

FastLane[®] Cell cDNA プロトコールとトラブルシューティング

RNA 精製を行わずに直接培養細胞から一本鎖 cDNA を
迅速に調製

2 ステップ・リアルタイム RT-PCR 用

目次	ページ
プロトコール	
培養細胞からリアルタイム PCR 用一本鎖 cDNA の迅速調製	2
トラブルシューティング	6



プロトコール：培養細胞からリアルタイムPCR用一本鎖cDNAの迅速調製

実験を始める前の重要事項

- これは24ウェルプレートで培養した付着培養細胞からのcDNA調製用に開発されたプロトコールです。24ウェルプレートを使用する際はウェルあたり通常 4×10^4 以下の細胞を播く必要があります。しかし、細胞タイプや培養条件によっては細胞数を変更することが可能です。一般的には細胞がコンフルエントな状態まで増殖させることが可能です。その他の種類のプレートで細胞を培養する際は、英語版 Handbook 20 ページの Appendix C をご覧ください。その他の種類の細胞（浮遊細胞）を培養する際は、英語版 Handbook 21 ページの Appendix D をご覧ください。
- はじめて RNA を取り扱う際には英語版 Handbook 18 ページの Appendix A をお読みください。
- 最適な結果を得るために、逆転写反応液は氷上でセットアップしてください。
- Quantiscript® Reverse Transcriptase および Quantiscript RT Buffer にそれぞれ RNase 阻害剤および dNTPs が添加されているので、これらを逆転写反応液に添加する必要はありません。
- RT Primer Mix（添付）あるいは遺伝子特異的プライマー（別途準備）を使用します。RT Primer Mix は、RNA 転写物のすべての領域で高収量の cDNA を合成するために最適化されています。
- 逆転写反応を始める前に変性ステップとアニーリングステップを別に行なう必要はありません。
- 逆転写反応後、95℃、3分間のインキュベーションで反応を不活化します。
- 逆転写反応後、リアルタイムPCRを行なう際の詳細に関しては英語版 Handbook 22 ページ、Appendix E をお読みください。常に以下のことを確認してください。
 - DNA 調製あるいは RT-PCR 産物解析に使用する場所から離れた場所ですべての反応ミックスのセットアップを行ないます。
 - 逆転写反応および PCR のセットアップ専用の試薬およびピペットを使用します。
 - クロスコンタミのリスクを最小限に抑えるために、疎水性フィルター付き使い捨て用のピペットチップを使用してください。
- リアルタイム RT-PCR 用に適したコントロールに関する詳細は英語版 Handbook 22 ページの Appendix F をお読みください。

操作手順

1. 24ウェルプレートにウェルあたり適切な数の細胞（例； 1×10^4 ）を播く。
注：他のタイプのプレートを使用する際は Handbook 20 ページの Appendix C をお読みください。
2. 実験条件に従って、あるいはコンフルエントになるまで細胞をインキュベートする。
3. ピペットを使って細胞培養液を吸引除去する。
4. ウェルあたり Buffer FCW 500 μ l を添加する。
注：Buffer FCW で長期間細胞をインキュベートしないでください。半付着状態の細胞を取り扱う際は注意してください。
5. ピペットを使って Buffer FCW を吸引除去する。
6. ウェルあたり Buffer FCP 200 μ l を添加する。室温で 5 分間インキュベートする（15～25℃）。
便宜上インキュベーション時間は最高 10 分間まで増加できます。
注：Buffer FCP 添加後、ピPETTING 等で混和を行なわないでください。gDNA のコンタミネーション等が起きる場合があります。
7. **FastLane ライセート（安定化された RNA を含む）を適切なサイズのチューブにトランスファーする。その後直ちにステップ 8 に続く。**
注：操作の途中で一時休止する際は、FastLane ライセートを含むチューブを -80℃ で保存します。
8. 次の溶液を室温（15～25℃）で解凍する：ステップ 7 からの **FastLane ライセート（必要な場合）、gDNA Wipeout Buffer、RNase フリー水、Quantiscript Reverse Transcriptase、Quantiscript RT Buffer、RT Primer Mix。**
チューブを指で弾いて各溶液を混和します。チューブの壁に残った液体を回収するためにスピンドウンします。
注：解凍後、直ちに Quantiscript Reverse Transcriptase、Quantiscript RT Buffer、RT Primer Mix を氷上で保存します。gDNA Wipeout Buffer および RNase フリー水を室温で保存します。
9. 表 1 に従ってゲノム DNA 除去反応液を調製する。
チューブを数回の転倒混和することにより、完全に混和します。チューブの壁に残った液体を回収するためにスピンドウンし、室温（15～25℃）で保存します。
注：2 回以上の反応液をセットアップする場合は、反応のトータル数に必要な量の 10% 増しでマスターミックスを調製します。その後個々のチューブに適切な量のマスターミックスと各 FastLane ライセートを添加します。室温でチューブを操作します。

表1. ゲノムDNA除去反応液成分

成分	容量／反応	最終濃度
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 μ l	1x
FastLane ライセート (ステップ7より)	1 ~ 4 μ l	
RNase フリー水	適量	
トータル容量	14 μl	-

10. 42℃で5分間インキュベートする。すぐに氷上に置く。

11. 表2に従い、氷上で逆転写反応マスターミックスを調製する。

チューブを指で弾いて各溶液を混和します (5秒以内)。チューブの壁に残った液体を回収するためにスピンドウン後、氷上で保存します。逆転写反応マスターミックスには一本鎖cDNA合成に必要なすべての成分がテンプレートRNAを除いて含まれています。RT Primer MixはRNA転写物の全領域から高い収量のcDNAが得られるように至適化されています。

