製品コード 3733

研究用

TaKaRa

# CellAmp™ Direct Prep Kit for RT-PCR (Real Time) & Protein Analysis

説明書

v202201Da

本製品は、動物培養細胞からリアルタイム RT-PCR による mRNA 発現解析およびウェスタンブロットによるタンパク質発現解析の両方に利用可能な細胞ライセートを調製するためのキットです。シンプルなプロトコールにより、培養細胞から最短 10 分でライセートを調製でき、調製した細胞ライセートは、特別な核酸精製やタンパク質抽出ステップを加えることなく、そのままタカラバイオのリアルタイム RT-PCR キット＊の鋳型あるいは通常のウェスタンブロット解析用サンプルとしてご利用いただけます。また、添付の専用 SDS-PAGE 用 Loading Buffer を使用することにより、2- メルカプトエタノール（2-ME）の添加が不要となり、2-ME フリーの環境でウェスタンブロット解析を行うことができます。

＊： 本キットで調製したライセートは、One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR066A/B）などを用いた全工程約 2 時間の迅速、簡便な 1 ステップリアルタイム RT-PCR や逆転写試薬 PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）を用いたリアルタイム PCR 用鋳型 cDNA 調製など、複数のタカラバイオのリアルタイム RT-PCR 関連製品と組み合わせてご使用いただけます。

【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 *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) |
| RR420S/A/B | TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) |
| RR091A/B | TB Green Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time) |
| RR390A/B | *Premix Ex Taq* (Probe qPCR) |

## I. 内容＊1

| | |
|---|---|
| CellAmp Washing Buffer | 12.5 ml × 2 |
| CellAmp Processing Buffer | 10 ml |
| DNase I for Direct RNA Prep | 200 μl |
| 5 × Loading Buffer | 1 ml × 2 |
| 1M DTT (Dithiothreitol) | 100 μl × 2 |

＊1： 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］

上記のリアルタイム RT-PCR 関連製品

ウェスタンブロット関連製品

## II. 保存

CellAmp Washing Buffer＊2、CellAmp Processing Buffer＊、DNase I for Direct RNA Prep、1M DTT：－ 20℃
5 × Loading Buffer：開封後、室温保存

＊2：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、CellAmp Processing Buffer および 5 × Loading 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 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）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、実験者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

・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（1 ウェルあたり） |
|---|---|
| CellAmp Processing Buffer | 49 μl |
| DNase I for Direct RNA Prep | 1 μl |
| Total | 50 μl |

＊1： 他のタイプのプレートを使用する場合は、「V. 3」を参照してください。

・5 × Loading Buffer に 1M DTT を添加する。
使用前にマイクロ遠心チューブに必要量を分注し、100 μl の 5 × Loading Buffer あたり 10 μl の 1M DTT を添加してください。
1 サンプル（細胞ライセート 10 μl）に、2.5 μl の 5 × Loading Buffer（DTT 含む）を使用します。

### IV-2. 接着性の培養細胞からのライセート調製方法

1. 96 ウェルプレートの各ウェルに適切な数の細胞を播種する（V-3 を参照）。
2. 実験プロトコールに従って培養する。
3. 培地を可能な限り吸引除去する。
4. 各ウェルに 125 μl＊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. IV-1 で調製した Processing 溶液 50 μl＊2 を各ウェルに添加し、室温（25℃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℃で 5 分間インキュベートする。
8. ［リアルタイム RT-PCR への利用］
   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

   ＊2： 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。
   ＊3： 25 μl の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系および 10 μl の逆転写反応系に対して、必ず 2 μl 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、長時間、細胞ライセートを保存する場合は、－ 80℃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。

［ウェスタンブロットへの利用］
得られた細胞ライセート 10 μl に 5 × Loading Buffer（DTT 含む）を 2.5 μl 添加し、95℃で 5 分間インキュベートした後、SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析を行う。

## 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、$1 \times 10^4$ ～ $1 \times 10^5$ cells＊5 の細胞を、適当容量のマイクロ遠心チューブに移す。
2. 300 × *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 μl＊6 の CellAmp Washing Buffer を加える。
5. 300 × *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. IV-1 で調製した Processing 溶液を 50 μl＊6 添加し、ピペッティングまたはタッピングにより細胞を懸濁させた後、室温（25℃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℃で 5 分間インキュベートする。
9. ［リアルタイム RT-PCR への利用］
   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。＊7

