

TaqMan[®] Gene Expression Cells-to-CT[™] Kit

培養細胞ライセートからそのまま行う 2 Step RT-PCR

製品番号 4399002、AM1728、AM1729



436511780

TaqMan[®] Gene Expression Cells-to-CT[™] Kit

(P/N 4399002、AM1728、AM1729)

プロトコール

I.	はじめに.....	1
A.	製品概要と背景	
B.	本キットの内容と保存条件	
C.	本キットに含まれない各種試薬・機器	
D.	Applied Biosystems の関連製品	
II.	TaqMan[®] Gene Expression Cells-to-CT[™] Kit の使用手順.....	8
A.	推奨されるコントロールと反復数	
B.	細胞溶解	
C.	逆転写 (RT)	
D.	リアルタイム PCR	
III.	トラブルシューティング.....	14
A.	PCR 産物が得られないまたは予想外の PCR 産物が得られた	
B.	ネガティブコントロール反応液中に RT-PCR 産物が見られた	
IV.	付録.....	17
A.	予備実験	
B.	安全性情報	
C.	品質管理	

研究用にのみ使用できます。診断目的での使用はできません。 本製品の使用により、適用される全ての限定的ラベルライセンスの契約条件を受諾されたものとします。本製品に適用される記述または免責事項については、以下をご参照ください。

本文書中の情報は予告なく変更される場合があります。Applied Biosystems は本文書中のいかなる誤りに対しても責任を負いません。

Applied Biosystems は本文書およびその内容に対して、明示黙示を問わず、市場性または特定目的への適合に対する黙示的保証等、いかなる保証もいたしません。契約、不法行為、保証、定款またはその他の理由を問わず、Applied Biosystems はいかなる場合も本文書およびその使用によって生じる特別、付随的、間接的、懲罰的、複数または結果的損害のいずれに対しても一切の責任を負いません。

文献での引用について 本製品の使用する手法を文献で公表する場合には、本製品名を TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit と記載してください。

保証と責任について Applied Biosystems は業界をリードするグローバルサービスチームおよびテクニカルサポートチームの支援を受けて、より優れた品質および性能の製品を提供することをお約束します。本製品に付属している消耗品の保証に関する情報は、www.ambion.com/info/warranty の「消耗品に対する限定的な保証」より入手可能です。本製品に付属している消耗品の保証は、保証に関する声明の「免責、条件、例外および制限」の項で述べられている免責、条件、例外および制限の対象となります。保証に関するご質問または保証期間後のサポートに関する情報につきましては、Applied Biosystems までお問い合わせください。

購入者への注意：限定的ライセンス Applied Biosystems が特許権を保有する 5' Nuclease Process を研究目的で実施するためのライセンスは、(i) 認定済み 5'ヌクレアーゼ・コア・キットとライセンス取得済みのプローブの両方、(ii) ライセンス取得済みの 5'ヌクレアーゼ・キット、または (iii) Applied Biosystems からライセンス権をご購入いただくことにより取得可能です。

本製品は認定済み 5'ヌクレアーゼ・コア・キットです。本製品の使用は、米国および諸外国での特許の対象になります。本製品を購入することにより、前述の特許の下で購入者が購入した量のみを自身の研究に用いることを許可する譲渡不可能な限定的ライセンスを取得できます。ライセンス取得済みのプローブを別途ご購入いただくと、適用される米国特許およびこれに対応する諸外国での特許の下で権利が付与されます。明示的、黙示的または禁反言に関わらず、その他のいかなる特許に基づく権利およびいかなる種類の商業的サービスを実施する権利（購入者が実施した研究の成果を有料でまたはその他の商業的対価を得て無制限に報告することを含みます）も付与されません。本製品は研究用にのみ使用できます。Roche 社の特許に基づいて診断目的で使用するためには、Roche 社より別のライセンスを取得する必要があります。ライセンス購入に関する詳細な情報は、Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA より入手可能です。

商標について 米国またはその他の特定の国において、Applied Biosystems、AB (Design)、Ambion、GeneAmp、MicroAmp および RNaseZap は Applera Corporation およびその子会社の登録商標、Cells-to-CT、DNAZap、MultiScribe、ROX、StepOne、StepOnePlus、Veriti、FAM および XenoRNA は Applera Corporation およびその子会社の商標です。TaqMan は Roche Molecular Systems, Inc. の登録商標です。その他の全ての商標は、それぞれの商標の所有者が保有します。

