

製品コード 3732

研究用

---

**Takara**

**CellAmp™ Direct RNA Prep Kit  
for 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ステップおよび2ステップリアルタイム RT-PCR用の鋳型サンプルを調製するためのキットです。本キットを使用することで培養細胞から最短 10 分間で鋳型サンプルを調製することができ、One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B) などの1ステップリアルタイム RT-PCR 試薬と組み合わせて使用すると、約 2 時間で遺伝子発現解析を行うことが可能です。また、逆転写試薬 PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B) と組み合わせて使用することで、約 30 分でリアルタイム PCR用の鋳型 cDNA を合成することができます。本キットでは細胞から直接鋳型となるサンプルを調製しますが、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、わずか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、ゲノム DNA の除去が効果的に行えるため、ゲノム DNA の混入が問題になる解析 (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、低発現遺伝子の発現解析を行う場合など) でも威力を発揮します。

【本製品と組み合わせ可能なリアルタイム RT-PCR 関連製品】

1 ステップリアルタイム RT-PCR

製品コード	製品名
RR096A/B	One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)
RR086A/B	One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)
RR066A/B	One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)
RR064A/B	One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)

2 ステップリアルタイム RT-PCR

製品コード	製品名
RR037A/B	PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)
RR036A/B	PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)
RR820S/A/B	TB Green <i>Premix Ex Taq</i> ™ II (Tli RNaseH Plus)
RR420S/A/B	TB Green <i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus)
RR091A/B	TB Green Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time)
RR390A/B	<i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR)

I. 内容\*

CellAmp Washing Buffer	12.5 ml × 2
CellAmp Processing Buffer	10 ml
DNase I for Direct RNA Prep	200 μl

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

【本製品以外に必要な試薬】

- ・上記リストに記載のリアルタイム RT-PCR 関連製品
- ・Proteinase K (製品コード 9034)  
Proteinase K プロトコール (オプション) を行う場合に必要です。

---

## II. 保存 - 20℃

CellAmp Washing Buffer および CellAmp Processing Buffer は融解後、4℃で保存可能です。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

- ・本キットは、2 ページのリストに記載のリアルタイム RT-PCR 関連製品と組み合わせて使用してください。
- ・CellAmp Washing Buffer および CellAmp 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。
- ・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。
- ・試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

### 【RNA を取り扱う際の一般的注意事項】

- ・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使用してください。
- ・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) 使用してください。RNA 実験用の器具類は他と明確に区別しておく必要があります。
- ・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 (標準プロトコール)

### IV-1. 試薬の準備

マイクロ遠心チューブに下記に示す Processing 溶液を氷上で調製する。

試薬	96 ウェルプレート*1 ウェル当たり
CellAmp Processing Buffer	49 $\mu$ l
DNase I for Direct RNA Prep	1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

\* : 他のタイプのプレートを使用する場合は、V-3 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 (96 ウェルプレートの場合\*1)

- 1) 96 ウェルプレートの各ウェルに V-3 を参照して適切な数の細胞を播種する。
- 2) 実験プロトコ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  $\mu$ l の CellAmp Washing Buffer を加える。
- 5) CellAmp Washing Buffer を可能な限り吸引除去する。
- 6) 各ウェルに 50  $\mu$ l の Processing 溶液を添加し、室温 (25°C前後) 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ペットティングした後、PCR チューブまたは適当容量のマイクロ遠心チューブに移し、75°Cで 5 分間インキュベートする。
- 8) 得られた細胞ライセートを用いて、「V-1, 2」に記載の実験操作例を参考に、2 ページのリストの各リアルタイム RT-PCR 関連製品のプロトコルに従いリアルタイム RT-PCR を行う。\*2

\* 1 : 他のタイプのプレートをご使用の場合は、V-3 をご参照ください。

\* 2 : 25  $\mu$ l の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系および 10  $\mu$ l の逆転写反応系に対して、必ず 2  $\mu$ l 以下の細胞ライセートを用いてください。調製した細胞ライセートは氷上に保持し、速やかに\*3 リアルタイム RT-PCR を行ってください。また、細胞ライセートを長時間保存する場合は、- 80°Cで保存してください。その場合、少なくとも 2 週間程度保存可能です。