注：テンプレートRNA (ステップ10からのFastLane ライセート) はステップ12で添加します。

注：2回以上の反応液をセットアップする場合は、反応のトータル数に必要な量の10%増しでマスターミックスを調製します。その後個々のチューブに適切な量のマスターミックスと各FastLane ライセートを添加します。氷上でチューブを保冷します。

表2. 逆転写反応溶液成分*

成分	容量／反応	最終濃度
逆転写反応マスターミックス		
Quantiscript Reverse Transcriptase [†]	1 μ l	
Quantiscript RT Buffer, 5x ^{‡§}	4 μ l	1x
RT Primer Mix [§]	1 μ l	
テンプレートRNA		
FastLane ライセート (ステップ10から)	14 μ l (ステップ12で添加)	
トータル容量	20 μl	-

* マスターミックスをセットアップしない場合は、まずQuantiscript RT Buffer、RT Primer Mix、テンプレートRNAと一緒に混和し、最後にQuantiscript Reverse Transcriptaseを添加する。すぐにステップ13に進む。

[†] RNase阻害剤も含む。

[‡] Mg²⁺およびdNTPを含む。

[§] RT Primer Mixを常に逆転写反応に使用する場合は、RT Primer Mix、5x Quantiscript RT Bufferを1：4の割合で前もって混和しておくことと便利である。この混和物は-20℃で安定。

12. 逆転写反応マスターミックスを含んだ各チューブにテンプレート RNA（ステップ 10 からの FastLane ライセート）を添加する。

ボルテックスにより完全に混和しますが、5 秒以上は行なわないでください。チューブの壁に残った液体を回収するためにスピンドウンします。

13. 42℃で30分間インキュベートする。

注：インキュベーション時間は短縮できますが、これは各テンプレートごとにテストが必要です。

14. Quantiscript Reverse Transcriptase を不活化するために 95℃、3分間インキュベートする。

15. 逆転写反応が終了した反応液の一部をリアルタイム PCR ミックスに添加する（英語版 Handbook 22 ページの Appendix E を参照）。

注：逆転写反応液は、PCR 反応液量の 10% 以内となるように調整します（例；5 μ l 逆転写反応液 / 50 μ l PCR 反応液）。

逆転写反応液を氷上で保冷して直接リアルタイム PCR に進むか、長期保存の場合には逆転写反応液を -20℃ で保存します。リアルタイム PCR には QuantiTect® Kit および Assay をお勧めします（英語版 Handbook 11 ページ参照）。

トラブルシューティングガイド

コメント

リアルタイムPCRで産物が無い、あるいは遅れて検出される（逆転写反応中に問題が生じている場合）

- | | | |
|----|--------------------------------------|--|
| a) | 不適切な数の細胞を播種 | マルチウェルプレートにウェルあたり様々な数の細胞を播く。FastLane Cell cDNA操作後、リアルタイムPCRを行なう。最適なPCR結果が得られる細胞数を決定する。 |
| b) | Buffer FCWで細胞を洗浄していない | 細胞外の夾雑物を除去するためにBuffer FCWを用いて細胞を洗浄したことを確認する。 |
| c) | 不適切な量のBuffer FCPで細胞を処理 | 英語版Handbook 20ページ、Appendix Cを参照にして、お客様が使用されるマルチウェルプレートのウェルあたりに添加する適切なBuffer FCP量を使用する。 |
| d) | 逆転写反応のセットアップが不適切 | 反応液を必ず氷上で調製する。 |
| e) | リアルタイムPCRに添加した逆転写反応液量が多すぎる | PCRミックスに添加する逆転写反応液量が多すぎると、増幅効率と反応の直線性が低下することがある。一般に、逆転写反応液量はPCR最終反応量の10%を超えないようにする。 |
| f) | 逆転写反応の温度 | 逆転写反応は42℃で行なう。ヒートブロックあるいは水浴の温度をチェックする。非常に高度な二次構造を持つRNAを解析する際に、温度を最高50℃に上昇させると、好結果が得られることがある。しかし42℃以上の温度はQuantiscript Reverse Transcriptaseの活性を抑えるので、cDNA収量に影響する。 |
| g) | 逆転写反応のセットアップの際に、ピペッティングエラーまたは試薬の入れ忘れ | 実験セットアップに使用したピペットをチェックする。解凍後、すべての試薬をよく混和し、逆転写反応をもう一度行なう。 |
| h) | RNAの変性 | テンプレートRNAの変性は必要ない。もし変性を行なった場合、RNAの完全性に影響を与えることがある。 |
| i) | インキュベーション時間が短い | 標準の逆転写反応ではインキュベーション時間は30分必要。 |

コメント

- j) 逆転写反応用プライマーの濃度が不正確あるいは分解している 逆転写反応用に遺伝子特異的プライマーを使用した際は、プライマーの濃度と分解度をチェックする。必要なら異なる濃度のプライマーで逆転写反応を行なうか、あるいは添付のRT Primer Mixを用いる。RT Primer Mixを用いる際は、反応液 20 μ lあたり RT Primer Mixを 1 μ l用いる。
- k) インキュベーション温度が高すぎる 逆転写反応は 42 $^{\circ}$ Cで行なう。これより高い温度では cDNA 産物の長さが短くなったり、Quantiscript Reverse Transcriptaseの活性が低下する。ヒートブロックあるいは水浴の温度をチェックする。

リアルタイムPCRで産物がない、あるいは遅れて検出される、またはプライマー・ダイマーのみを検出

- リアルタイムPCR中に問題が生じる 使用中のリアルタイムPCRキットの説明書を参照する。

Trademarks: QIAGEN®, QuantiTect®, Quantiscript®, FastLane® (QIAGEN Group).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載のQIAGEN製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2009 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice-jp@qiagen.com

