

製品コード 3731

研究用

Takara

CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for One Step RT-PCR (Real Time)

説明書

v202201Da

本製品は 96 ウェルまたは各種プレートで培養した動物細胞から特別な RNA 抽出操作を行うことなく、簡単な手順で 1 ステップリアルタイム RT-PCR 用の鑄型サンプルを調製するためのキットです。本キットは、One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B)、One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B) および One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B) 専用に開発されました。これらのキットと組み合わせて使用することで、約 2 時間半 (DNase 処理を行わない場合は約 2 時間) で遺伝子発現解析を行うことが可能です。

また、本キットでは細胞から直接鑄型となるサンプルを調製しますが、1 ステップリアルタイム RT-PCR の高い検出感度に影響を与えることなく、微量な細胞から遺伝子発現のプロファイルを解析することができます。さらに、DNase によるゲノム DNA の除去が効果的に行えるため、エキソジャンクションを挟むプライマーが設計できない場合や低発現遺伝子の発現解析を行う場合など、ゲノム DNA の混入が問題になる解析にも威力を発揮します。

I. 内容*

Cell Washing Buffer	12.5 ml × 2
Cell Processing Buffer	8 ml
DNase I for Direct RNA Prep	200 μl
DNase I Buffer for Direct RNA Prep	1 ml × 2

* : 96 ウェルプレートで培養した細胞の場合、200 ウェル分に相当します。

[本製品と組み合わせ可能な 1 ステップリアルタイム RT-PCR 用試薬]

One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B)

One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B)

One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B)

II. 保存

— 20℃

Cell Washing Buffer および Cell Processing Buffer は融解後、4℃でも保存可能です。その場合、コンタミネーションには十分注意してください。

III. 使用上の注意

- 1) 本キットは、
 - ・ One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B)
 - ・ One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B)
 - ・ One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B)と組み合わせてご使用ください。上記キット以外の 1 ステップリアルタイム RT-PCR キットや 2 ステップリアルタイム RT-PCR キットとの組み合わせについては、適合性を確認していません。
- 2) Cell Washing Buffer および Cell Processing Buffer の融解時に析出物が生じた場合は、室温まで温め完全に溶解してから使用してください。
- 3) ライセート調製の途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。

[RNA を取り扱う際の一般的な注意事項]

- ・ 市販の滅菌ディスポーザブルプラスチック器具類は通常 RNase フリーと考えてよく、そのまま実験に用いてもさしつかえありませんが、マイクロ遠心チューブやマイクロピペット用チップなどはオートクレーブ処理を行った後用いてください。
- ・ ガラス器具、スパーテルなどを用いる場合には、160℃で少なくとも 2 時間以上乾熱滅菌を行ってください。乾熱滅菌できないものは、0.1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) 溶液で 37℃、12 時間処理した後、オートクレーブ処理を行ってから (DEPC による RNA のカルボキシメチル化を防ぐ) 用いてください。RNA 実験用の器具類は他と明確に区別しておくことが必要です。
- ・ RNase が混入する最も大きな要因は、素手からの持ち込みです。RNA を用いた実験を行う際には必ず使い捨てのプラスチック手袋とマスクを着用してください。

IV. 操作

IV-1. 試薬の準備

下記に示す DNase 溶液を氷上で調製する。

試薬	96 ウェルプレート*1 1 ウェル当たり
DNase I for Direct RNA Prep	1 μ l
DNase I Buffer for Direct RNA Prep	9 μ l
Total	10 μ l

