

QuantiTect[®] Whole Transcriptome プロトコールとトラブルシューティング

全トランスクリプトーム増幅によりトータルRNAから
cDNAを調製

目次	ページ
プロトコール	
全トランスクリプトーム増幅	2
トラブルシューティング	6



プロトコール：全トランスクリプトーム増幅

実験を始める前の重要事項

- この操作を始める前にRNA精製を行いません。QIAGENのRNA精製キットは、様々なサンプルタイプから高純度のRNAを精製します。
- 本プロトコールは10 ng以上の精製RNAからの全トランスクリプトーム増幅に最適化されています。RNAは、ヌクレアーゼ・フリー水あるいはTEバッファーで溶解して使用します。RNAの品質が高く、研究対象の転写物量が十分にある場合には、RNAサンプル量を10 ng以下に減らすことが可能です（英語版 Handbook 19ページ、Appendix A参照）。
- QuantiTect Whole Transcriptome Kitは、tRNAs、miRNAsあるいは分解したRNAなどの低分子RNAの増幅には適していません。RNA損傷の少ないRNAサンプルは使用可能ですが、個々のサンプルをテストする必要があります。
- QuantiTect Whole Transcriptome Kitは、5'末端を含むRNA転写物の全領域からcDNAを増幅しますが、完全長のRNA転写物に対応するcDNAの増幅は行いません。
- 反応セットアップ直前に、全酵素(T-Script Enzyme、Ligation Enzyme 1、Ligation Enzyme 2、REPLI-g® Midi DNA Polymerase)を氷上で解凍します。他のすべてのキット試薬は室温(15 ~ 25)で解凍します。
- すべてのバッファーと試薬は使用前にボルテックスを用いて完全に混和してください。
- プロトコールに記載されているRTミックス、ライゲーション・ミックス、アンプリフィケーション・ミックスは用時調製します。保存して次回に使用することはできません。

サーマルサイクリング条件

迅速かつ簡便に行なうために、全インキュベーション・ステップはサーマルサイクラー上で前もってプログラミングが可能です（表2参照）。

表2. サーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度	コメント
すべてのステップでheating lidを50 にセットする			
逆転写反応	30分	37	インキュベーションの前にRTミックスを添加する（ステップ2）
	5分	95	逆転写反応を停止する
ライゲーション	2時間	22	インキュベーションの前にライゲーション・ミックスを添加する（ステップ4）
全トランスクリプトーム増幅	2時間または8時間*	30	インキュベーションの前にアンプリフィケーション・ミックスを添加する（ステップ6）
	5分	95	全酵素を不活性化する
	∞	4	増幅したcDNAを冷却する

* 一般的なcDNA収量には2時間、高収量のcDNAには8時間

操作手順

1. 1 ~ 5 μ l RNA 溶液（ヌクレアーゼ・フリー水あるいはTEバッファーのRNA 溶液でRNA 量が10 ng 以上）を、マイクロ遠心チューブに入れる。ヌクレアーゼ・フリー水を用いて容量を5 μ l に調整する。
2. 表3に従ってRTミックスを調製する。5 μ l のRTミックスをRNA サンプルに添加し、ボルテックスで十分に混和後、スピンドウンする。

注：RTミックスは用時調製します。

表3. RTミックスの調製

成分	容量 / 反応
T-Script Buffer	4 μ l
T-Script Enzyme	1 μ l
トータル容量*	5 μ l

* ボルテックスで混和してスピンドウンする。

3. 37 で30分間インキュベートする。95 、5分間のインキュベートにより反応を停止した後、22 に冷却する。

4. 表4に従ってライゲーション・ミックスを調製する。10 μ lのライゲーション・ミックスをRT反応液に添加し、ボルテックスで十分に混和後、スピンドウンする。

重要：ライゲーション・ミックスを調製する際は、表4に記載されている順番で反応成分を添加します。

注：ライゲーション・ミックスは用時調製します。

表4. ライゲーション・ミックスの調製

成分	容量 / 反応
Ligation Buffer	6 μ l
Ligation Reagent	2 μ l
Ligation Enzyme 1	1 μ l
Ligation Enzyme 2	1 μ l
トータル容量 *	10 μ l

* ボルテックスで混和してスピンドウンする。

5. 22 で2時間インキュベートする。
6. 表5に従ってアンプリフィケーション・ミックスを調製する。30 μ lのアンプリフィケーション・ミックスをライゲーション反応液に添加し、ボルテックスで十分に混和後、スピンドウンする。

注：アンプリフィケーション・ミックスは用時調製します。

表5. アンプリフィケーション・ミックスの調製

成分	容量 / 反応
REPLI-g Midi Reaction Buffer	29 μ l
REPLI-g Midi DNA Polymerase	1 μ l
トータル容量 *	30 μ l

* ボルテックスで混和してスピンドウンする。

7. 30 で2時間(標準的な反応)あるいは8時間(高収量のための反応)インキュベートする。

これらのインキュベート時間を用いて得られる一般的なcDNA収量は、Table 1 (英語版 Handbook 7ページ)をご覧ください。

8. 95 °C、5分間のインキュベーションにより反応を停止する。

注：増幅した cDNA を PicoGreen® 試薬により定量する場合は、試薬が二本鎖 DNA のみに結合することに注意してください（英語版 Handbook 21 ページ、Appendices B と C を参照）。従って、95 °C でインキュベーションする前に cDNA を定量するか、一部分注した溶液を後で定量します。

9. ダウンストリームのアプリケーションで使用するまで、増幅した DNA は -20 °C で保存する。

増幅した cDNA はゲノム DNA と同様に取り扱います（凍結・融解サイクル数を最小限に抑えるなど）。低濃度の核酸を長期間にわたり保存すると酸加水分解を起こします。従って増幅した cDNA は、100 ng/μl 以上の濃度で保存することをお勧めします。

