

培養細胞から RNA 精製が不要で、高品質な cDNA 合成が可能

リアルタイム PCR 用細胞溶解 & cDNA 合成キット (培養細胞用) **TOYOBO**

SuperPrep[®] II

Cell Lysis & RT Kit for qPCR

SuperPrep[®] の改良版!



Lysis Reagents



RT Reagents

培養細胞から cDNA 合成が約 30 分で可能

ハイスループット解析のバラツキ低減

ライセート (細胞溶解液) は氷上で 6 時間安定

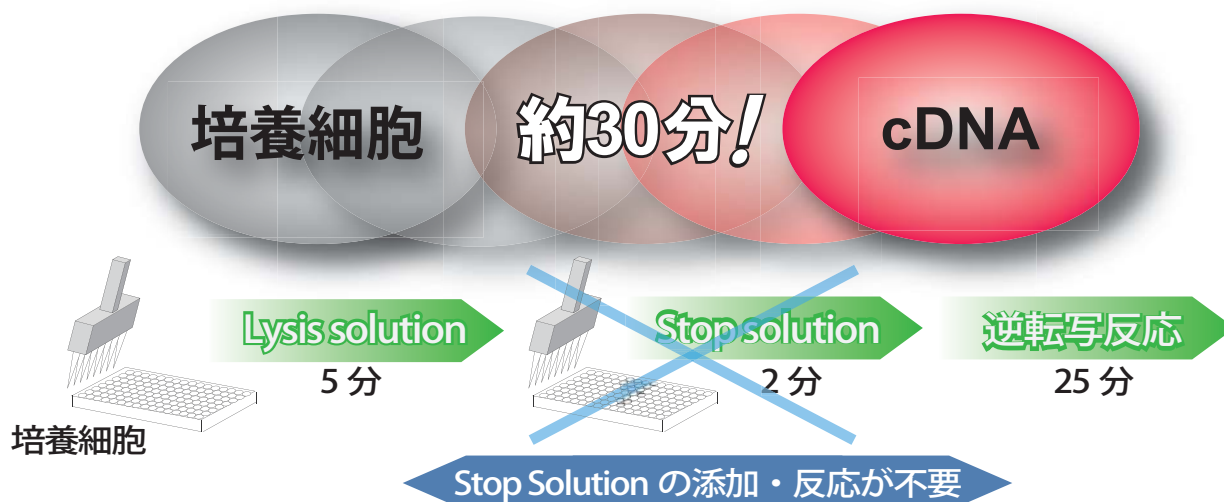
cDNA は精製 RNA からの合成と同様に定量可能

ライセートは反応系の 20% まで持ち込み可能

DNaseI 処理でバックグラウンド低減

さまざまな qPCR 試薬と組み合わせ可能

改良点 1 反応停止液の添加が不要

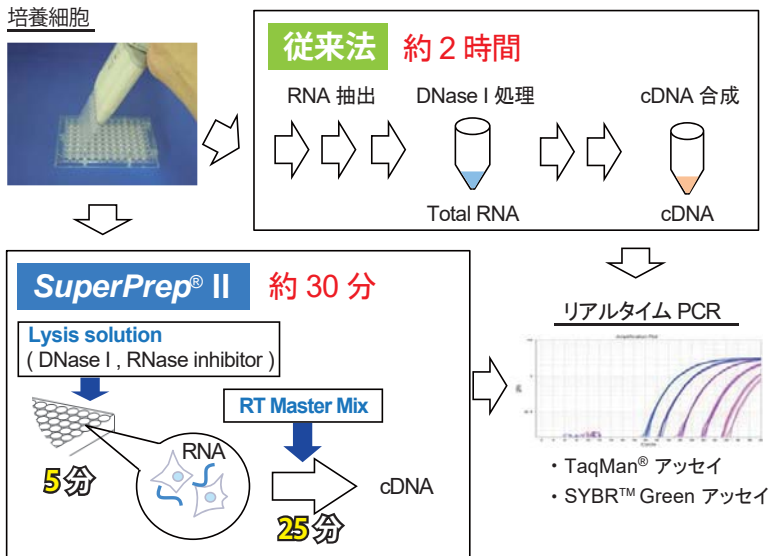


改良点 2 より幅広い種類の細胞を用いるアッセイに対応

初代培養細胞を含む幅広い哺乳類細胞を用いることが可能

ハイスループット解析のバラツキを低減

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR [Code No. 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。本製品を使用することで、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単に調製できます。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。弊社従来品では 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 & RT Kit for qPCR [Code No. SCQ-401]