   ＊ 5： 一般的な浮遊細胞株、培養条件を用いた場合の目安です。使用する細胞株、培養条件によっては、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。
   ＊ 6： $1 \times 10^5$ 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。
   ＊ 7： 25 μl の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系および 10 μl の逆転写反応系に対して、必ず 2 μl 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＊8 リアルタイム RT-PCR を行ってください。また、長時間、細胞ライセートを保存する場合は、－ 80℃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。
   ＊ 8： 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。

［ウェスタンブロットへの利用］
得られた細胞ライセート 10 μl に 5 × Loading Buffer（DTT 含む）を 2.5 μl 添加し、95℃で 5 分間インキュベートした後、SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析を行う。

## V. Appendix

### V-1. 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）

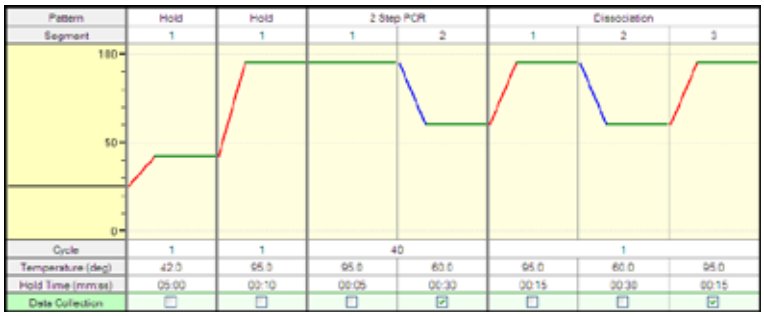
1. 1 ～ 2 μl＊1 の細胞ライセートを反応チューブまたはプレートに分注し、氷上に保持する。
   ＊ 1：25 μl の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系では、2 μl 以下の細胞ライセートを使用してください。

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 III | 12.5 μl | 1 × |
| *TaKaRa Ex Taq*® HS（5 U/μl） | 0.5 μl | |
| PrimeScript RT enzyme Mix II | 0.5 μl | |
| PCR Forward Primer（10 μM） | 0.5 μl | 0.2 μM＊2 |
| PCR Reverse Primer（10 μM） | 0.5 μl | 0.2 μM＊2 |
| RNase Free $dH_2O$ | 8.5 ～ 9.5 μl | |
| Total | 23 ～ 24 μl | |

   ＊ 2：最終 primer 濃度は 0.2 μM 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 μM 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、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずは、このプロトコールを試し、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℃　5 分
95℃　10 秒
Pattern 2：PCR 反応
Cycles：40
95℃　5 秒
60℃　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℃、（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℃ 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）と 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＋α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 μl | 1 × |
| PrimeScript Enzyme Mix I | 0.5 μl | |
| Oligo dT Primer（50 μM）＊1 | 0.5 μl | 25 pmol |
| Random 6 mers（100 μM）＊1 | 0.5 μl | 50 pmol |
| RNase Free $dH_2O$ | 4.5 ～ 5.5 μl | |
| Total＊2 | 8 ～ 9 μl | |

＊1：Oligo dT Primer と Random 6 mers の両方を用いると mRNA 全長にわたり効率よく 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通りです。

| 試薬 | 使用量 | 添加量 |
|---|---|---|
| Oligo dT Primer（50 μM） | 0.5 μl | 25 pmol |
| Random 6 mers（100 μM） | 0.5 μl | 50 pmol |
| Gene Specific Primer（2 μM） | 0.5 μl | 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 μl＊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℃　15 分＊4（逆転写反応）
85℃　5 秒　（逆転写酵素を熱失活させる）
4℃

＊3：10 μl の逆転写反応系では、2 μl 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℃、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℃に変更すると改善される場合があります。

