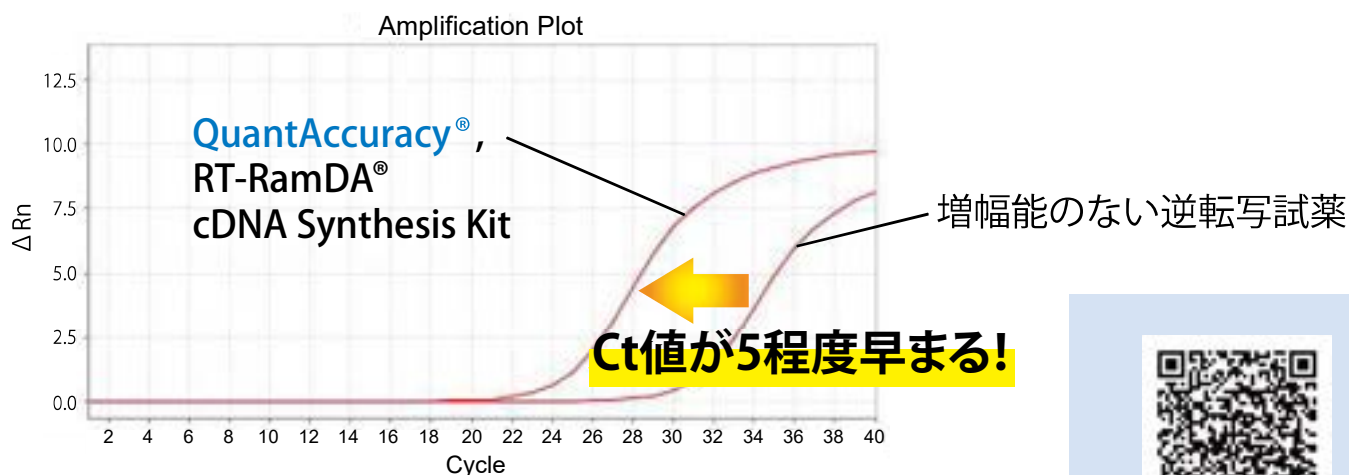
シングル
セル

低コピー
RNA*

FFPE

RT-RamDA[®]法を使用した新規のcDNA増幅方法により
微量RNA・FFPE標本由来のRNAから
cDNA合成が可能

*1~500細胞または10pg~10ng total RNAに対応



HeLa細胞由来の精製RNA 10pgを用いて、増幅能のない逆転写試薬および本製品でcDNAを合成し、リアルタイムPCRにてACTBを増幅した例



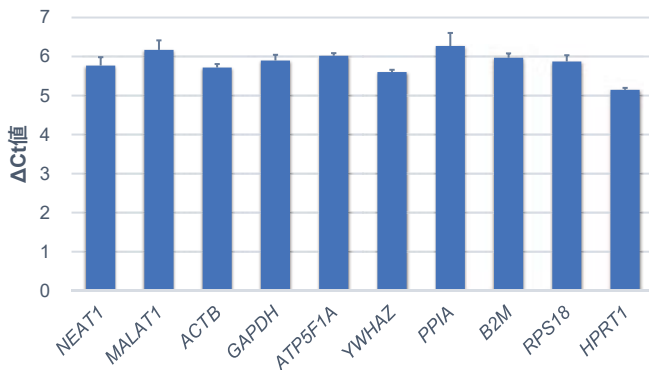
サンプル請求は
こちら

微量サンプルからのRNA発現解析に!

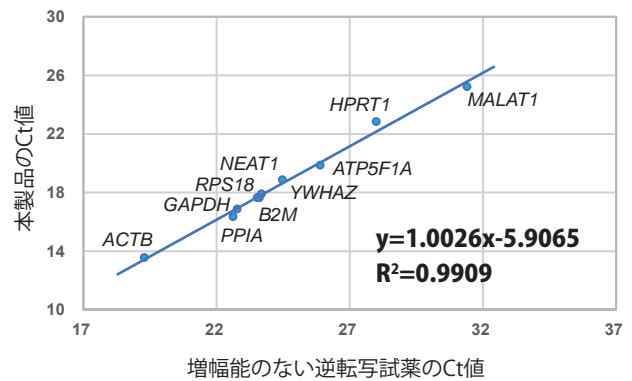
QuantAccuracy®, RT-RamDA® cDNA Synthesis Kitでは、 増幅能のない一般的な逆転写試薬と比較し 20倍以上のcDNAを得ることが可能!