\* 3 : 一般的な細胞株、培養条件より得た細胞ライセートの場合、少なくとも 1 時間は氷上で安定であることを確認しています。ただし、細胞ライセートの安定性はご使用の細胞・培養条件にも影響されますので、ご使用の培養細胞から細胞ライセートを調製いただき、氷上での安定性をあらかじめ確認いただくことをお勧めします。

## 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、 $1 \times 10^4$  cells 以下の細胞を、適当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  $\mu$ l\*1 の CellAmp Washing Buffer を加える。
- 5) 300  $\times g$  で 5 分間遠心操作を行う。
- 6) CellAmp Washing Buffer を可能な限り吸引除去する。
- 7) 50  $\mu$ l\*1 の Processing 溶液を添加し、室温 (25°C前後) で 5 分間インキュベートする。
- 8) 細胞溶解液を数回ピペットティングした後、PCR チューブまたは適当容量のマイクロ遠心チューブに移し、75°Cで 5 分間インキュベートする。
- 9) 得られた細胞ライセートを用いて、「V-1, 2」に記載の実験操作例を参考に、2 ページのリストの各リアルタイム RT-PCR 関連製品のプロトコルに従いリアルタイム RT-PCR を行う。\*2

\* 1 :  $1 \times 10^4$  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。

\* 2 : 25  $\mu$ l の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系および 10  $\mu$ l の逆転写反応系に対して、必ず 2  $\mu$ l 以下の細胞ライセートを用いてください。調製した細胞ライセートは氷上に保持し、速やかに\*3 リアルタイム RT-PCR を行ってください。また、細胞ライセートを長時間保存する場合は、- 80°Cで保存してください。その場合、少なくとも 2 週間程度保存可能です。

\* 3 : 一般的な細胞株、培養条件より得た細胞ライセートの場合、少なくとも 1 時間は氷上で安定であることを確認しています。ただし、細胞ライセートの安定性はご使用の細胞・培養条件にも影響されますので、ご使用の培養細胞から細胞ライセートを調製いただき、氷上での安定性をあらかじめ確認いただくことをお勧めします。

## V. Appendix

### V-1. One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/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  $\mu\text{l}$ \*1 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。  
\* 1: 25  $\mu\text{l}$  の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系では、2  $\mu\text{l}$  以下の細胞ライセートを使用してください。
- 2) 下記に示す反応 Master Mix を氷上で調製する。

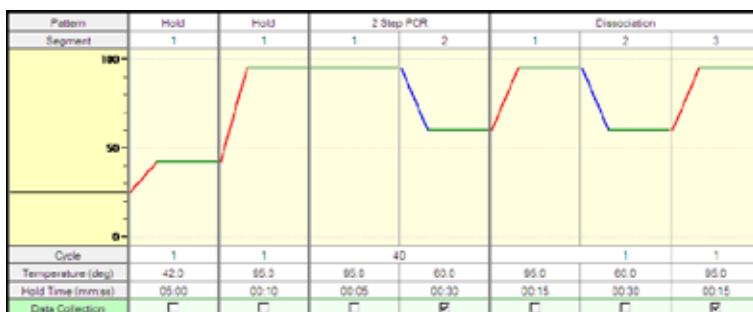
< 1 反応あたり >

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

\* 2: 最終 primer 濃度は 0.4  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

- 3) 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、反応を開始する。

※ 反応は、下記の条件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。T<sub>m</sub> 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

Cycles: 40  
95°C 5秒  
60°C 30秒

Pattern 3: Dissociation

#### ※ 使用上の注意

PrimeScript 1 step Enzyme Mix 2 に含まれる *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. PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B) および TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B) を用いた 2 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)**

**【逆転写反応：PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B)】**

- 1) 下記に示す逆転写反応 Master Mix を氷上で調製する。  
RNA サンプル以外のコンポーネントを必要本数 +  $\alpha$  分調製し、マイクロ遠心チューブに分注後、RNA サンプルを添加すると良い。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
5 × PrimeScript Buffer (for Real Time)	2.0 $\mu$ l	1 ×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 $\mu$ l	
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	50 pmol
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.5 ~ 5.5 $\mu$ l	
Total*2	8 ~ 9 $\mu$ l	

\* 1 : Oligo dT Primer と Random 6 mers の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率良く cDNA が合成されます。なお、各プライマーを単独で用いる場合および Gene Specific Primer の場合の使用量は以下のとおりです。