* 1：他のタイプのプレートを使用する場合は、V-2 をご参照ください。

IV-2. 接着性の培養細胞からのライセート調製方法

- 1) 96 ウェルプレート*2 の各ウェルに適切な数の細胞を播種する。
- 2) 実験プロトコールに従って適当な細胞数、またはコンフルエントになるまで培養する。
- 3) 培地を可能な限り吸引除去する。
- 4) 各ウェルに 125 μ l*3 の Cell Washing Buffer を加える。
- 5) Cell Washing Buffer を可能な限り吸引除去する。
- 6) 各ウェルに 40 μ l*3 の Cell Processing Buffer を添加し、室温 (15 ~ 28°C) で 5 分間インキュベートする。
- 7) 各ウェルの細胞溶解液を数回ピッペッティングした後、PCR チューブまたは適容量のマイクロ遠心チューブに移し、75°C で 10 分間インキュベートする。
- 8) 氷上で冷した後、各サンプルに 10 μ l*3 の DNase 溶液を添加し、37°C で 20 分間インキュベートする。(DNase 処理を行わない場合は、9) に進んでください。)
- 9) 「V-1」に記載のプロトコールに従い、調製したライセートを鋳型として 1 ステップリアルタイム RT-PCR を行う。25 μ l の反応系では、2 μ l 以下のライセートを使用する。調製したライセートは氷上に保持し、20 分以内にリアルタイム RT-PCR を行う。またライセートは -80°C で 2 週間程度保存可能である。

* 2：播種する細胞数については、V-2 をご参照ください。

* 3：他のタイプのプレートをご使用の場合は、V-2 をご参照ください。

IV-3. 浮遊性の培養細胞からのライセート調製方法

- 1) 細胞数をカウントし、 1×10^4 cells 以下の細胞を、適容量のマイクロ遠心チューブに移す。
- 2) 300 $\times g$ で 5 分間遠心操作を行う。
- 3) 培地を可能な限り吸引除去する。
- 4) 125 μ l*4 の Cell Washing Buffer を加える。
- 5) 300 $\times g$ で 5 分間遠心操作を行う。
- 6) Cell Washing Buffer を可能な限り吸引除去する。
- 7) 40 μ l*4 の Cell Processing Buffer を添加し、室温 (15°C ~ 28°C) で 5 分間インキュベートする。
- 8) 75°C で 10 分間インキュベートする。
- 9) 氷上で冷した後、各サンプルに 10 μ l*4 の DNase 溶液を添加し、37°C で 20 分間インキュベートする。(DNase 処理を行わない場合は、10) に進んでください。)
- 10) 「V-1」に記載のプロトコールに従い、調製したライセートを用いて 1 ステップリアルタイム RT-PCR を行う。25 μ l の反応系では、2 μ l 以下のライセートを使用する。調製したライセートは氷上に保持し、20 分以内にリアルタイム RT-PCR を行う。またライセートは -80°C で 2 週間程度保存可能である。

* 4： 1×10^4 cells を超える細胞数で使用する場合は、細胞数に比例して各試薬の使用量を増やしてください。

V. Appendix

V-1. One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B) または One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B) を用いた 1 ステップリアルタイム RT-PCR 実験操作例 (Thermal Cycler Dice® Real Time System II (終売) を用いる場合)

1. 1 ~ 2 μ l の細胞ライセートを反応チューブまたはプレートに分注し、氷上に保持する。
2. 下記に示す反応 Master Mix を氷上で調製する。

2-a) One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B) を使用する場合 < 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
2 × One Step TB Green RT-PCR Buffer 4	12.5 μ l	1 ×
PrimeScript 1 step Enzyme Mix 2	1.0 μ l	
PCR Forward Primer (10 μ M) *1	1.0 μ l	0.4 μ M*2
PCR Reverse Primer (10 μ M) *1	1.0 μ l	0.4 μ M*2
RNase Free dH ₂ O	7.5 ~ 8.5 μ l	
Total	23 ~ 24 μ l	

- * 1 : primer とライセートを直接混合しないでください。ライセートに残存する DNase 活性により primer が分解される場合があります。
- * 2 : 最終 primer 濃度は 0.4 μ M で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ~ 1.0 μ M の範囲で最適な濃度を検討してください。

2-b) One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B) を使用する場合 < 1 反応あたり >

