

製品コード 3735A

研究用

Takara

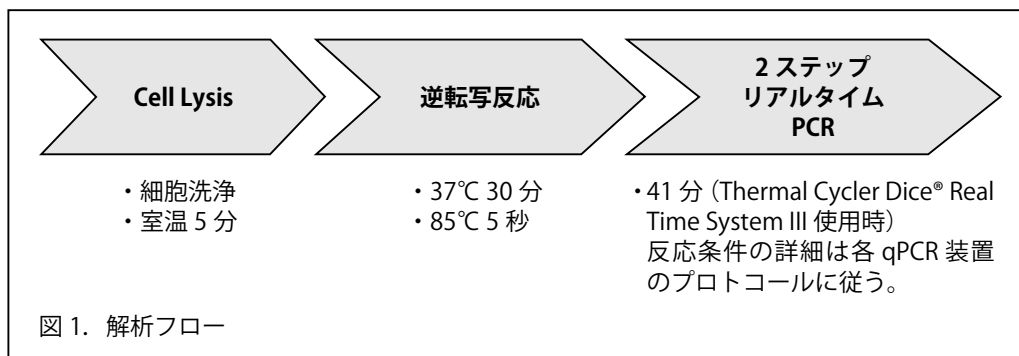
**CellAmp™ Direct TB Green®
RT-qPCR Kit**

説明書

v202111Da

CellAmp Direct TB Green RT-qPCR Kit は、96 ウェルまたは各種プレートで培養した様々な動物細胞 (cell line 化した接着細胞や浮遊細胞、初代培養細胞、各種幹細胞、iPS 細胞など) から RNA 抽出操作を行うことなく、簡単な手順で 2 ステップリアルタイム RT-PCR を行うためのキットです。本キットを使用することで、培養細胞から最短約 1.5 時間で鑄型サンプルの調製から逆転写反応、遺伝子発現解析までを完了することができます。また、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。インターカレーター法 (TB Green 検出) 用 2 ステップリアルタイム RT-PCR 試薬* がセットになっているので別途用意する必要が無く、気軽に遺伝子発現解析を行うことができます。

* : 本製品に含まれる qPCR 試薬は TB Green Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/B) と同じものです。足りない場合は別途ご購入ください。



I. 特長

1. ハイスループット解析がしやすく、解析時間も大幅に短縮 (最短 1.5 時間)
RNA 抽出操作を行うことなく、細胞から直接鑄型となるサンプルを調製することができます。また、従来品 (CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR (Real Time)、製品コード 3732) と比較して、逆転写反応前に行う DNase を不活化する熱処理ステップが不要になりました。操作の煩雑さが軽減され、ハイスループット解析にも対応が可能です。
2. 幹細胞、iPS 細胞からの分化細胞にも使用可能
Lysis Buffer の改良により、より多くの cell line 化した接着細胞や浮遊細胞、初代培養細胞、各種幹細胞、iPS 細胞などで使用が可能です。*
* : iPS 細胞由来の心筋細胞を使った実験例は、「VI. 実験例：遺伝子発現プロファイルの解析」をご参照ください。
3. ライセートの長期保存が可能
- 20°C 保存で少なくとも 6 ヶ月まで安定であることを確認しています。
4. 阻害物質に強く、特異性も高い
TB Green Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/B) をリアルタイム PCR 試薬に採用し、PCR 阻害物質に対して強い抵抗性を実現しています。また、やや長めのターゲットや GC 含量の高いターゲットにも対応しています。

II. 内容

1. CellAmp Washing Buffer*1	2.5 ml × 5
2. CellAmp Lysis Buffer II*1	1 ml × 5
3. DNase I for Direct RNA Prep*1	200 μl
4. Stop Solution*1	250 μl
5. PrimeScript™ RT Enzyme Mix*2	200 μl
6. 5 × CellAmp Buffer II*2	400 μl
7. RT Primer Mix*2,3	100 μl
8. RNase Free H ₂ O*2	1 ml × 2
9. TB Green Fast qPCR Mix (2 ×)*4	625 μl × 10
10. ROX Reference Dye (50 ×)*4,5	250 μl
11. ROX Reference Dye II (50 ×)*4,5	250 μl