試薬	使用量	添加量
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	50 pmol
Gene Specific Primer (2 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	1 pmol

\* 2 : 逆転写反応は、必要に応じてスケールアップすることも可能です。

- 2) 逆転写反応 Master Mix を反応チューブに分注し、1 ~ 2  $\mu$ l\*3 の細胞ライセートを添加した後、よく混合し、反応チューブを遠心機で軽く遠心後、逆転写反応を行う。

37°C 15 分\*4 (逆転写反応)  
85°C 5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)  
4°C

\* 3 : 10  $\mu$ l の逆転写反応系では、2  $\mu$ l 以下の細胞ライセートを使用してください。

\* 4 : Gene Specific Primer を用いる場合：  
逆転写反応を 42°C、15 分で行ってください。PCR で非特異的な増幅が生じた場合には、逆転写温度を 50°C に変更すると改善される場合があります。

(注) 2. で得た逆転写反応液をリアルタイム PCR の系に持ち込む場合には、PCR 反応液容量 10% までとしてください。

【リアルタイムPCR反応:TB Green *Premix Ex Taq II* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)】

- 3) 2  $\mu$ l の逆転写反応液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。
- 4) 下記に示す反応 Master Mix を氷上で調製する。

< 1 反応あたり >

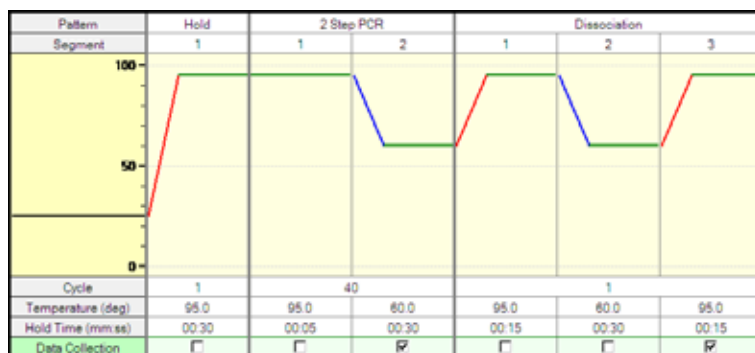
試薬	使用量	最終濃度
TB Green <i>Premix Ex Taq II</i> (2 $\times$ )	12.5 $\mu$ l	1 $\times$
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M*5
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M*5
滅菌精製水	8.5 $\mu$ l	
Total	23 $\mu$ l*6	

\* 5 : 最終 primer 濃度は 0.4  $\mu$ 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  $\mu$ M の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

\* 6 : 反応液量は 25  $\mu$ l を推奨。

- 5) 逆転写反応液に 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、反応を開始する。

※ PCR 反応は、下記条件のシャトル PCR で行うことをお勧めします。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 : (初期変性)

Hold  
95°C 30 秒

Pattern 2 : PCR 反応

Cycles : 40  
95°C 5 秒  
60°C 30 秒

Pattern 3 : Dissociation

※ 使用上の注意

TB Green *Premix Ex Taq II* に含まれる *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 反応前に鋳型の初期変性を行うには、通常 95°C 30 秒で充分です。

- 6) 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認する。

### V-3. 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 (標準プロトコール)

培養プレート	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) *	$1 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	$8 \times 10^4$	$2 \times 10^5$
CellAmp Washing Buffer	125 $\mu$ l	250 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml	2.5 ml
CellAmp Processing Buffer	49 $\mu$ l	98 $\mu$ l	196 $\mu$ l	392 $\mu$ l	980 $\mu$ l
DNase I for Direct RNA Prep	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	8 $\mu$ l	20 $\mu$ l

\* : 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、実験プロトコールを至適化していただく必要があります。

### V-4. Proteinase K プロトコール (オプション)

本製品では、通常、IV-1 ~ 3 に従いライセートを調製いただくことで十分再現性のある結果が得られることを確認していますが、一度に大量のサンプルを処理する必要がある場合など、Ct 値のバラつきが気になるような時には、本プロトコールに従いライセートを調製いただくことで、問題が改善される場合があります。