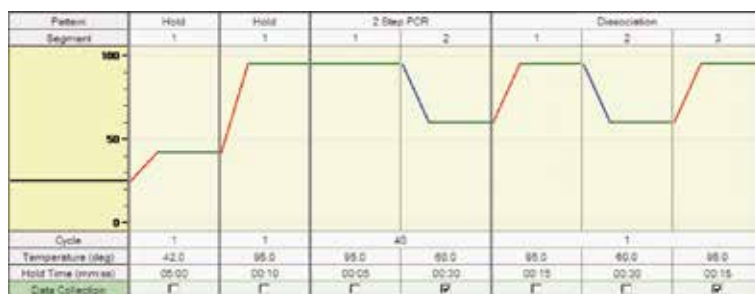
試薬	使用量	最終濃度
2 × One Step TB Green RT-PCR Buffer III	12.5 μ l	1 ×
TaKaRa Ex Taq® HS (5 U/ μ l)	0.5 μ l	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.5 μ l	
PCR Forward Primer (10 μ M) *3	0.5 μ l	0.2 μ M*4
PCR Reverse Primer (10 μ M) *3	0.5 μ l	0.2 μ M*4
RNase Free dH ₂ O	8.5 ~ 9.5 μ l	
Total	23 ~ 24 μ l	

- * 3 : primer とライセートを直接混合しないでください。ライセートに残存する DNase 活性により primer が分解される場合があります。
- * 4 : 最終 primer 濃度は 0.2 μ M で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ~ 1.0 μ M の範囲で最適な濃度を検討してください。

3. 反応を開始する。

細胞ライセートに Master Mix を添加後、よく混合し、反応チューブまたはプレートを遠心機で軽く遠心後、Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売) にセットして反応を開始する。^{*5}

* 5：反応は下記の標準プロトコルで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコルを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。Tm 値が低めのプライマーなどシャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。



Pattern 1：逆転写反応
 Hold
 42°C 5分
 95°C 10秒
 Pattern 2：PCR 反応
 Cycle：40
 95°C 5秒
 60°C 30秒
 Pattern 3：Dissociation

※ 使用上の注意

TaKaRa Ex Taq HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 Taq 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95°C、(5 ~) 15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。

PCR 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95°C、10 秒で充分です。

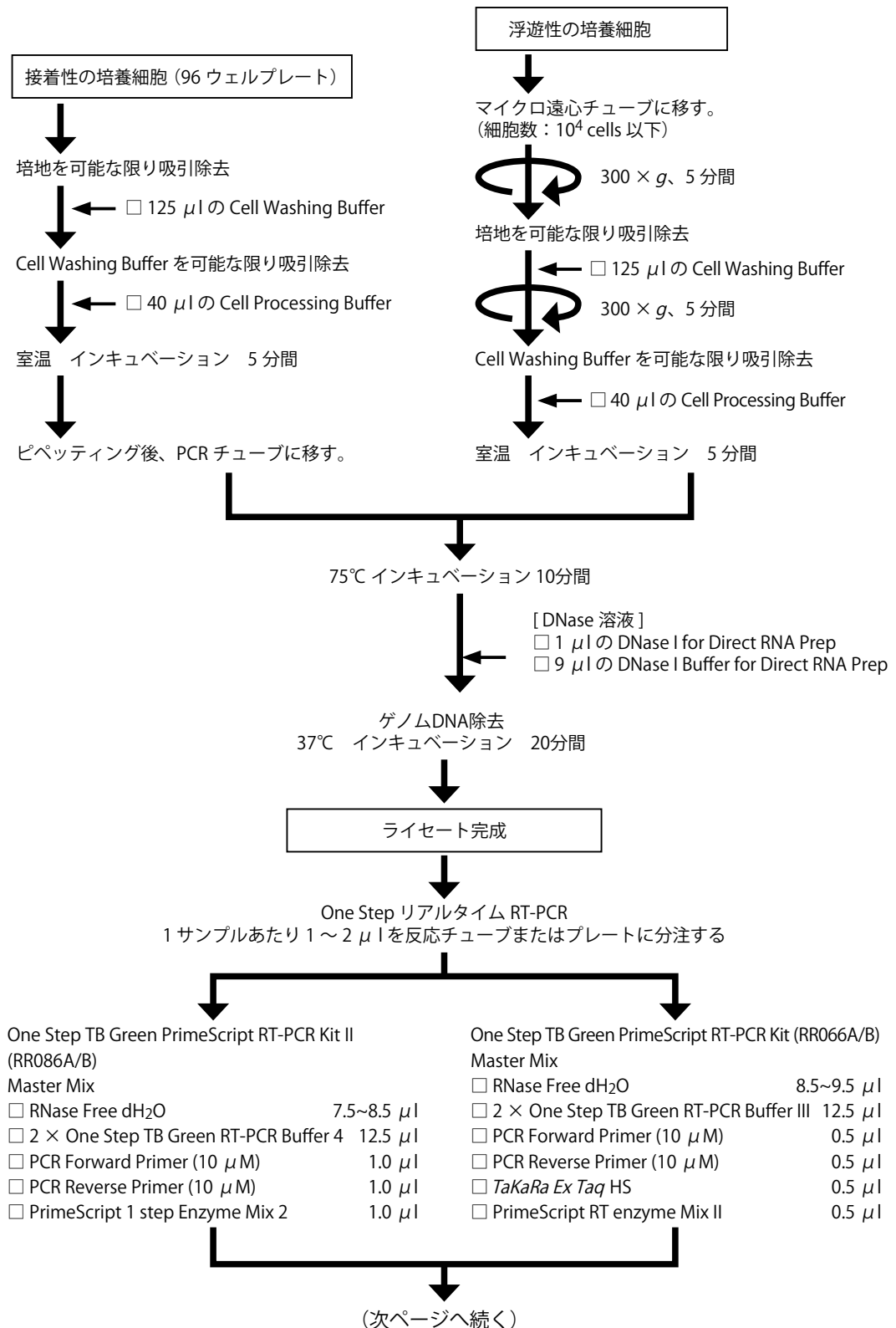
4. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認する。

