

FastLane® Cell RT-PCR プロトコールとトラブルシューティング

FastLane Cell SYBR® Green Kit

FastLane Cell Probe Kit

FastLane Cell Multiplex Kit

FastLane Cell Multiplex NR Kit

RNA 精製を行わずに培養細胞から
直接 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR 解析

目次

ページ

プロトコール

培養細胞からの迅速な 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR の
セットアップ

2

トラブルシューティング

5



プロトコール：培養細胞からの迅速な1ステップ・リアルタイムRT-PCRのセットアップ

実験を始める前の重要事項

- これは96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。96ウェルプレートを使用する際はウェル当たり通常 1×10^4 以下の細胞を播く必要があります。しかし、細胞株の種類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。

細胞を他のタイプのプレートで増殖する場合には、このプロトコールに従いますが、細胞を蒔く際の適切な細胞数およびバッファ量を決定するためにAppendix B（英語版Handbook 20ページ）も参照してください。

浮遊細胞を使用する場合には、本プロトコールに従いますが、このプロトコールのステップ1～8の代わりにAppendix C（英語版Handbook 21ページ）のステップC1～C7を行ないます。

- 初めてRNAを取り扱う際には、英語版Handbook 19ページのAppendix Aをまずお読みください。
- 最適な結果を得るために、RT-PCR反応は氷上でセットアップしてください。
- QuantiTect® RT-PCR Kitに添付されている反応成分にはRNase阻害剤およびdNTPsが入っているため、これらをRT-PCR反応に添加する必要はありません。
- RT-PCR反応を始める前に、RNAの熱変性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。
- 1ステップ・リアルタイムRT-PCR実施および適切なコントロールの使用に関する詳細は、FastLane Cell RT-PCR Kitに添付のQuantiTect Handbookを参照してください。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産物解析を行なう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、使い捨ての疎水性フィルター付きピペットチップを使用してください。
- Applied Biosystems® 7900HT上で384ウェルプレートを用いてSYBR GreenによるリアルタイムRT-PCRを行なう場合には、Appendix D（英語版Handbook 22ページ）を参照します。

- 注：384 ウェルプレートでの培養細胞ではPCR溶液量を50 μ lから少なくとも25 μ lに減らすか、追加のQuantiTect RT-PCR Kitが必要です。どの検出法を利用するかにより、QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit、QuantiTect Probe RT-PCR Kit、QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit、QuantiTect Multiplex RT-PCR NR Kitのいずれかが必要です。オーダーインフォメーションに関しては英語版 Handbook 24～25 ページをご覧ください。

実験を始める前の準備事項

- 2.5 μ lのBuffer FCPMをBuffer FCPLに添加後よく混和し、2～8℃で保存します。Buffer FCPLボトルのチェックボックスにBuffer FCPMが添加済みであることを示すためチェックを入れます。毎回使用前にはBuffer FCPL/FCPMを簡単に混ぜるかボルテックスして確実に混和します。
- RNase フリー水750 μ lを凍結乾燥したgDNA Wipeout Buffer 2に添加後、バイアルを静かに転倒混和し、使用量ごとに分注して-20℃で保存します。凍結乾燥gDNA Wipeout Buffer 2が飛散して紛失するのを避けるために、バイアルを開けないでください。RNase フリーの注射針とシリンジを用いて容器にRNase フリー水を注入します。

操作方法

1. 96ウェルプレートのウェルに適切な数の細胞（例； 1×10^4 個）を播く。
注：他のタイプのプレートを使用する場合には、Appendix B（英語版 Handbook 20ページ）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. 表1に従ってCell Processing Mixを調製する。
注：Buffer FCPLに添加する前にチューブを静かに転倒してgDNA Wipeout Buffer 2を混和する。

表1. 96ウェルプレート用のCell Processing Mixの成分*

成分	容量/ウェル (μ l)
Buffer FCPL [†]	47
gDNA Wipeout Buffer 2 [‡]	3
トータル容量	50

* 他のタイプのプレートを使用する場合には、Appendix B（英語版 Handbook 20ページ）をご参照ください。

[†] 最初にBuffer FCPLを使用する前に“実験を始める前の準備事項”に記載されているようにBuffer FCPMを添加する。

[‡] gDNA Wipeout Buffer 2を最初に使用する前に“実験を始める前の準備事項”に記載されているようにRNase フリー水で溶解する。

4. **ピペットを使って細胞培養液を吸引除去する。**
注：細胞の酵素による処理（例；トリプシン）は不要です。
5. **96ウェルプレートのウェル毎に125 μ lのBuffer FCW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。
注：他のタイプのプレートを使用する場合には、Appendix B（英語版 Handbook 20ページ）をお読みください。
6. **ピペットを使ってBuffer FCWを吸引除去する。**
注：必ずBuffer FCWを完全に吸引してください。
7. **96ウェルプレートのウェル当たりCell Processing Mix 50 μ lを添加する。室温（15～25℃）で5分間インキュベートする。**
便宜上インキュベーション時間は最高10分間まで延長できます。
注：Cell Processing Mixをウェルに添加後、ピペッティング等で攪拌しないでください。攪拌による細胞溶解により、gDNAや細胞片のキャリアオーバーが起きます。
注：他のタイプのプレートを使用する場合には、Appendix B（英語版 Handbook 20ページ）をお読みください。
8. **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移す。75℃で5分間インキュベートし、スピンドウンする。すぐにステップ9に進む。**
注：操作の途中で中断する際は、このステップでFastLane ライセートを含むチューブを-80℃で保存します。
9. **FastLane Cell RT-PCR Kitに添付されているQuantiTect Handbookに従い1ステップ・リアルタイムRT-PCRをセットアップする。反応あたり1～4 μ lのFastLane ライセートを使用する。**
必要に応じてステップ8のFastLane ライセートを室温（15～25℃）で解凍します。チューブを指で静かに弾いて混和し、チューブの壁に残っている溶液を集めるために、スピンドウンします。

トラブルシューティングガイド

コメント

リアルタイム RT-PCR で増幅がない、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 RT-PCR法を行なう。最適な RT-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) 間違った Cell Processing Mix 量で細胞を処理した | 英語版 Handbook 20 ページ、Appendix B 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当たりに添加する適切な Cell Processing Mix 量を決定する。 |
| d) 不正確な RT-PCR セットアップ | 反応液を氷上でセットアップしたことを確認する。反応開始するまで反応液を氷上で氷冷する。 |
| e) RT-PCR に使用した FastLane ライセート量が多すぎる | RT-PCR ミックスに添加する FastLane ライセート量が多すぎると、増幅効率と反応の直線性が低下することがある。通常添加する FastLane ライセート量は、最終 RT-PCR 量の 20% を超えてはならない。 |
| f) Buffer FCW の除去が不完全 | Cell Processing Mix を添加する前に各ウェルから Buffer FCW を完全に除去したことを確認する。残留している Buffer FCW は RT-PCR を阻害する。 |
| g) RT-PCR のセットアップ時にピペッティング間違いあるいは試薬の入れ忘れ | 実験セットアップに使用したピペットをチェックする。全ての試薬を解凍後によく混和し RT-PCR を再度行なう。 |
| h) RNA を変性させた | テンプレート RNA の変性は必要ない。もし変性を行った場合、RNA が分解されることがある。 |

リアルタイム RT-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 RT-PCR 中に問題が生じる FastLane Cell RT-PCR Kit に添付されている QuantiTect Handbook を参照する。

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, QuantiTect®, FastLane® (QIAGEN Group);
Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).
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