【注意】本プロトコールを行う際は、Proteinase K (製品コード 9034) を別途ご準備ください。

#### V-4-1. 試薬の準備

- ・マイクロ遠心チューブに下記に示す Processing 溶液を氷上で調製する。

試薬	96 ウェルプレート*1 5 ウェル当たり
CellAmp Processing Buffer	199 $\mu$ l
Proteinase K (製品コード 9034)	1 $\mu$ l
Total	200 $\mu$ l

- ・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
CellAmp Processing Buffer	9 $\mu$ l
DNase I for Direct RNA Prep	1 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

\* 1 : 他のタイプのプレートを使用する場合は、V-4-4 をご参照ください。



---

## V-4-2. 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\*1 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  $\mu\text{l}$ \*2 の CellAmp Washing Buffer を加える。
- 5) CellAmp Washing Buffer を可能な限り吸引除去する。
- 6) 各ウェルに 40  $\mu\text{l}$ \*2 の Processing 溶液を添加し、室温 (25°C前後) 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 チューブまたは適当容量のマイクロ遠心チューブに移し、75°Cで 5 分間インキュベートする。
- 8) 氷上で冷やした後、各サンプルに 10  $\mu\text{l}$ \*2 の DNase 溶液を添加し、37°C、5 分間の DNase 反応を行った後、75°C、5 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) 得られた細胞ライセートを用いて、「V-1、2」に記載の実験操作例を参考に、2 ページのリストの各リアルタイム RT-PCR 関連製品のプロトコールに従いリアルタイム RT-PCR を行う。\*3

\* 1：播種する細胞数については、V-4-4 をご参照ください。

\* 2：他のタイプのプレートをご使用の場合は、VI-4-4 をご参照ください。

\* 3：25  $\mu\text{l}$  の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系および 10  $\mu\text{l}$  の逆転写反応系に対して、必ず 2  $\mu\text{l}$  以下の細胞ライセートを用いてください。調製した細胞ライセートは氷上に保持し、速やかに\*4 リアルタイム RT-PCR を行ってください。また、細胞ライセートを長時間保存する場合は、- 80°Cで保存してください。その場合、少なくとも 2 週間程度保存可能です。

\* 4：一般的な細胞株、培養条件より得た細胞ライセートの場合、少なくとも 1 時間は氷上で安定であることを確認しています。ただし、細胞ライセートの安定性はご使用の細胞・培養条件にも影響されますので、ご使用の培養細胞から細胞ライセートを調製いただき、氷上での安定性をあらかじめ確認いただくことをお勧めします。

### V-4-3. 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、 $1 \times 10^4$  cells 以下の細胞を、適当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)  $125 \mu\text{l}^*1$  の CellAmp Washing Buffer を加える。
- 5)  $300 \times g$  で 5 分間遠心操作を行う。
- 6) CellAmp Washing Buffer を可能な限り吸引除去する。
- 7)  $40 \mu\text{l}^*1$  の Processing 溶液を添加し、室温 ( $25^\circ\text{C}$ 前後) で 5 分間インキュベートする。
- 8) 細胞溶解液を数回ピッペッティングした後、PCR チューブまたは適当容量のマイクロ遠心チューブに移し、 $75^\circ\text{C}$  で 5 分間インキュベートする。
- 9) 氷上で冷やした後、各サンプルに  $10 \mu\text{l}^*2$  の DNase 溶液を添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5 分間の DNase 反応を行った後、 $75^\circ\text{C}$ 、5 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) 得られた細胞ライセートを用いて、「V-1、2」に記載の実験操作例を参考に、2 ページのリストの各リアルタイム RT-PCR 関連製品のプロトコールに従いリアルタイム RT-PCR を行う。<sup>\*3</sup>

\* 1 :  $1 \times 10^4$  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。

\* 2 : 他のタイプのプレートをご使用の場合は、V-4-4 をご参照ください。

\* 3 :  $25 \mu\text{l}$  の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系および  $10 \mu\text{l}$  の逆転写反応系に対して、必ず  $2 \mu\text{l}$  以下の細胞ライセートを用いてください。調製した細胞ライセートは氷上に保持し、速やかに<sup>\*4</sup>リアルタイム RT-PCR を行ってください。また、細胞ライセートを長時間保存する場合は、 $-80^\circ\text{C}$  で保存してください。その場合、少なくとも 2 週間程度保存可能です。