【注意】
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 反応液容量の 10% までとしてください。

3. 2 μl 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＞

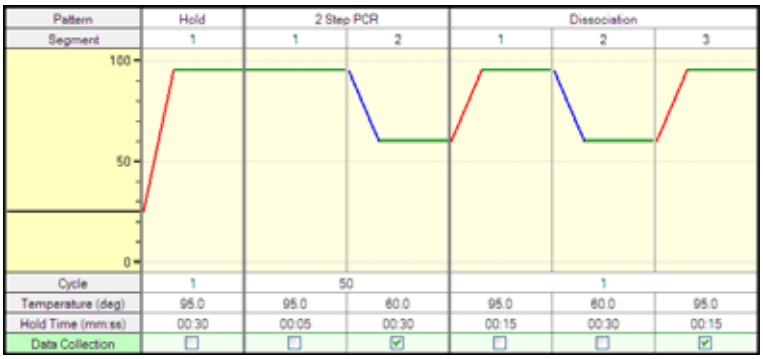
| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|---|---|---|
| TB Green *Premix Ex Taq* II（2 ×） | 12.5 μl | 1 × |
| PCR Forward Primer（10 μM） | 1.0 μl | 0.4 μM＊5 |
| PCR Reverse Primer（10 μM） | 1.0 μl | 0.4 μM＊5 |
| 滅菌精製水 | 8.5 μl | |
| Total | 23 μl ＊6 | |

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

＊6：反応液量は 25 μl 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、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 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：（初期変性）
Hold
95℃　30 秒
Pattern 2：PCR 反応
Cycles：40
95℃　5 秒
60℃　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℃、（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℃ 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 1 ウェルあたりの使用量

| 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 |
|---|---|---|---|---|---|
| 播種する細胞数の目安<br>（cells/well）＊ | $1 \times 10^4$<br>～ $1 \times 10^5$ | $2 \times 10^4$<br>～ $2 \times 10^5$ | $4 \times 10^4$<br>～ $4 \times 10^5$ | $8 \times 10^4$<br>～ $8 \times 10^5$ | $2 \times 10^5$<br>～ $2 \times 10^6$ |
| CellAmp Washing Buffer | 125 μl | 250 μl | 500 μl | 1 ml | 2.5 ml |
| CellAmp Processing Buffer | 49 μl | 98 μl | 196 μl | 392 μl | 980 μl |
| DNase I for Direct RNA Prep | 1 μl | 2 μl | 4 μl | 8 μl | 20 μl |

＊：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. DNase I（－）プロトコール（オプション）

DNase I for Direct RNA Prep の添加によりウェスタンブロット解析に影響がみられる場合は、DNase I for Direct RNA Prep を添加せずに細胞ライセートを調製してください（16 ページ【注意】参照）。ただし、リアルタイム RT-PCR 解析結果へのゲノム DNA による影響を避けるため、PCR 用プライマーはエキソンジャンクションを挟むように設計してください。

### V-4-1. 試薬の準備

5 × Loading Buffer に 1M DTT を添加する。
使用前にマイクロ遠心チューブに必要量を分注し、100 μl の 5 × Loading Buffer あたり 10 μl の 1M DTT を添加してください。
1 サンプル（細胞ライセート 10 μl）に、2.5 μl の 5 × Loading Buffer（DTT 含む）を使用します。

### 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 ウェルプレートの各ウェルに適切な数の細胞を播種する（VI-4-4 を参照）。
2. 実験プロトコールに従って培養する。
3. 培地を可能な限り吸引除去する。
4. 各ウェルに 125 μl＊1 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 μl＊1 の CellAmp Processing Buffer を添加し、室温（25℃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℃で 5 分間インキュベートする。
8. ［リアルタイム RT-PCR への利用］
   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。＊2

   ＊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。
   ＊2： 25 μl の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系および 10 μl の逆転写反応系に対して、必ず 2 μl 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、長時間、細胞ライセートを保存する場合は、－ 80℃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。

   ［ウェスタンブロットへの利用］
   得られた細胞ライセート 10 μl に 5 × Loading Buffer（DTT 含む）を 2.5 μl 添加し、95℃で 5 分間インキュベートした後、SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析を行う。

### 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、$1 \times 10^4$ ～ $1 \times 10^5$ cells＊1 の細胞を、適当容量のマイクロ遠心チューブに移す。
2. 300 × *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 μl の CellAmp Washing Buffer＊2 を加える。
5. 300 × *g* で 5 分間遠心操作を行う。
6. CellAmp Washing Buffer ＊2 を可能な限り吸引除去する。
7. 50 μl の CellAmp Processing Buffer を添加し、ピペッティングまたはタッピングにより細胞を懸濁させた後、室温（25℃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℃で 5 分間インキュベートする。
9. ［リアルタイム RT-PCR への利用］
   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： 一般的な浮遊細胞株、培養条件を用いた場合の目安です。使用する細胞株、培養条件によっては、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。