- シングルセルや微量RNAからのcDNA合成が可能
- 増幅によるバイアスが小さく、検出が難しい遺伝子も解析可能
- 貴重なRNAサンプルも、インプット量を減らして解析が可能

本製品と増幅能のない逆転写試薬との比較



本製品と増幅能のない逆転写試薬との相関性確認

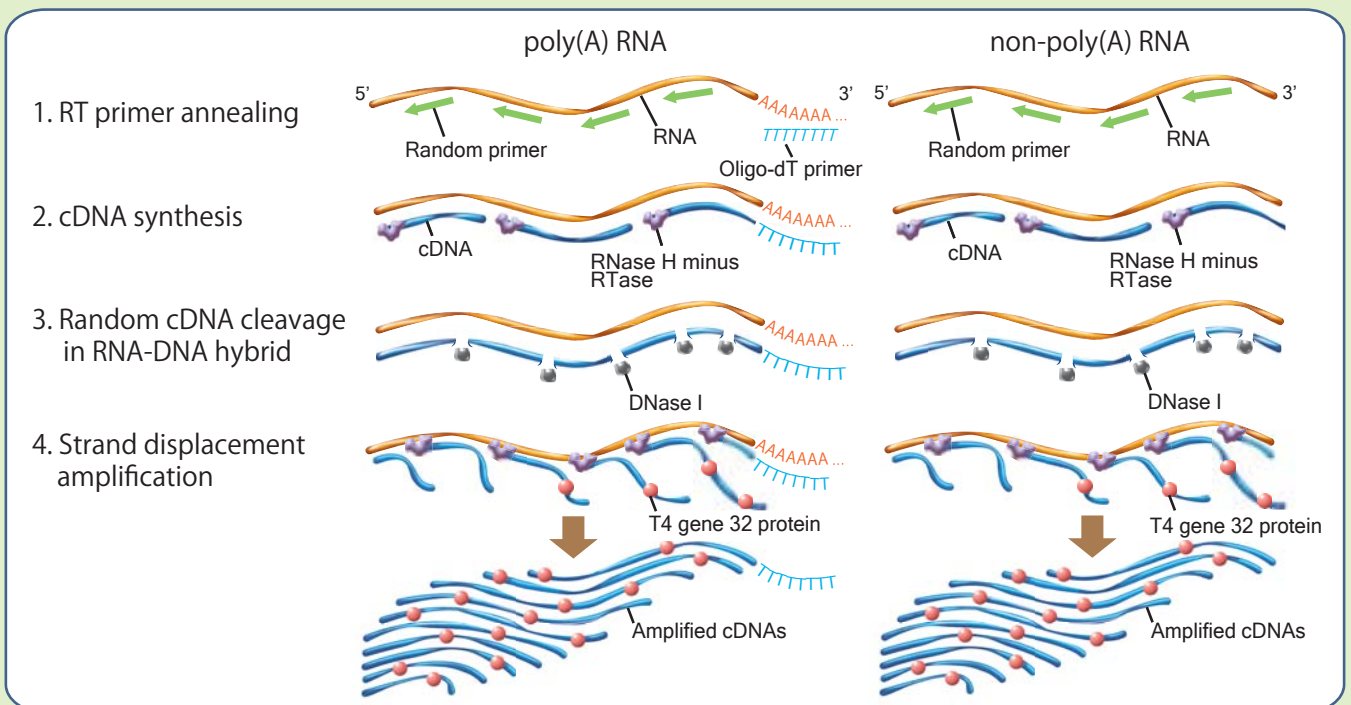


HeLa細胞由来の精製RNA 1ngを用いて、増幅能のない逆転写試薬および本製品でcDNAを合成し、2種の核内RNA遺伝子 (NEAT1、MALAT1) および8種のハウスキーピング遺伝子 (ACTB、GAPDH、ATP5F1A、YWHAZ、PPIA、B2M、RPS18、HPRT1) の検出をリアルタイムPCRにて行い、Ct値を算出しました。その結果、本製品と増幅能のない逆転写試薬において、Ct値の相関が認められ、いずれの遺伝子においても $\Delta Ct > 5$ となり、本製品では、 $2^5 \approx 32$ 倍以上の増幅率を確認することができました。

cDNAの増幅が可能RT-RamDA®法とは?