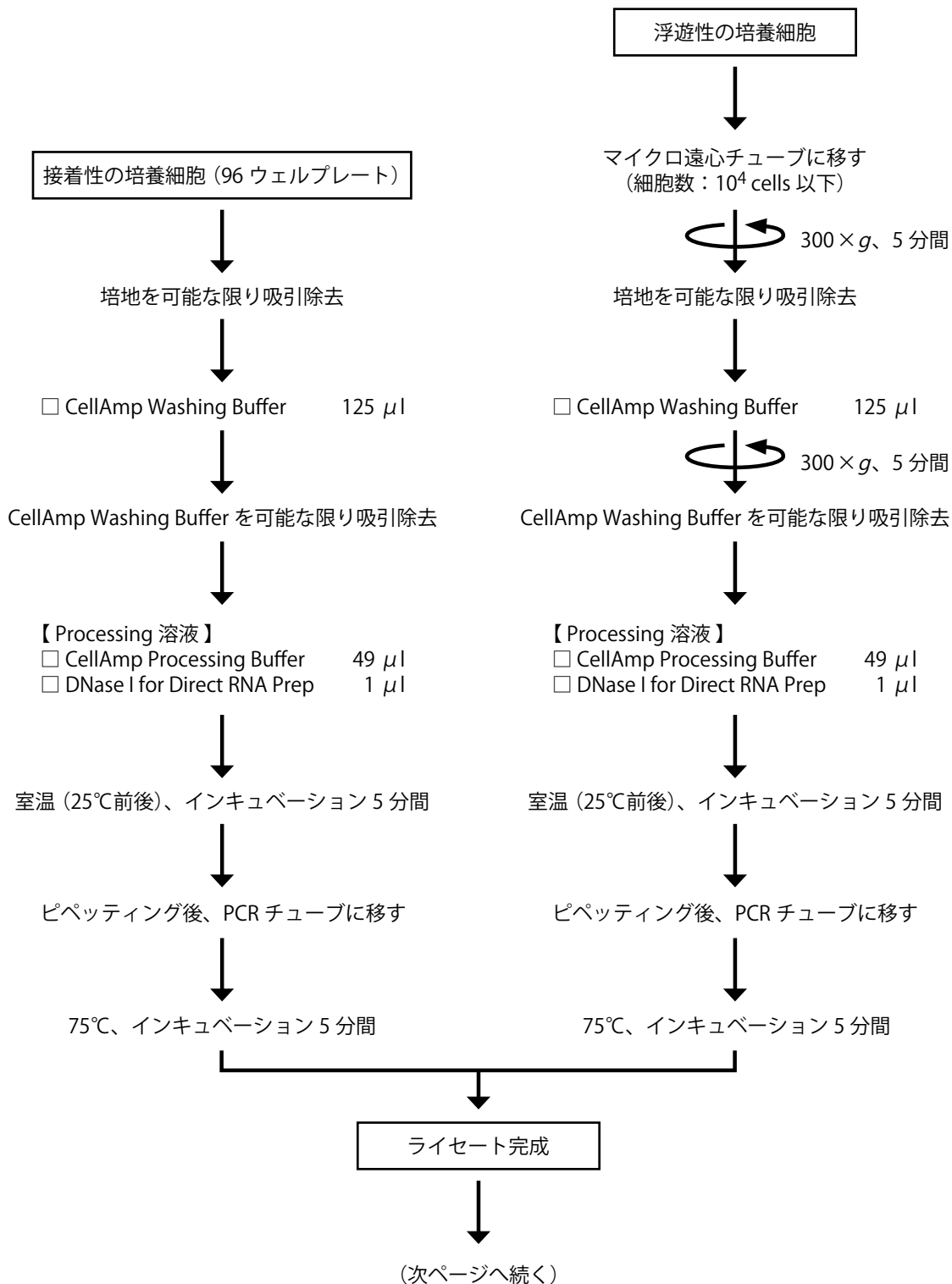
\* 4 : 一般的な細胞株、培養条件より得た細胞ライセートの場合、少なくとも 1 時間は氷上で安定であることを確認しています。ただし、細胞ライセートの安定性はご使用の細胞・培養条件にも影響されますので、ご使用の培養細胞から細胞ライセートを調製いただき、氷上での安定性をあらかじめ確認いただくことをお勧めします。