＊2： $1 \times 10^5$ 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。

＊3： 25 μl の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 反応系および 10 μl の逆転写反応系に対して、必ず 2 μl 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、長時間、細胞ライセートを保存する場合は、－ 80℃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。

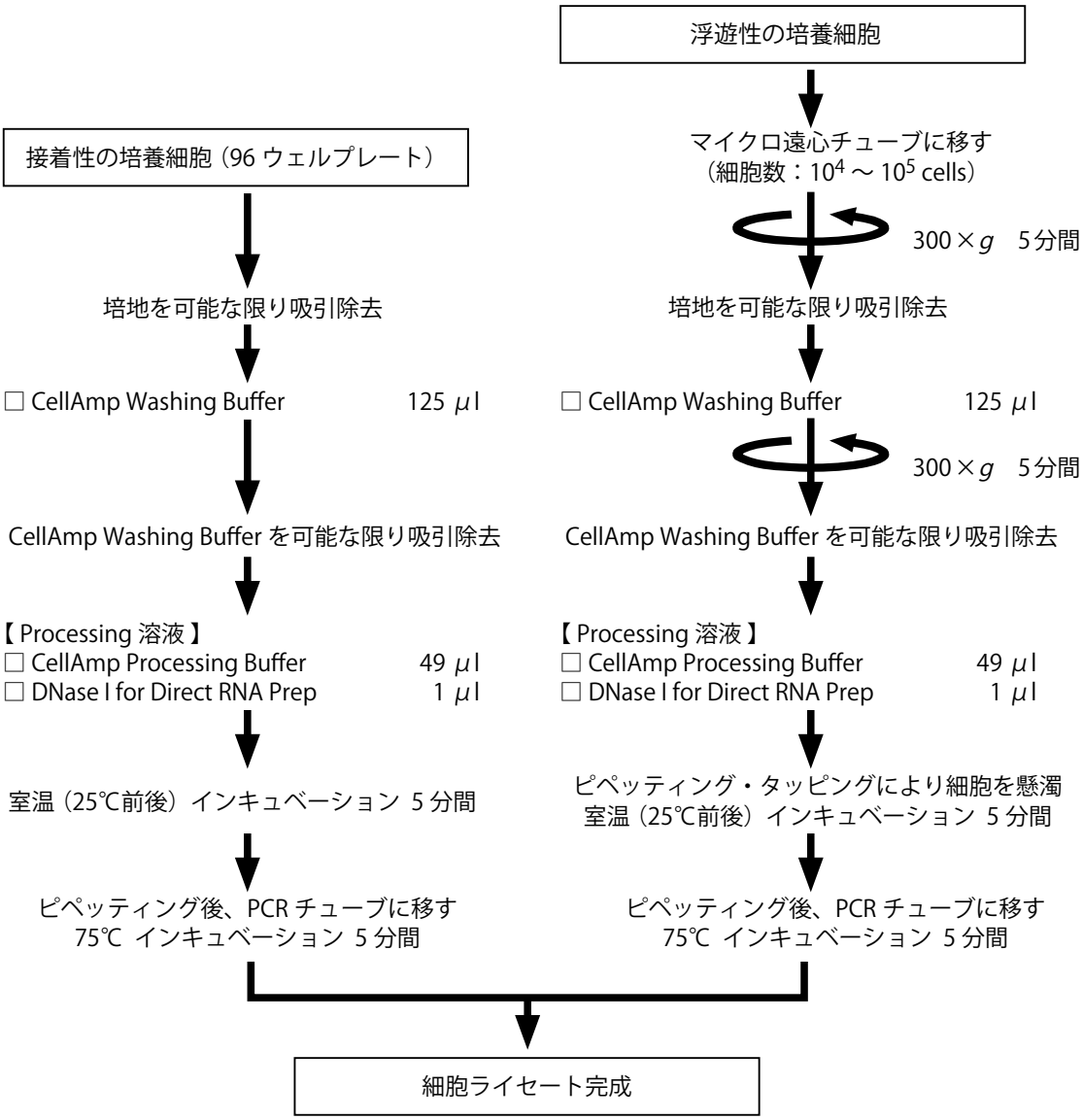
［ウェスタンブロットへの利用］
得られた細胞ライセート 10 μlに 5 × Loading Buffer（DTT 含む）を 2.5 μl添加し、95℃で 5 分間インキュベートした後、SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析を行う。