【Lysis Reagents】

- Lysis Solution
- gDNA Remover
- RNase Inhibitor

【RT Reagents】

- 5×RT Master Mix
- 5×RT Master Mix no-RT control*
- Nuclease free Water

*逆転写酵素を含まないマスターミックスです。コントロールとして使用します。

SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR [Code No. SCQ-501] は、細胞溶解試薬 (Lysis Reagents) の別売品です。

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit [Code No. QRZ-101]、**RNA-direct® Realtime PCR Master Mix [Code No. QRT-101]** 等の 1-step リアルタイム PCR 試薬を用いる解析 (簡易測定) にご使用いただけます。

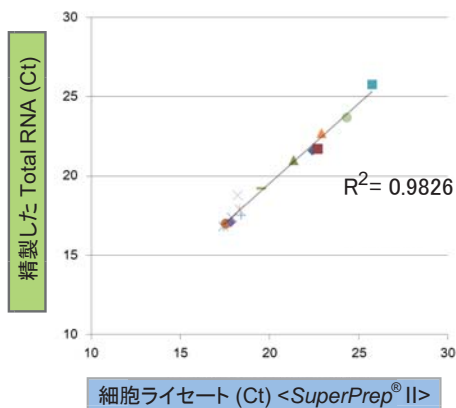
特長 1 RNA の精製不要

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単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。

特長 2 ライセートから高品質な cDNA を合成

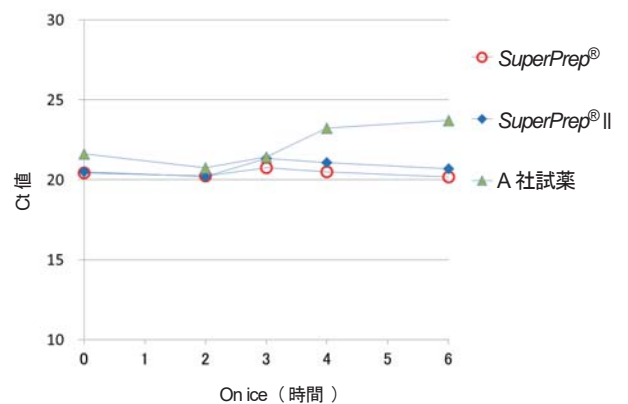
最適化されたバッファー組成により、RNase 等の細胞成分による RNA の分解を効果的に抑えます (調製したライセート中の RNA は氷上で 6 時間安定です)。また、gDNA Remover (DNase I) 処理後に cDNA 合成を行うことから、ゲノム DNA のコンタミの少ない高品質な cDNA を合成することができます。逆転写試薬は弊社の高効率逆転写酵素「ReverTra Ace®」をもとに最適化されたマスターミックスとなっており、簡便・高効率に cDNA 合成を行うことができます。合成した cDNA は長期保存可能です。

実施例 1 精製 RNA と細胞ライセートでの Ct の相関の検証



SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR [Code No. SCQ-401] を用いて HUVCE (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 (40µL 反応系) を行いました。また同時に、HUVCE 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 (40µL 反応系) を行いました。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 解析を行い比較しました。その結果、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。

実施例 2 細胞ライセートの氷上安定性の確認



SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR [Code No. SCQ-401] を用いて HeLa S3 細胞 4×10^4 cells から細胞ライセートを調製し、氷上に移した後、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 No. 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。その結果、HeLa S3 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。

特長 3 幅広い哺乳類細胞を用いることが可能

SuperPrep® II では細胞の溶解性を向上させると共に RNase の影響を低減することで、弊社従来品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 1. SuperPrep® II 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 cells (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 C2C12	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	卵巣
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

特長 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。

実施例 3 バラツキを考慮したアッセイ精度の評価

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 12 ウェル、未処理の 12 ウェルを PBS(-) で細胞を洗浄し、SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR [Code No. 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 No. QPS-101] を用いて IL-6、IL-1 β 、 β -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 社試薬を用いてリアルタイム PCR 解析を行いました (逆転写とリアルタイム PCR 試薬も A 社キット付属品を使用)。IL-6、IL-1 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。

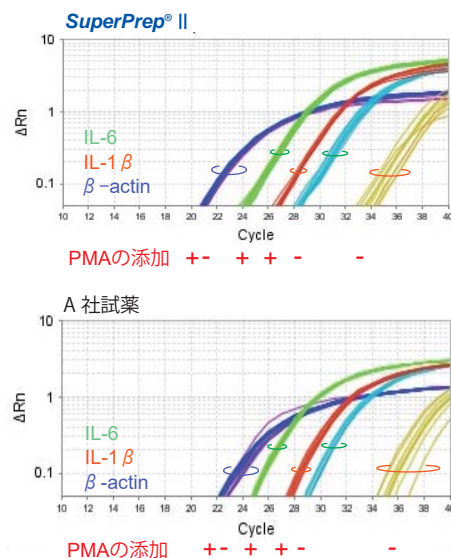
$$Z'-factor = 1 - 3 \times (\Delta Ct(+)\text{標準偏差} + \Delta Ct(-)\text{標準偏差}) / |\Delta\Delta Ct|$$