I. はじめに

A. 製品概要と背景

逆転写 (RT) -PCR と増幅産物のリアルタイム検出とを組み合わせることにより、生体サンプル中の mRNA レベルを確実、簡単かつ定量的に測定することができます。通常の遺伝子発現実験では、まずサンプルから高純度な RNA を回収する必要があります。最も迅速で簡単な技術を用いても RNA 抽出にかなりの時間を要し、多くはサンプル処理に 30 分以上を要します。さらに、サンプルが微量な場合、RNA のロスにつながる可能性があります。Cells-to-CT™テクノロジーは、RNA の抽出・精製なしで培養細胞 10~10⁵ 個のライセートを調整し、さらにライセートから直接逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 解析を行うことを可能にしました。RNA 抽出のステップをなくすことにより、培養細胞の遺伝子発現解析に有する時間を大幅に短縮し、操作の簡略化が可能になりました。

Cells-to-CT で調整したライセートを用いた場合でも、TaqMan® Gene Expression Assay を用いたリアルタイム RT-PCR において精製済み RNA と同等の感度と特異性のあるデータが得られます。さらに細胞溶解ステップは、ゲノム DNA の除去を同時に行うことが可能で、操作は 10 分以内で完了します。溶解ステップは全て室温で行われるため、96 または 384 ウェルプレートのフォーマットのロボットプラットフォームを利用した自動化が安易で、ハイスループット処理が可能です。操作はシンプルで、ピペット操作のステップも少なく、96 または 384 ウェルプレートで培養した接着細胞の場合、培養プレート上で直接処理することが可能です。

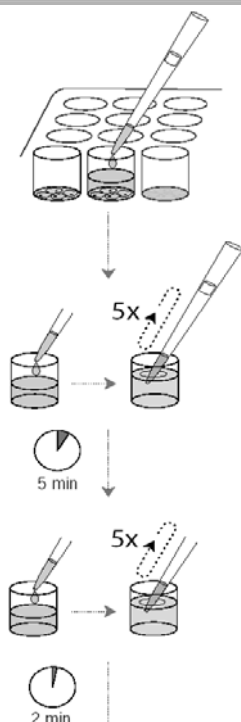
手順の概要

TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit の使用手順を図 1 および以下に示します。

- 10~10⁵ 個の培養細胞をリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) で洗浄し、Lysis Solution と混合して室温で 5 分間インキュベートします。インキュベート中に細胞が溶解し、RNA が Lysis Solution 中に溶出されます。Lysis Solution には、内在性 RNase を不活化する成分が含まれています。DNase I を Lysis Solution に添加すれば (オプション)、ゲノム DNA もこの段階で分解することが可能です。
- 次に、ライセートに Stop Solution を加え、Lysis buffer 中のタンパク質溶解成分を不活性化し、以後の RT または PCR 反応を阻害しないようにします。
- kit 付属の 20X RT Enzyme Mix および 2X RT Buffer を用いて、細胞ライセート中の RNA を逆転写し、cDNA を合成します。
- 最後に、Kit 付属の TaqMan Gene Expression Master Mix と目的とするターゲットに対応する TaqMan Gene Expression Assay (アッセイは別売りです) を使用して、cDNA 中のターゲット遺伝子の発現
- をリアルタイム PCR により解析します。

図 1. TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ 使用手順の概要

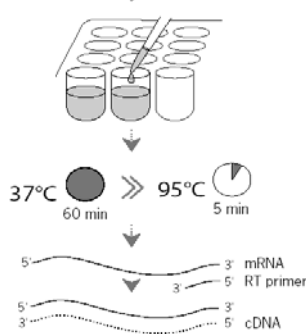
細胞溶解



1. 培養プレート上の細胞に冷 PBS を加えて洗浄するか、または洗浄し 10^5 個以下になるように調整した細胞をチューブまたはプレートに移します。
2. (オプション) DNase I を Lysis Solution で 1:100 となるように希釈します。
3. Lysis Solution 50 μ L を加えた後、5 回ピペッティングで混合します。
4. 室温 (19~25°C) で 5 分間インキュベート。
5. Stop Solution 5 μ L または XenoRNA™ Control を含む Stop Solution 6 μ L を加え、5 回ピペッティングで混合します。
6. 室温で 2 分間インキュベート。

中断ポイント

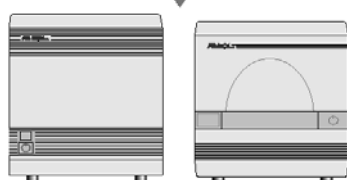
逆転写 (RT)



1. サーマルサイクラーを RT 用にプログラムします。
2. RT Master Mix を調製し、反应用チューブ/プレートに分注します。
3. ライセートを加えた後、十分に混合します。
4. サーマルサイクラーの RT プログラムを実行します。

中断ポイント

リアルタイム PCR



1. リアルタイム PCR 装置をプログラムします。
2. PCR Cocktail を調製し、反应用チューブ/プレートに分注します。
3. cDNA サンプルを加えた後、十分に混合します。
4. リアルタイム PCR 装置で Run をスタートします。

TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit

TaqMan® Cells-to-CT™ Control Kit (P/N 4386995、別途購入) は、TaqMan Gene Expression Kit、TaqMan PreAmp Kit および TaqMan Fast Cells-to-CT Kit と一緒に使用できるようにデザインされています。このキットには既知の遺伝子と相同性を持たない配列からなる *in vitro* 転写物の XenoRNA™ Control と、XenoRNA Control を検出する XenoRNA TaqMan Gene Expression Assay が含まれている他、発現レベルの高い内在性コントロール遺伝子 (β -アクチン) 用の TaqMan Assay も含まれています。これらのアッセイは RT 反応およびリアルタイム PCR のポジティブコントロールとして、目的遺伝子のアッセイと一緒に使用できるようにデザインされています (マルチプレックス PCR では使用できません)。

アプリケーション

TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit は、培養細胞をサンプルとして、mRNA の発現定量解析をリアルタイム RT-PCR で行う場合にご利用頂きます。このキットは膨大な製品ラインナップを誇る TaqMan Gene Expression Assay を用いて高い感度と特異性が得られるように十分な検証を行って開発されました。このキットは異なる処理を施した培養細胞中の遺伝子のリアルタイム PCR 解析や siRNA を用いた RNAi スクリーニング実験などの大規模実験に適しています。その他のアプリケーションとして、化合物のライブラリーを用い、mRNA 発現に効果を示す化合物のスクリーニングもあります。特定の化学物質を、濃度を振って細胞に処理し mRNA に対する制御について確認を行ったり、タイムコースを取って mRNA の発現の変化の検証することによってスクリーニングを行います。

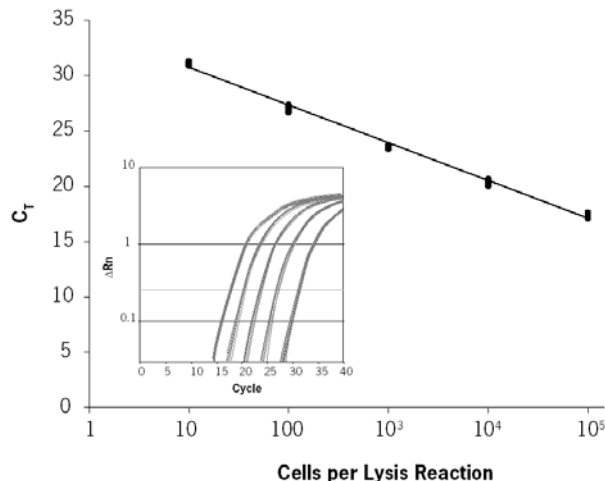


図 2. TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit を用いたリアルタイム RT-PCR

TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit を用いて、 $10 \sim 10^5$ 個の HeLa 細胞の希釈系列を 3 反復で処理しました。内在性コントロール遺伝子である β -アクチンを $20 \mu\text{L}$ の反応系で増幅しました (3 反復)。上図は増幅プロットと、検量線 [Threshold cycle (C_t) とインプットした細胞数から作成] を示しています。細胞 $10 \sim 10^5$ 個のライセートからの増幅で直線性が確認されました。

対応する細胞のタイプ

Cells-to-CT™テクノロジーで検証し、適合することが確認できた細胞のタイプを表 1 に示しています。

表 1. Cells-to-CT™テクノロジーに対応する細胞のタイプ

細胞株	培養方法	由来生物種	由来組織
A549	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	肺癌
BJ	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	包皮繊維芽細胞
CHO-K1	接着培養	<i>C. griseus</i> (ハムスター)	卵巣
COS-7	接着培養	<i>C. aethiops</i> (サル)	腎臓
DU-145	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	前立腺癌
HEK-293	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	腎臓
HeLa	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	子宮頸部腺癌
HepG2	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	肝臓癌
Huh-7	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	肝臓癌
Jurkat	浮遊培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	急性 T 細胞性白血病
K-562	浮遊培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	慢性骨髄性白血病
ME-180	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	子宮頸部扁平上皮癌
NCI-H460	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	肺大細胞癌
Neuro 2A	接着培養	<i>M. musculus</i> (マウス)	脳芽細胞腫
NIH/3T3	接着培養	<i>M. musculus</i> (マウス)	胚繊維芽細胞
PC-12	接着培養	<i>R. norvegicus</i> (ラット)	副腎褐色細胞腫
初代肝細胞	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	肝臓
PT-K75	接着培養	<i>S. scrofa</i> (ブタ)	鼻甲介粘膜
Raji	浮遊培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	B リンパ球
SK-N-AS	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	脳神経芽細胞
SK-N-SH	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	脳繊維芽細胞
U-87 MG	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	脳グリア芽細胞腫
U-2 OS	接着培養	<i>H. sapiens</i> (ヒト)	骨肉腫