### V-4-4. 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 (Proteinase K オプションプロトコール)

培養プレート	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) *	$1 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	$8 \times 10^4$	$2 \times 10^5$
CellAmp Washing Buffer	$125 \mu\text{l}$	$250 \mu\text{l}$	$500 \mu\text{l}$	1 ml	2.5 ml
<b>【Processing 溶液】</b>					
CellAmp Processing Buffer	$39.8 \mu\text{l}$	$79.6 \mu\text{l}$	$159.2 \mu\text{l}$	$318.4 \mu\text{l}$	$796 \mu\text{l}$
Proteinase K (製品コード 9034)	$0.2 \mu\text{l}$	$0.4 \mu\text{l}$	$0.8 \mu\text{l}$	$1.6 \mu\text{l}$	$4 \mu\text{l}$
<b>【DNase 溶液】</b>					
CellAmp Processing Buffer	$9 \mu\text{l}$	$18 \mu\text{l}$	$36 \mu\text{l}$	$72 \mu\text{l}$	$180 \mu\text{l}$
DNase I for Direct RNA Prep	$1 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l}$	$4 \mu\text{l}$	$8 \mu\text{l}$	$20 \mu\text{l}$

\* : 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、実験プロトコールを至適化していただく必要があります。

【 CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (Real Time) 実験操作例フロー（標準プロトコール） 】



(操作フロー 前ページより続く)

### 1 ステップリアルタイム RT-PCR

1 反応あたり 1 ~ 2  $\mu$ l の細胞ライセートを  
反応チューブまたはプレートに添加する

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

#### 【Master Mix】

- < 1 反応あたり >
- RNase Free dH<sub>2</sub>O 7.5~8.5  $\mu$ l
  - 2 × One Step TB Green RT-PCR Buffer 4 12.5  $\mu$ l
  - PCR Forward Primer (10  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ l
  - PCR Reverse Primer (10  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ l
  - PrimeScript 1 step Enzyme Mix 2 1.0  $\mu$ l

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

### 2 ステップリアルタイム RT-PCR

PrimeScript RT reagent Kit (製品コード RR037A/B)

#### 【Master Mix】

< 1 反応あたり >

- RNase Free dH<sub>2</sub>O 4.5~5.5  $\mu$ l
- 5 × PrimeScript Buffer (for Real Time) 2.0  $\mu$ l
- Oligo dT Primer (50  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l
- Random 6 mers (100  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l
- PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5  $\mu$ l

1 反応あたり 1 ~ 2  $\mu$ l の細胞ライセートを添加する

37°C 15分 (逆転写反応)

85°C 5秒 (逆転写酵素を熱失活させる)

4°C

1 反応あたり 2  $\mu$ l の逆転写反応液を  
反応チューブまたはプレートに添加する

TB Green Premix Ex Taq II (製品コード RR820S/A/B)

#### 【Master Mix】

< 1 反応あたり >

- 滅菌精製水 8.5  $\mu$ l
- PCR Forward Primer (10  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ l
- PCR Reverse Primer (10  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ l
- TB Green Premix Ex Taq II (2 ×) 12.5  $\mu$ l

反応を開始する



Pattern 1 : (初期変性)