V-2. 使用する培養プレートによる播種する接着細胞数の目安と、各試薬の 1 ウェルあたりの使用量

	96 ウェル	48 ウェル	24 ウェル	12 ウェル	6 ウェル
播種する細胞数目安 (cells/well) ^{*6}	1 × 10 ⁴	2 × 10 ⁴	4 × 10 ⁴	8 × 10 ⁴	2 × 10 ⁵
Cell Washing Buffer	125 μl	250 μl	500 μl	1 ml	2.5 ml
Cell Processing Buffer	40 μl	80 μl	160 μl	320 μl	800 μl
DNase I for Direct RNA Prep	1 μl	2 μl	4 μl	8 μl	20 μl
DNase I Buffer for Direct RNA Prep	9 μl	18 μl	36 μl	72 μl	180 μl

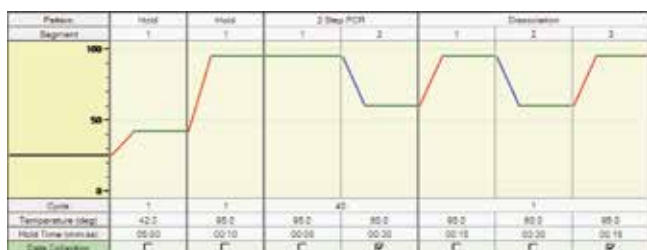
*6：一般的な接着細胞株、培養条件を用いた場合の目安の値です。使用する細胞株、培養条件によっては、播種する細胞数を検討していただき、実験プロトコルを至適化していただく必要があります。

CellAmp Direct RNA Prep Kit 操作フロー



(操作フロー 前ページより続く)

↓
反応を開始する



Pattern 1 : 逆転写反応
Hold
42°C 5分
95°C 10秒
Pattern 2 : PCR 反応
Cycles : 40
95°C 5秒
60°C 30秒
Pattern 3 : Dissociation