### 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 1 ウェルあたりの使用量（DNase I（－）プロトコール）

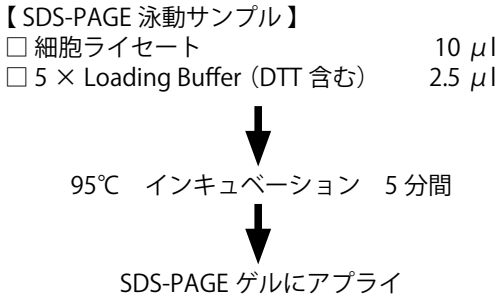
| 培養プレート | 96 ウェル | 48 ウェル | 24 ウェル | 12 ウェル | 6 ウェル |
|---|---|---|---|---|---|
| 播種する細胞数の目安 (cells/well)＊ | $1 \times 10^4$ ～ $1 \times 10^5$ | $2 \times 10^4$ ～ $2 \times 10^5$ | $4 \times 10^4$ ～ $4 \times 10^5$ | $8 \times 10^4$ ～ $8 \times 10^5$ | $2 \times 10^5$ ～ $2 \times 10^6$ |
| CellAmp Washing Buffer | 125 μl | 250 μl | 500 μl | 1 ml | 2.5 ml |
| CellAmp Processing Buffer | 50 μl | 100 μl | 200 μl | 400 μl | 1,000 μl |

＊： 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 Prep Kit for RT-PCR (Real Time) & Protein Analysis 実験操作フロー
接着性・浮遊性の培養細胞からのライセート調製方法




SDS-PAGE 泳動サンプルの調製方法



## 1 ステップリアルタイム RT-PCR

1反応あたり1～2 μl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

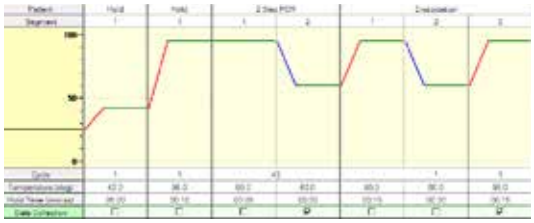
↓

One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit
（製品コード RR066A/B）
[ Master Mix ]
＜ 1 反応あたり ＞

| | |
|---|---|
| □ RNase Free $dH_2O$ | 8.5 ～ 9.5 μl |
| □ 2 × One Step TB Green RT-PCR Buffer III | 12.5 μl |
| □ PCR Forward Primer (10 μM) | 0.5 μl |
| □ PCR Reverse Primer (10 μM) | 0.5 μl |
| □ PrimeScript RT Enzyme Mix II | 0.5 μl |
| □ *TaKaRa Ex Taq* HS | 0.5 μl |

↓

反応を開始する



Pattern 1 : 逆転写反応
　Hold
　42℃　5 分
　95℃　10 秒
Pattern 2 : PCR 反応
　Cycles : 40
　95℃　5 秒
　60℃　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 $dH_2O$ | 4.5 ～ 5.5 μl |
| □ 5× PrimeScript Buffer (for Real Time) | 2.0 μl |
| □ Oligo dT Primer (50 μM) | 0.5 μl |
| □ Random 6 mers (100 μM) | 0.5 μl |
| □ PrimeScript RT Enzyme Mix I | 0.5 μl |

↓

1反応あたり1～2 μlの細胞ライセートを添加する

↓

37℃　15 分（逆転写反応）
85℃　5 秒（逆転写反応を熱失活させる）
4℃

↓

1 反応あたり 2 μl 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

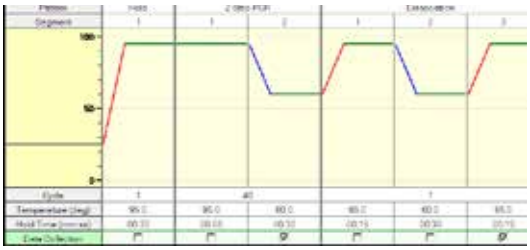
↓

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 μl |
| □ PCR Forward Primer (10 μM) | 1.0 μl |
| □ PCR Reverse Primer (10 μM) | 1.0 μl |
| □ TB Green *Premix Ex Taq* II (2 × ) | 12.5 μl |