Hold

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

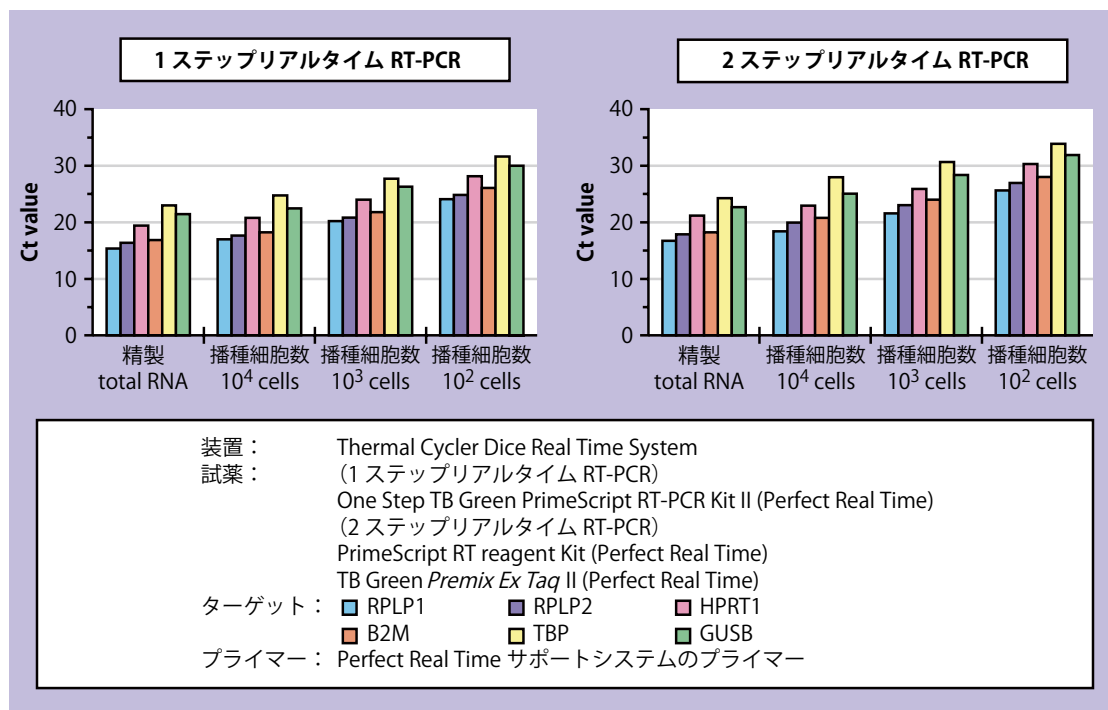
## VI. 実験例：遺伝子発現プロファイルの解析

### 【方法】

96 ウェルプレートに HeLa 細胞を  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$  cells/well で播種し、48 時間培養した後、プロトコールに従ってそれぞれライセート 50  $\mu$ l を調製した。各ライセートを 1 ステップおよび 2 ステップリアルタイム RT-PCR の鋳型サンプルとし、6 種類の遺伝子をターゲットに遺伝子発現解析を行った。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】

1 ステップおよび 2 ステップリアルタイム RT-PCR のいずれの場合にも、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結果がいずれの細胞数からも得られました。



図：6 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 で増幅が観られない。

- NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) や RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) で高純度に精製した total RNA をコントロールにリアルタイム RT-PCR を行い、増幅が観られるか確認してください。
- 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、弊社ウェブサイト「リアルタイム PCR 実験のススメ (<https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/>)」内の「リアルタイム PCR 実験ガイド」、または各リアルタイム PCR 試薬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、実験プロトコルを至適化していただく必要があります。
- CellAmp 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 CellAmp Washing Buffer は可能な限り吸引除去してください。
- リアルタイム 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。
- 1ステップリアルタイム RT-PCR 反応または 2ステップリアルタイム RT-PCR の際に逆転写反応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。

---

## VIII. 関連製品

### [リアルタイム PCR 試薬]

One Step TB Green® PrimeScrip™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B)  
One Step TB Green® PrimeScrip™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B)  
One Step TB Green® PrimeScrip™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR066A/B)  
One Step PrimeScrip™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR064A/B)  
PrimeScrip™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A/B)  
PrimeScrip™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (製品コード RR036A/B)  
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)  
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)  
TB Green® *Premix DimerEraser*™ (Perfect Real Time) (製品コード RR091A/B)  
*Premix Ex Taq*™ (Probe qPCR) (製品コード RR390A/B)

### [リアルタイム PCR 装置]

Thermal Cycler Dice® Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)  
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)  
CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR System (製品コード 640245/640247/640249)

### [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)

### [リアルタイム RT-PCR 用プライマーオンライン検索&注文システム]

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

\*：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 登録遺伝子に対してリアルタイム RT-PCR 用プライマーが設計済みです (ご注文によりカスタム合成してお届けします)。本キットと組み合わせて、インターカラー法 (TB Green 検出) によるリアルタイム RT-PCR を行うことができます。

本システムのプライマーは、リアルタイム PCR に TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B) または TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B) を用いる 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、本キットを用いた 1 ステップおよび 2 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 はタカラバイオ株式会社の登録商標です。CellAmp、PrimeScript、*Premix Ex Taq*、DimerEraser、CronoSTAR 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**