↓
反応終了後、解析を行う

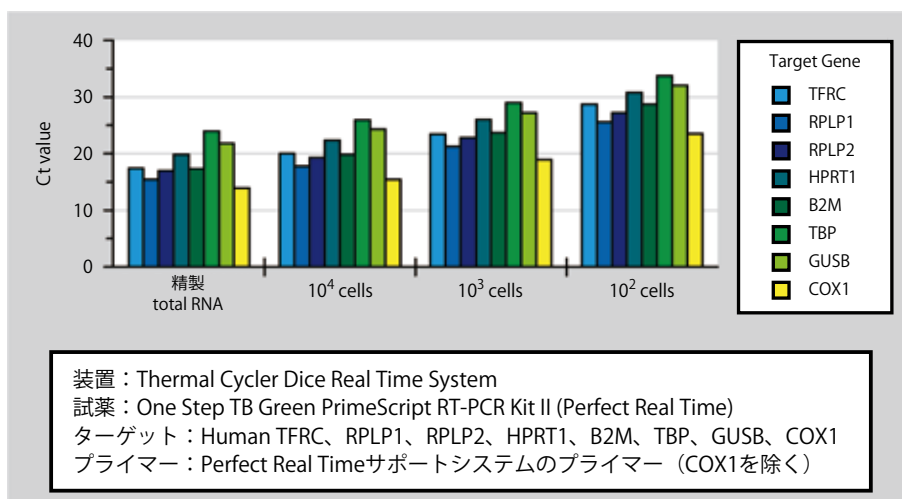
VI. 実験例：遺伝子発現プロファイルの解析

[方法]

24 ウェルプレートに HeLa 細胞を 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 cells/well で播種し、72 時間培養した後にプロトコルに従ってライセートを調製し、鋳型サンプルとした。8 種類の遺伝子をターゲットに 1 ステップリアルタイム RT-PCR で遺伝子発現解析を行った。実験のコントロールとして精製した total RNA (100 ng) を用い、同様に遺伝子発現解析を行った。

[結果]

細胞数を変えて 8 種類の遺伝子をターゲットに遺伝子発現解析を行ったところ、どの細胞数からも高純度に精製された RNA を用いた場合と同等の安定した遺伝子発現のプロファイルを得ることができました。



図：8 種類の遺伝子をターゲットにした遺伝子発現解析の結果

VII. トラブルシューティング

リアルタイム RT-PCR で増幅が見られない。

- PCR プライマーの設計を検討してください。リアルタイム RT-PCR を効率的に行うには、反応性の良い PCR プライマーを設計することが重要です。PCR プライマーの設計方法は、One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B)、One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B) および One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B) の取扱説明書に記載されている「プライマー設計について」をご参照ください。
- 細胞株や培養条件によっては、播種する細胞数を検討していただき、実験プロトコルを最適化していただく必要があります。
- Cell Washing Buffer で細胞を洗浄し、細胞培養液中に含まれる夾雑物を除去してください。また、培地や Cell Washing Buffer は可能な限り吸引除去してください。
- 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応液を氷上で調製し、調製後は反応開始まで遮光して氷上に置いてください。
- RT-PCR に添加するライセート量が多すぎると、反応効率が低下することがあります。
- 調製したライセートと PCR プライマーを直接混合しないでください。ライセートに残存する DNase 活性により Primer が分解される場合があります。反応液調製時は、ライセート以外のコンポーネントで Master Mix を調製し、ライセートを含んだ反応チューブに Master Mix を添加してください。

VIII. 関連製品

One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B)
One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B)

<リアルタイム PCR 用 Housekeeping Gene Primer Set >

Human Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3790)

Mouse Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3791)

Rat Housekeeping Gene Primer Set (製品コード 3792)

Perfect Real Time サポートシステム (<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/>) *

* : Perfect Real Time サポートシステムは、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ、イネ、シロイヌナズナの RefSeq 登録遺伝子または Ensembl Plants 登録遺伝子の発現解析のためのインターカレーター法 (TB Green 検出) によるリアルタイム RT-PCR 用プライマーを、オンラインで検索 & ご注文いただけるシステムです。

本システムのプライマーは、2 ステップリアルタイム RT-PCR の系に最適化されていますが、上記キットを用いる 1 ステップリアルタイム RT-PCR にもご利用いただけます。ただ、プライマーによっては 1 ステップの系では十分に性能を発揮できない場合があります。

IX. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- TB Green、Thermal Cycler Dice、*TaKaRa Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。CellAmp、PrimeScript はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社