* 1 : Cell Lysis のための試薬で 100 回分あります。

* 2 : RT (逆転写) 試薬で 100 回分あります。

* 1 と * 2 は、補充試薬 (別売り) があります。

- CellAmp Direct Lysis and RT set (製品コード 3737S/A) : * 1 と * 2 の試薬
- CellAmp Direct Lysis set (製品コード 3738A) : * 1 の試薬
- CellAmp Direct RT Enzyme set (製品コード 3739A) : * 2 の試薬

* 3 : Oligo dT Primer、Random 6 mers を含みます。

* 4 : qPCR 試薬で 500 回分あります。

TB Green Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/B) と同じものです。足りない場合は別途ご購入ください。

* 5 : Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye (50 ×) を添加する機種

- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System
- StepOnePlus Real-Time PCR System (以上 Thermo Fisher Scientific 社)

◆ ROX Reference Dye II (50 ×) を添加する機種

- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

◆ 添加の必要がない機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System III (製品コード TP950/TP970/TP980/TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960 : 終売)
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760 : 終売)
- 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)
- LightCycler 96/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics 社)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社)
- Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid 社)

III. 保存

− 20°C

CellAmp Washing Buffer および CellAmp Lysis Buffer II

融解後は 4°C で保存可能です。コンタミネーションには十分注意してください。

TB Green Fast qPCR Mix (2 ×)

4°C 保存、6 ヶ月安定です。必ず遮光し、コンタミネーションには十分注意してください。

- 長期保存の場合は、− 20°C で凍結保存してください。いったん融解した TB Green Fast qPCR Mix (2 ×) は 4°C 保存し、6 ヶ月を目途にご使用ください。
- 使用時には、穏やかな転倒混合により必ず完全に溶解し、均一に混合してからご使用ください。

IV. 使用上の注意

- ・ライセート調製のステップは途中で中断せず、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。

V. 操作

V-1. Lysis 溶液の準備

マイクロ遠心チューブに下記に示す Lysis 溶液を氷上で調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
CellAmp Lysis Buffer II	48 μ l
DNase I for Direct RNA Prep	2 μ l
Total	50 μ l

V-2. ライセートの調製

【接着性の培養細胞を 96 ウェル培養プレートで培養した場合】

1. 培地を可能な限り吸引除去する。
2. 各ウェルに CellAmp Washing Buffer を 125 μ l 加えて洗浄する。
3. CellAmp Washing Buffer を可能な限り吸引除去する。
4. 各ウェルに 50 μ l の Lysis 溶液を添加し、室温 (25℃前後) で5分間インキュベートする。
5. インキュベート後、Stop Solution を 2.5 μ l 添加して5回ピペッティングを行う。*1

* 1 : Stop Solution は 50 μ l のライセートに対して 2.5 μ l 添加してください。実験系により、ライセートの量をスケールアップする場合にはライセートの量に合わせて Stop Solution の量も変更してください。

例) 100 μ l のライセートに対しては 5 μ l の Stop Solution を添加する。

※ 各ウェルの細胞数は 1×10^4 cells を基本としていますが、 1×10^2 cells ~ 1×10^6 cells まで幅広く対応可能です。細胞数によらず、Lysis 溶液量は一定で使用できます。

【細胞をチューブに回収する場合】

細胞継代時に余った細胞を使用する場合や培養スケールが大きい場合、浮遊細胞を使用する場合はこちらの方法で調製を行ってください。

1. 細胞を適当容量のマイクロ遠心チューブに移す。
2. 各細胞に適した速度で遠心操作を行い、細胞を落とす。*2
3. 培地を可能な限り吸引除去する。
4. CellAmp Washing Buffer を 125 μ l 加えて洗浄する。
5. 各細胞に適した速度で遠心操作を行い、細胞を落とす。*2
6. CellAmp Washing Buffer を可能な限り吸引除去する。
7. 50 μ l の Lysis 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. インキュベート後、Stop Solution を 2.5 μ l 添加して 5 回ピペティングを行う。