注：増幅した cDNA をリアルタイム PCR で解析する場合には、不活性化の後、増幅 cDNA を水あるいは TE バッファーで希釈し（表 6 参照）、2 ~ 3 μl の希釈した cDNA をリアルタイム PCR に使用することを推奨します。リアルタイム PCR の前に、逆転写反応を行なう必要はありません。

表 6. 増幅した cDNA の希釈

反応条件	希釈
標準的な反応 (増幅 2 時間)	1/50 (例 ; 2 μl cDNA に水を加えて 100 μl にする)
高収量を得るための反応 (増幅 8 時間)	1/250 (例 ; 2 μl cDNA に水を加えて 500 μl にする)

トラブルシューティングガイド

コメント

増幅cDNAが皆無あるいは少ない

- a) 反応温度が正しくない プロトコルに記載されている温度でRT、ライゲーション、増幅反応を行なう。必要に応じて、サーマルサイクラー、ヒーティングブロック、水浴の温度をチェックする。
- b) ピペッティング・エラー、あるいは反応成分の入れ忘れ ピペットをチェックする。解凍後、全試薬をよく混和し、氷上で保存したことを確認する。
- c) インキュベーション時間が適切でない プロトコルに記載されているインキュベーション時間でRT、ライゲーション、増幅反応を行なう。
- d) RTミックス、ライゲーション・ミックス、アンプリフィケーション・ミックスを用時調製していない RTミックス、ライゲーション・ミックス、アンプリフィケーション・ミックスは常に用時調製する。使用前にこれらのミックスを保存すると、全トランスクリプトーム増幅に影響する。
- e) PicoGreenを用いた定量前に増幅したcDNAを変性 PicoGreen試薬は二本鎖DNAのみに結合する。95でインキュベートする前（プロトコルのステップ8）にcDNAを定量するか、一部分注して後で定量する。

テンプレートを含まないネガティブ・コントロールでDNA収量が約10 µgあるいは40 µgあるが、ダウンストリーム・アッセイでポジティブな結果は得られない（PCRなど）

プライマー・ダイマーのランダム・エクステンションによりREPLI-g反応中にDNAを産生	プライマー・ダイマーのランダム・エクステンションにより高分子の産物が形成される。このDNAはサンプルの品質やダウンストリームの遺伝子アッセイには影響しない。
--	--

テンプレートを含まないネガティブ・コントロールでDNA収量が約10 µgあるいは40 µgあり、ダウンストリーム・アッセイでポジティブな結果が得られる（PCRなど）

混入したDNAテンプレートによりREPLI-g反応中でDNAが増幅	全ての実験器具の汚染を除去し、試薬やサンプルへの外来DNAの混入を避ける為に必要な予防策を取る。できればドラフト内で操作する。滅菌器具とフィルター付チップのみを使用する。増幅用試薬とDNAテンプレートを別々の場所に保存する。
-----------------------------------	--

コメント

リアルタイムPCR解析で転写物が皆無あるいはほとんど検出されないが、DNA収量は約10 µgあるいは40 µgある

- a) RNAテンプレートが分解 可能ならば、分解していないRNAあるいは多量のRNAを使用する。500ヌクレオチド以上のRNA転写物のみを増幅できる。
- b) 解析した転写物の発現量が低い RNA量を増やす(英語版 Handbook 19ページ、Appendix A)。最高100 ngまでのRNAをスタートサンプルとして使用可能。
- c) 解析した転写物が短い tRNAやmiRNAs等の短い転写物はQuantiTect Whole Transcriptome Kitで増幅できない。500ヌクレオチド以上のRNA転写物のみを増幅できる。
- b) 転写物の完全長を解析 ランダムプライミングなので、完全長のcDNA増幅は不可能。目的のcDNAから短い配列を用いて解析することを推奨。
- e) RNAテンプレートがキャリアRNAを含む キャリアRNAを使用せずに精製したRNAテンプレートを用いる。
- f) RNAテンプレート量が不適切 100 pg未満のRNAテンプレートを使用しない。少なくとも10 ngのRNAテンプレートを使用する。

ダウンストリーム・アプリケーションの結果が最適でない

- a) 感受性の高いダウンストリーム・アプリケーションではREPLI-g反応後DNAクリーンアップが必要 お客様のアプリケーションに最適なDNAクリーンアップに関しては、QIAGENテクニカルサポートにお問い合わせください。
- b) マイクロアレイ解析を行なった QuantiTect Whole Transcriptome Kitを用いて調製したcDNAは、Affymetrix® GeneChip®アレイには使用できない。
- c) 増幅cDNAが皆無あるいは少ない RTミックス、ライゲーション・ミックス、アンプリフィケーション・ミックスは常に用時調製する。使用前にこれらのミックスを保存すると、全トランスクリプトーム増幅に影響する。

Trademarks: QIAGEN[®], QuantiTect[®], REPLI-g[®] (QIAGEN Group); Affymetrix[®], GeneChip[®] (Affymetrix, Inc.); PicoGreen[®] (Molecular Probes, Inc.).

The QuantiTect Whole Transcriptome Kit is for use only as licensed by Amersham Biosciences Corp (part of GE Healthcare Bio-Sciences) and QIAGEN GmbH. The Phi 29 DNA polymerase may not be re-sold or used except in conjunction with the other components of this kit. See U.S. Patent Nos. 5,854,033, 6,124,120, 6,143,495, 5,001,050, 5,198,543, 5,576,204, and related U.S. and foreign patents. The QuantiTect Whole Transcriptome Kit is developed, designed, and sold for research purpose only.

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。

© 2007 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