↓

反応を開始する



Pattern 1 :（初期変性）
　Hold
　95℃　30 秒

Pattern 2 : PCR 反応
　Cycles : 40
　95℃　5 秒
　60℃　30 秒
Pattern 3 : Dissociation

↓

反応終了後、解析を行う

## VI. 実験例： 薬剤刺激によるヘムオキシゲナーゼ -1（Hmox1）の mRNA/ タンパク質発現量の経時的変化の解析

RAW264.7 細胞を Hmox1 誘導剤で刺激し、誘導された Hmox1 mRNA および Hmox1 タンパクの経時的な発現量の変化を、本キットで調製した細胞ライセートを用いて解析した。

【方法】

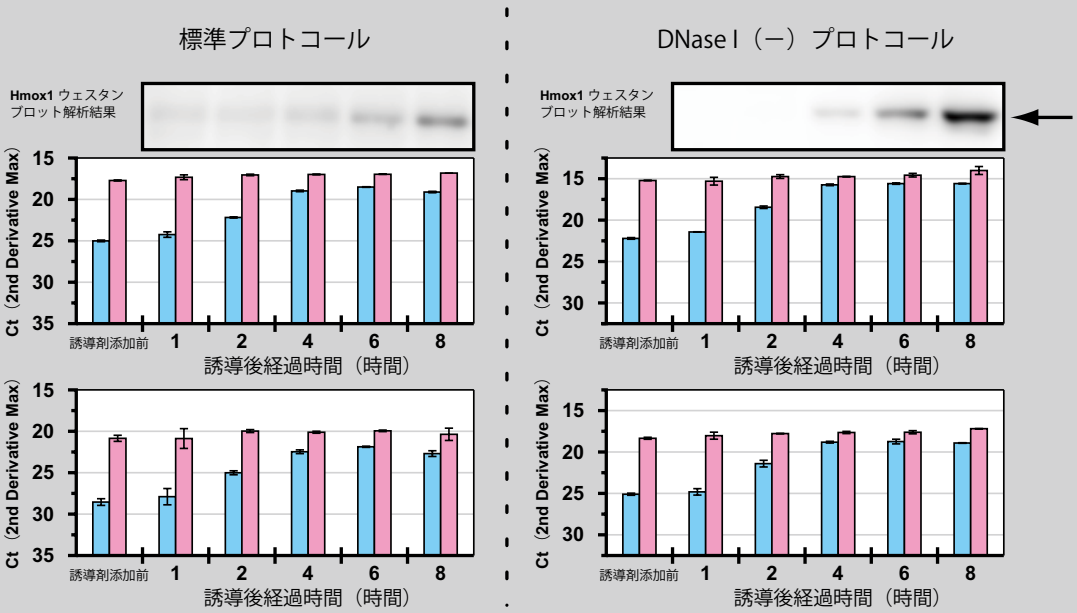
24 ウェルプレートに RAW264.7 細胞を 4 × $10^5$ cells/well で播種し、約 16 時間培養した後、Hmox1 誘導剤を添加した。誘導剤添加 1、2、4、6、8 時間後に本製品のプロトコールに従って細胞ライセート 200 μl を調製した。コントロールとして誘導剤添加を行わなかった細胞からも同様にライセートを調製した。

1. リアルタイム RT-PCR による Hmox1 mRNA 発現解析
   細胞ライセート原液および CellAmp Processing Buffer を用いて調製した 10 倍希釈ライセートのそれぞれ 2 μl を鋳型として、One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) を用いたリアルタイム RT-PCR により Hmox1 mRNA の発現解析を行った。コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である Gapdh についても同様に mRNA の発現解析を行った。

2. ウェスタンブロットによる Hmox1 タンパクの発現解析
   細胞ライセート原液 10 μl に 5 × Loading Buffer（DTT 含む）を 2.5 μl 添加し、95℃で 5 分間熱処理した後、SDS-PAGE を行った。Hmox1 タンパクは、Anti-Heme Oxygenase-1 (GST-1), Monoclonal, POD と HRP 検出化学発光基質で処理し、LuminoShot 400Jr を用いて検出した（シグナル検出時間、1 分間）。