RT-RamDA®は、理化学研究所 生命機能科学研究センター バイオインフォマティクス研究開発チームが開発した「Reverse Transcription with Random Displacement Amplification」の略です。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) RNA由来のcDNAも合成できます。cDNAが合成と同時に増幅されるため、従来法で実施している増幅用アダプター付加やPCRが必要なく、増幅によるバイアスを抑えることが可能です。

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



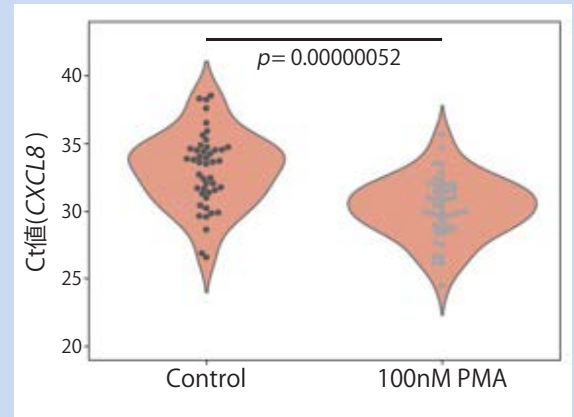
実施例 1 IL8 (CXCL8) 遺伝子のシングルセル解析

<方法>

HeLa S3細胞において、処理なし (Control) または100nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で24時間処理 (100nM PMA) を行った後、セルソーターを用いて1細胞ずつ分取し、PMA処理による炎症性サイトカイン遺伝子IL-8 (CXCL8) のシングルセル発現解析実験を行いました。分取した1細胞 (n=48) から本製品によってcDNAを合成し、THUNDERBIRD® SYBR™ qPCR Mix [Code No. QPS-201] を用いて、IL-8 (CXCL8) 遺伝子の定量を行いました。

<結果>

PMA処理によってCt値が3程度小さくなっており、IL-8の発現量が有意に増大していることが分かりました。(p値はStudentのt検定より算出しました)。このように本製品を用いることで、シングルセルレベルでも遺伝子の発現解析が可能でした。



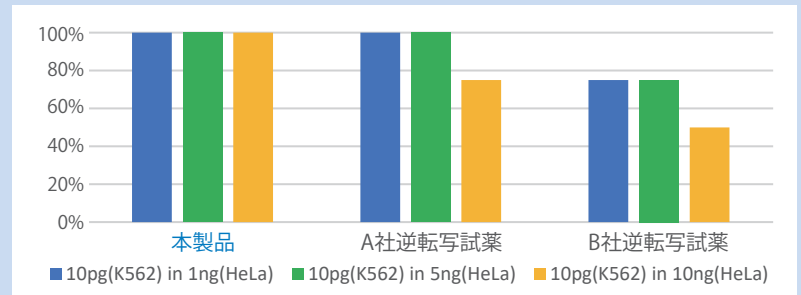
実施例 2 微量RNAからのcDNA合成

<方法>

慢性白血病の原因とされる遺伝子について、1ng、5ng、10ngのHeLa細胞由来RNA (BCR-ABL(-))中にK562細胞由来RNA (BCR-ABL(+)) を10pgスパイクし、本製品と増幅能のないA社、B社逆転写試薬でcDNA合成を行い、THUNDERBIRD® SYBR™ qPCR Mix [Code No. QPS-201] を用いて、BCR-ABL遺伝子をリアルタイムPCRで検出しました(n=4で実施)。

<結果>

HeLa細胞由来のRNAの混入量が増えるにつれて、増幅能のない逆転写試薬では目的とする微量RNAからのcDNA合成効率が悪くなり、検出漏れが発生しましたが、本製品では、効率よくcDNA合成を行うことができ、すべて検出可能でした。