* 2 : 細胞により遠心の条件は異なるため、使用する細胞に適した速度で遠心を行ってください。

例) HeLa 細胞の場合 : 1,500 rpm で 5 分間遠心する。

注 1 : 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 2 時間は氷上で安定であることを確認しています。

注 2 : 細胞ライセートを長時間保存する場合は、- 20°C で保存してください。その場合、少なくとも 6 ヶ月まで保存可能であることを確認しています。

V-3. RT (逆転写) 反応

1. 下記に示す細胞ライセート以外の反応 Master Mix を氷上で調製し、反応チューブまたはプレートに 18 μ l ずつ分注する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
5 × CellAmp Buffer II	4 μ l
PrimeScript RT Enzyme Mix	1 μ l
RT Primer Mix	1 μ l
(細胞ライセート	2 μ l)
RNase Free H ₂ O	12 μ l
Total	20 μ l

※ 逆転写反応は、反応液 20 μ l 当たり PrimeScript RT Enzyme Mix を 2 μ l まで使用することが可能です。

また必要に応じてスケールアップすることも可能ですが、細胞ライセートの添加量は反応液の 1/10 以下にしてください。

2. 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添加し、氷上に保持する。
3. 下記の温度で逆転写反応を行う。

37°C 30 分 (逆転写反応)
85°C 5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)
4°C

V-4. リアルタイム PCR 反応

【Thermal Cycler Dice Real Time System III (// および Lite : 終売) 等、ROX Reference Dye による補正の必要がない qPCR 装置*1 を用いる場合】

* 1 : LightCycler 96/480 System、CFX96 Real-Time PCR Detection System、Smart Cycler System/Smart Cycler II System を使用する場合は、TB Green Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/B) の取扱説明書もご参照ください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
TB Green Fast qPCR Mix (2 ×)	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM*2
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM*2
逆転写反応液*3	4 μl	
滅菌精製水	6.5 μl	
Total	25 μl*4	

* 2 : 最終プライマー濃度は 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してください。

* 3 : リアルタイム PCR への逆転写反応液の持ち込みは 16% 以内にしてください。

* 4 : Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズでは反応液量は 25 μl を推奨します。

2. 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。

シャトル PCR 標準プロトコール

Hold (初期変性)

Cycle : 1

95°C 30 秒

2 Step PCR

Cycles : 40

95°C 5 秒

60°C 10 秒

Dissociation

※ 使用上の注意

本製品に使用している変異型 *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 反応前に鑄型の初期変性を行う場合でも、通常 95°C 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認する。

解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

【Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System および StepOnePlus Real-Time PCR System 等の ROX Reference Dye による補正を行う qPCR 装置を用いる場合】

※ 各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
TB Green Fast qPCR Mix (2 ×)	12.5 μl	1 ×
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM ^{*1}
ROX Reference Dye (50 ×) or Dye II (50 ×) ^{*2}	0.5 μl	1 ×
逆転写反応液 ^{*3}	4 μl	
滅菌精製水	6 μl	
Total	25 μl	

* 1 : 最終プライマー濃度は 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してください。

* 2 : ROX Reference Dye II (50 ×) は、ROX Reference Dye (50 ×) より濃度が低く設定されている。Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System および 7500 Fast Real-Time PCR System で解析する場合には、ROX Reference Dye II (50 ×) を使用してください。
StepOnePlus および 7300 Real-Time PCR System には、ROX Reference Dye (50 ×) を使用してください。

* 3 : リアルタイム PCR への逆転写反応液の持ち込みは 16% 以内にしてください。

2. 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。T_m 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。

< Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System、StepOnePlus >
シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1 : 初期変性

Reps : 1

95°C 30 秒

Stage 2 : PCR 反応

Reps : 40

95°C 5 秒

60°C 10 ~ 15 秒*

Stage 3 : Melt Curve

* : 使用する Filter (FAM、ROX) を選択して、その Filter による検出可能な最短時間に設定してください。StepOnePlus は 10 秒の設定が可能です。

< Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System >

シャトル PCR 標準プロトコール

Holding Stage

Reps : 1
95°C 30 秒

Cycling Stage

Number of Cycles : 40
95°C 3 秒
60°C 12 ~ 15 秒*

Melt Curve Stage

* : 使用する Filter (FAM、ROX) を選択して、その Filter による検出可能な最短時間に設定してください。

※ 使用上の注意

本製品に使用している変異型 *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 反応前に鑄型の初期変性を行う場合でも、通常 95°C 30 秒で充分です。

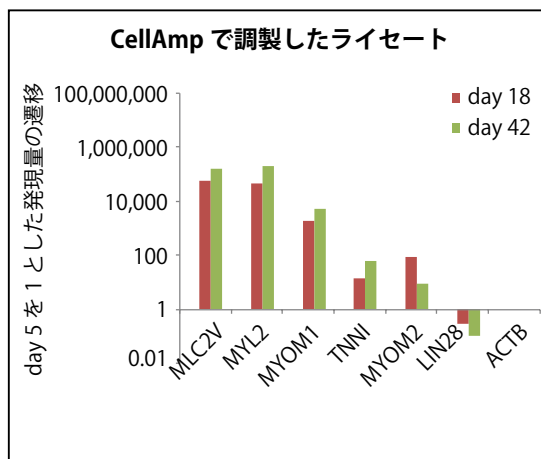
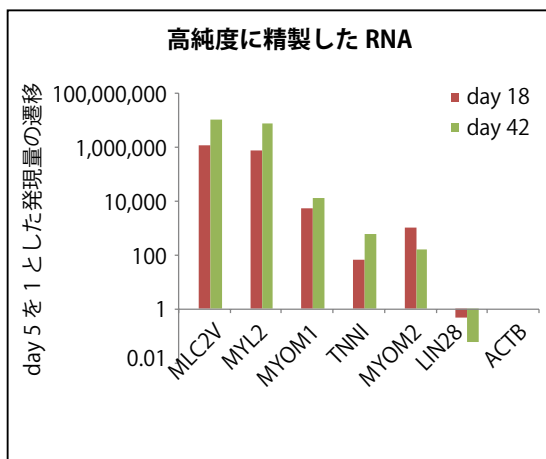
3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認する。

解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

VI. 実験例：遺伝子発現プロファイルの解析

<方法> iPS 細胞から心筋細胞に分化誘導を行い、分化誘導開始 5 日後、18 日後、42 日後 (それぞれ day 5、day 18、day 42 と表記する) に細胞数が 1×10^4 cells になるように回収し、プロトコールに従ってそれぞれライセート 50 μ l を調製した。プロトコールに従って逆転写反応、リアルタイム PCR を行い、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 (1×10^4 cells から RNA 抽出) を用い、同様に遺伝子発現解析を行った。

<結果> day 5 を 1 とした場合の発現量の遷移を比較したところ、CellAmp で調製したライセートからも、高純度に精製された RNA を用いた場合と同等の遺伝子発現のプロファイル結果が得られました。



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) 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」をご参照ください。
- 細胞株や培養条件によっては、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。
- 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]

TB Green® Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/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)

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 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)。

[Probe 検出用]

CellAmp™ Direct Probe RT-qPCR Kit (製品コード 3736S/A)

[補充試薬]

CellAmp™ Direct Lysis and RT set (製品コード 3737S/A)

CellAmp™ Direct Lysis set (製品コード 3738A)

CellAmp™ Direct RT Enzyme set (製品コード 3739A)

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、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