

Cells-to-C_T[™] 1-Step TaqMan[®] Kit

製品番号 A25605, A25603, A25602

製品番号 MAN0010751 Revision A.0

注記: 安全およびバイオハザード指針については、Cells-to-C_T Step TaqMan[®] Kit User Guide (Pub.no. MAN0010650) の“Safety”のセクションを参照してください。Safety Data Sheets (SDSs) を参照し、保護衣 / 保護眼鏡 / 保護手袋を使用し、指示に従って操作してください。

この製品説明書は、Cells-to-C_T 1-Step TaqMan[®] Kit を用いた遺伝子発現解析方法について簡便に説明しています。より詳細な手順については Cells-to-C_T 1-Step TaqMan[®] Kit User Guide (Pub. no. MAN0010650) をご参照ください。

使用する前に

- 1X PBS を氷中で冷却しておきます (10⁵ 細胞に対して 50μL 程度)。
- Stop Solution を解凍し室温に戻して、穏やかにミックスしておきます (vortex でミックスしないこと)。
- (オプション) DNase 処理を行う場合、使用直前に DNase/Lysis Solution master mix [1 反応当り: 49.5 μL-Lysis Solution (室温) + 0.5 μL-DNase] を調整しておきます。

【注意】 TaqMan[®] 1-Step qRT-PCR Mix は粘性が高く、ゼリー状に沈殿が形成されている場合があります。Master Mix が全体に均一になるように転倒混和でミックスしてください。

Cells-to-C_T[™] プロトコール

1 細胞の準備

接着細胞または浮遊細胞の準備

細胞のタイプ	細胞の準備
96- または 384-well プレートに培養した接着細胞	培地を除去し、50μL の冷却 1X PBS を添加し、さらに PBS を完全に除去します (このとき細胞を傷付けないように操作してください)
浮遊細胞、または上記以外の培養容器に培養した接着細胞	1. 接着細胞の場合、培養容器から細胞を剥離します 2. 細胞数をカウントし、遠心で細胞をペレット化した後、10⁵ 細胞当たり約 50μL の冷却 1X PBS を添加し、細胞を懸濁します 3. 再度、細胞を遠心でペレット化し、PBS を完全に除去した後、10 ~ 10⁵ 細胞に対して 5μL の冷却 1X PBS を添加して再懸濁します 4. 細胞懸濁液 5μL を、96-well のリアルタイム PCR 用プレートに分注します

2 Cells-to- C_T[™] ライセートの調整

- a. 50 μL の Lysis Solution (室温) または DNase/Lysis Solution (室温) を細胞へ添加し、5 回のピペッティングでよくミックスします
- b. 室温で 5 分間インキュベート
- c. 5 μL の Stop Solution (室温) を添加し、5 回のピペッティングでミックスします
- d. 室温で 2 分間インキュベート
- e. ライセートを氷中に置き、1-step RT-PCR のステップへ進んでください

STOPPING POINT ライセートは氷中で最大 2 時間保存可能です

長期保存する場合は、-20℃以下で最大 5 カ月保存可能です

3 1-step RT- PCR

- a. 試薬を解凍し氷中に置きます (凍結保存した Cells-to-C_T[™] ライセートを用いる場合も解凍して氷に置きます)
【重要】 TaqMan[®] 1-Step qRT-PCR Mix は粘性が高く、ゼリー状に沈殿が形成されている場合があります。Master Mix が全体に均一になるように転倒混和でミックスしてください
- b. 氷中で RT-PCR Master Mix を必要分まとめて調整します。このとき必要分の 10%増の量を調整します

3 1-step RT- PCR (続き)

Table 1 RT-PCR Master Mix (20-μL の反応系)

コンポーネント	20-μL 反応系 (1 反応当たり)
TaqMan® 1-Step qRT-PCR Mix	5 μL
TaqMan® Gene Expression Assay, 20X	1 μL
Nuclease-Free Water	13μL (ライセート 1 μL を添加する場合) 12 μL (ライセート 2 μL を添加する場合)

- c. 氷中に置いたリアルタイム PCR 用プレートの各 well に適切な量 (18–19 μL) の RT-PCR Master Mix を添加します
- d. さらに適切な量のライセート (1–2 μL) または Nuclease-Free Water (NTC control) を添加し、各 well のトータル量が 20μL になるように添加します

【重要】スタート細胞数が 10⁴ 細胞以上のライセートを調整した場合、ライセートを希釈して使用されることをお勧めします。細胞濃度が高いと阻害を受ける場合があります：

例：10⁵ 細胞でライセートを調整した場合、Nuclease-free water でライセートを 10 倍希釈
5 × 10⁴ 細胞でライセートを調整した場合、Nuclease-free water でライセートを 5 倍希釈

- e. プレートに専用シールを貼り、vortex でプレートを 5–10 秒間ミックスし、遠心でスピンドウンします
- f. リアルタイム PCR システムにプレートをセットし、以下の Table のサイクリング条件を設定してランを行います

Table 2 Standard モード：サイクリング条件

ステップ	サイクル数	温度	時間
逆転写反応	1	50° C	5 min
逆転写反応の失活 / ポリメラーゼ活性化	1	95° C	20 sec
PCR サイクル	40	95° C	15 sec
		60° C	1 min

Table 3 Fast モード：サイクリング条件

ステップ	サイクル数	温度	時間
逆転写反応	1	50° C	5 min
逆転写反応の失活 / ポリメラーゼ活性化	1	95° C	20 sec
PCR サイクル	40	95° C	3 sec
		60° C	30 sec

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

研究用におのみ使用できます。診断目的及びその手続上での使用は出来ません。記載の社名および製品名は弊社または各社の商標または登録商標です。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 www.lifetechnologies.com/TC

Not for use in diagnostic procedures. © 2014 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. Printed in Japan.

ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@lifetech.com

オーダーサポート TEL：03-6832-6980 FAX：03-6832-9584

営業部 TEL：03-6832-9300 FAX：03-6832-9580

[facebook.com/LifeTechnologiesJapan](https://www.facebook.com/LifeTechnologiesJapan) [@LifetechJPN](https://twitter.com/LifetechJPN)

www.lifetechnologies.com

life
technologies

A Thermo Fisher Scientific Brand