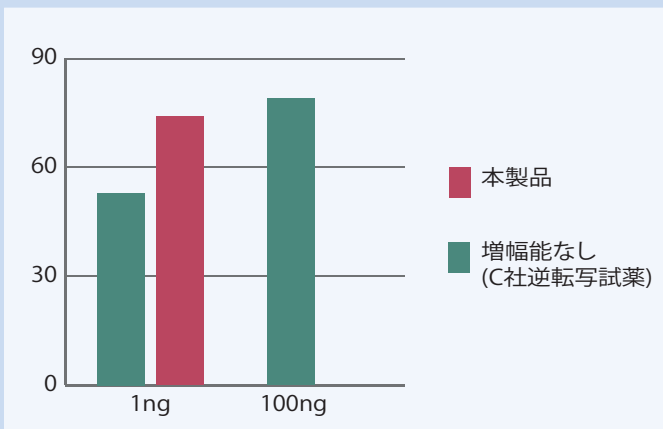
実施例 3 検出遺伝子数の比較

<方法>

iPS細胞由来RNAから、本製品と増幅能のないC社逆転写試薬でcDNAを合成した後、TaqMan® Array Mouse Stem Cell Pluripotencyに添加し、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix [Code No. QPS-101] で96種の遺伝子を検出しました。

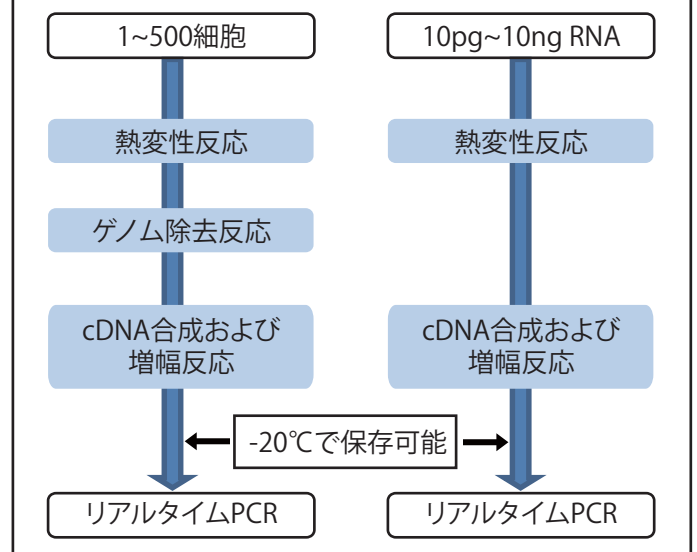
<結果>

インプット量1ngの本製品の結果は、増幅能のない試薬より多くの遺伝子を検出でき、また、増幅能のない試薬でインプット量を100倍に増やして逆転写を行い解析した場合、ほぼ同数の遺伝子を検出できました。



操作フロー

細胞サンプル用 (1~500細胞が対象)、微量RNA用 (10pg~10ng total RNAが対象) の2種類のプロトコルをご用意しております。



製品詳細は
こちらから



実施例 4

FFPE標本由来のRNAからの増幅

<方法>

本製品(QuantAccuracy®, RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit)、D社、E社 cDNA増幅試薬、および増幅能のないF社逆転写試薬を用いて、ヒトFFPE標本由来精製RNA(100pg、1ng)よりcDNAを合成し、2種の核内RNA遺伝子(NEAT1、MALAT1)および8種のハウスキーピング遺伝子(ACTB、GAPDH、ATP5F1A、YWHAZ、PPIA、B2M、RPS18、HPRT1)の検出・定量解析を行いました。リアルタイムPCR試薬には、弊社THUNDERBIRD® SYBR™ qPCR Mix [Code No. QPS-201]を用い、20 μL反応系にcDNA溶液1 μLをインプットしました(n = 6)。