IL-6		PMA	Ct(IL-6) 平均	Δ Ct(IL-6 - β -actin) 平均	標準偏差	$\Delta\Delta$ Ct	Z'
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		

IL-1 β		PMA	Ct(IL-1 β) 平均	Δ Ct(IL-1 β - β -actin) 平均	標準偏差	$\Delta\Delta$ Ct	Z'
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		

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 をクリアしましたが、SuperPrep® II / THUNDERBIRD® Probe qPCR Set [Code No. SCQ401/QPS101] を用いた実験において、A 社試薬と比較して高い 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。

< 増幅曲線の比較 >

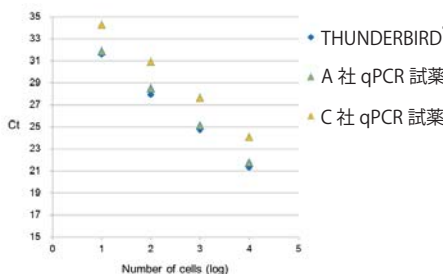


特長 5 さまざまな qPCR 試薬との組み合わせ可能

さまざまなリアルタイム PCR 試薬 (SYBR™ Green I, TaqMan® アッセイ両方に対応可能) と組み合わせ使用可能です。弊社 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix [Code No. QPS-101]、THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix [Code No. QPX-101]、KOD SYBR™ qPCR Mix [Code No. QKD-201] 等と組み合わせることで、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 THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit [Code No. QRZ-101]、RNA-direct® SYBR™ Green Realtime PCR Master Mix [Code No. QRT-201] 等の 1-step リアルタイム RT-PCR 試薬と組み合わせる簡易アッセイも可能です。

実施例 4 SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR と種々の qPCR 試薬との組み合わせによる性能比較

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR [Code No. SCQ-401] を用いて、ヒト間葉系幹細胞 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 cells から細胞ライゼートを調製し、続いて 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® Probe qPCR Mix [Code No. QPS-101]、A 社及び C 社製リアルタイム PCR 試薬を用いて、GAPDH 遺伝子について TaqMan® アッセイを行いました。その結果、いずれのリアルタイム PCR 試薬においても良好な増幅を認めることができました。特に、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix [Code No. QPS-101] との組み合わせにおいて、最も良好な Ct 値を示しました。



価格表

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格 (税別)
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR <Lysis Reagents> • Lysis Solution • gDNA Remover • RNase Inhibitor <RT Reagents> • 5 × RT Master Mix • 5 × RT Master Mix no-RT Control • Nuclease-free Water	100 回用 *1	-20°C	SCQ-401	¥84,000
	100 回用 X5	-20°C	SCQ-401X5	¥360,000
SuperPrep® II / THUNDERBIRD® Probe qPCR Set SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR [SCQ-401] と THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix [QPS-101] ² とのセット	1セット	-20°C	SCQ401/QPS101	¥107,500
SuperPrep® II / THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Set SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR [SCQ-401] と THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix [QPX-101] ² とのセット	1セット	-20°C	SCQ401/QPX101	¥107,500
SuperPrep® II / KOD SYBR™ qPCR Set SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR [SCQ-401] と KOD SYBR™ qPCR Mix [QKD-201] ² とのセット	1セット	-20°C	SCQ401/QKD201	¥110,000
SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR *3 <Lysis Reagents> • Lysis Solution • gDNA Remover • RNase Inhibitor	100 回用	-20°C	SCQ-501	¥43,000

*1 40 μ L で逆転写反応をした場合に 100 回用としてご使用になれます。

*2 50 μ L 反応で 200 回用、20 μ L 反応で 500 回用としてご使用になれます。

*3 SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR に含まれる Lysis Reagents の別売り品です。1-step リアルタイム RT-PCR 試薬と組み合わせる簡易アッセイのための細胞ライゼート調製にご使用になれます。

関連商品 高効率 1-step リアルタイム RT-PCR 試薬

品名	包装*	保存温度	Code No.	価格 (税別)
(TaqMan® アッセイ用) THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit	100 回用	-20°C	QRZ-101	¥36,000
(SYBR™ Green I アッセイ用) RNA-direct® SYBR™ Green Realtime PCR Master Mix	100 回用	-20°C	QRT-201	¥36,000

* 50 μ L 反応で 100 回用、20 μ L 反応で 250 回用としてご使用になれます。

※ 本資料に記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。

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

サンプル

サンプルマークの付いている製品は、評価用の無償サンプルをご用意しています。



サンプル請求