【結果】

細胞ライセート原液および 10 倍希釈液を用いたいずれのリアルタイム RT-PCR 結果からも、誘導剤添加後、経過時間とともに Hmox1 の Ct 値は小さくなり mRNA 発現量が増加していることが確認できました。ウェスタンブロットによる Hmox1 タンパク質のシグナルが誘導剤添加後時間経過とともに強く検出されたことから、リアルタイム RT-PCR による mRNA の発現解析結果と同様に、Hmox1 タンパク質の発現量も増加することが確認できました。




リアルタイム RT-PCR の結果
サンプル　：　細胞ライセート原液（上図）
　　細胞ライセート 10 倍希釈液（下図）
試薬　：　One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)
装置　：　Thermal Cycler Dice Real Time System
測定遺伝子　：　Mouse Hmox 1
　　Mouse Gapdh
プライマー　：　Perfect Real Time サポートシステムによる設計

図 1：ウェスタンブロット解析結果とリアルタイム RT-PCR 結果との比較

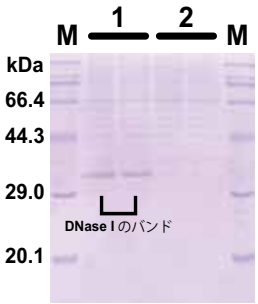
## VII. トラブルシューティング

1. 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）や RNAiso Plus（製品コード 9108/9109）など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」を参照してください。
   - 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、実験プロトコー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 および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。

2. ウェスタンブロット解析でシグナルが観られない。
   - 細胞数が少ないためウェスタンブロット解析でシグナルが観られない可能性があります。この場合、「V-3」や「V-4-4」に記載されている細胞数の目安よりも多い細胞数で検討していただき、実験プロトコールを至適化してください。ただし、細胞数が多すぎると、リアルタイム RT-PCR の反応効率が低下することがあります。この場合、リアルタイム RT-PCR に使用する細胞ライセートを CellAmp Processing Buffer により希釈してください。

【注意】

本製品は DNase I for Direct RNA Prep によりゲノム DNA の除去が効率的に行えるため、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析において、ゲノム DNA の混入が問題になる解析（エキソン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。一方で、標準プロトコールにより細胞ライセートを調製する際に CellAmp Processing Buffer に DNase I for Direct RNA Prep を添加するため、細胞ライセートの SDS-PAGE 電気泳動結果に DNase I（31 kDa）のバンドが現われます（図 2 参照）。
DNase I for Direct RNA Prep の添加によりウェスタンブロット解析に影響がみられる場合は、「V-4」に記載の DNase I（－）プロトコールを使用して細胞ライセートを調製してください。ただし、リアルタイム RT-PCR 解析結果へのゲノム DNA による影響を避けるため、PCR 用プライマーはエキソンジャンクションを挟むように設計してください。




M：Protein Molecular Weight Marker (Broad)（製品コード 3452）
サンプル：HeLa 細胞ライセート 10 μl
（8 × $10^4$ cells/well、24 ウェルプレートより調製）
1：標準プロトコール
2：DNase I（－）プロトコール

図 2：細胞ライセート SDS-PAGE の結果（CBB 染色）

## VIII. 関連製品

### ○ リアルタイム PCR 関連

**［リアルタイム PCR 試薬］**

One Step TB Green® PrimeScirpt™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR096A/B）
One Step TB Green® PrimeScirpt™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)（製品コード RR086A/B）
One Step TB Green® PrimeScirpt™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR066A/B）
One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR064A/B）
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）
PrimeScript™ 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）。本キットと組み合せて、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 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。

### ○ ウェスタンブロット関連

**［化学発光検出用 HRP 基質］**

Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate（製品コード T7101A/B）
Western BLoT Quant HRP Substrate（製品コード T7102A/B）
Western BLoT Hyper HRP Substrate（製品コード T7103A/B）
Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate（製品コード T7104A/B）

**［ブロッキング剤］**

Western BLoT Blocking Buffer (Fish Gelatin)（製品コード T7131A）
Western BLoT Blocking Buffer (Protein Free)（製品コード T7132A）

**［リプローブ処理試薬］**

Western BLoT Stripping Buffer（製品コード T7135A）

## 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、PrimeScirpt、*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

v202201Da