<結果>

100pgのRNAからの各遺伝子の検出率を比較しました。その結果、いずれの遺伝子においても本製品を用いた場合、最も高い検出率が示されました(表1)。続いて、異なるRNA量(100pg、1ng)を鋳型としてcDNAを合成し、リアルタイムPCRにより増幅を行い、Ct値の比較を行いました。100pgのRNAを用いた場合のCt値と1ngのRNAを用いた場合のCt値を直線で結んだところ、本製品を用いた場合のみ、平行となり、解析における増幅率のバラつきがほとんどありませんでした(図1)。また、本製品の100pgと1ngの間でのΔCt値をとり、その平均を求めると、約3.40となりました。つまり、本製品を用いた解析では、10倍のサンプル量の差を $2^{3.40} \approx 10.6$ 倍の遺伝子量の差として評価しており、FFPE標本由来のRNAにおいても、増幅率のバイアスが少なく解析が可能と考えられました。

表1. FFPE標本由来精製RNAからの各遺伝子の検出率

	本製品 QuantAccuracy®	D社 cDNA増幅試薬	E社 cDNA増幅試薬	F社逆転写試薬 増幅能なし
NEAT1	100%	100%	0%	100%
MALAT1	50%	17%	0%	17%
ACTB	100%	67%	50%	100%
GAPDH	100%	50%	33%	100%
ATP5F1A	100%	17%	0%	83%
YWHAZ	100%	50%	33%	100%
PPIA	100%	33%	0%	100%
B2M	100%	100%	100%	100%
RPS18	100%	17%	50%	100%
HPRT1	50%	17%	50%	33%

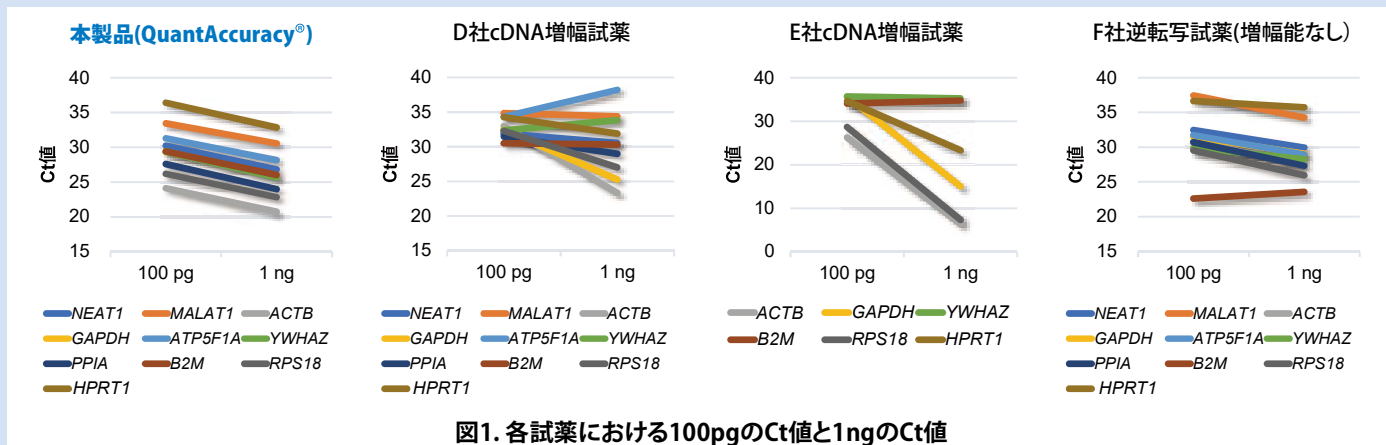


図1. 各試薬における100pgのCt値と1ngのCt値

価格表

保存温度：-20℃

品名	包装	Code No.	価格(税別)
QuantAccuracy®, RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit	96 回用	RMQ-101	¥ 78,000
	24 回用	RMQ-101T	¥ 28,000

※ RT-RamDA®は 国立研究開発法人 理化学研究所の登録商標です。

本資料に記載しているその他の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。

TOYOBO 東洋紡株式会社

バイオプロダクト営業部

(E-mail) order_lifescience@toyobo.jp

(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

(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

テクニカルライン

(E-mail) tech_osaka@toyobo.jp

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

(9:00~12:00 13:00~17:00 [土日祝日、休日を除く])

WEBサイト

[<https://lifescience.toyobo.co.jp/>]



toyobo公式X