B. 本キットの内容と保存条件

TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit には、40、100、400 サンプルの溶解可能なサイズがあり、さらにキットにはその後の RT および PCR 用試薬が付属しています。

- **反応 40 回分** (P/N 4399002) : 各ライセートに対して、1 回の逆転写反応 (RT) に必要な RT 試薬が含まれ、さらに minus-RT コントロール 1 回分を行うことも可能です。リアルタイム PCR 用の Gene Expression Master Mix は、50 µL の反応系では 40 反応分、20 µL の反応系では 100 反応分が添付されています。
- **反応 100 回分** (P/N AM1728) : 各ライセートに対して、1 回の逆転写反応 (RT) に必要な RT 試薬が含まれ、さらに minus-RT コントロール 1 回分を行うことも可能です。リアルタイム PCR 用の Gene Expression Master Mix は、50 µL の反応系では 200 反応分、20 µL の反応系では 500 反応分が添付されています。

- **反応400回分** (P/N AM1729) : 各ライセートに対して、1回の逆転写反応 (RT) に必要な RT 試薬が含まれ、さらに minus-RT コントロール 1 回分を行うことも可能です。リアルタイム PCR 用の Gene Expression Master Mix は、50 μ L の反応系では 800 反応分、20 μ L の反応系では 2000 反応分が添付されています。

リアルタイム PCR に必要なプライマーとプローブからなる TaqMan Gene Expression Assay は、TaqMan Gene Expression Cells-to-CT Kit には含まれていません。

P/N 4399002 40 rxn	P/N AM1728 100 rxn	P/N AM1729 400 rxn	コンポーネント	保存
200 μ L	500 μ L	2 x 1 mL	Stop Solution	-20°C
22 μ L	55 μ L	220 μ L	DNase I	-20°C
110 μ L	275 μ L	1.1 mL	20X RT Enzyme Mix	-20°C
2.2 mL	5.5 mL	22 mL	Lysis Solution	4°C
2.2 mL	5.5 mL	22 mL	2X RT Buffer	4°C
1 mL	5 mL	4 x 5 mL	TaqMan® Gene Expression Master Mix	4°C



注意

本製品はドライアイスと同梱して出荷されますが、到着後にキットのコンポーネントを上表に記載されている温度で保存してください。-20°C 保存の場合は、自動霜取り機能を持たない冷凍庫内で保存してください。

C. 本キットに含まれない各種試薬・機器

実験器具および備品

- ボルテックスミキサー、マイクロチューブ、ピペッターなどの一般的な実験器具
- ヌクレアーゼフリーのピペットチップ、ヌクレアーゼフリーのマイクロチューブおよび/または U 底の 96 ウェルプレート (96 または 384 ウェルの培養プレートで培養していない場合に必要)
- リアルタイム PCR 用チューブまたは 96 ウェルプレート (各装置専用のもの)
- サーマルサイクリング装置 : TaqMan Cells-to-CT Kit は、Applied Biosystems のサーマルサイクラー (RT 用) およびリアルタイム PCR 装置を使用して開発されましたが、RT 反応を行うことが可能なサーマルサイクラー全般、および TaqMan Gene Expression Assay に採用されている蛍光分子を検出可能なリアルタイム PCR システムであれば使用可能と考えられます。TaqMan Gene Expression Cells-to-CT 反応は、以下を含む現在入手可能な全ての Applied Biosystems 装置プラットフォームで実施できます。

逆転写

- GeneAmp® PCR System 9700
- Veriti™ 96-Well サーマルサイクラー

リアルタイム PCR

- Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR システム
（「スタンダード」モードで使用）
- Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR システム
- StepOne™または StepOnePlus™ Real-Time PCR システム

試薬

- RT-PCR グレード水（例、Ambion P/N AM9935）
- リン酸塩緩衝食塩水（PBS）（例、Ambion 10X PBS [P/N AM9624 および AM9625] を希釈したもの）
- 目的とするターゲットのリアルタイム PCR 用 TaqMan® Gene Expression Assay（Applied Biosystems P/N 4331182、4351372）
- （オプション）TaqMan® Cells-to-CT™ Control Kit (P/N 4386995)

D. Applied Biosystems の関連製品

**TaqMan® Cells-to-CT™
Control Kit
P/N 4386995**

TaqMan Cells-to-CT Kitと使用できるようにデザインされています。このキットには既知の配列と相同性のないRNA転写物XenoRNA™ Controlと、これに対応するXenoRNA TaqMan Gene Expression Assayのほか、発現レベルの高い内在性コントロール遺伝子（β-アクチン）用のTaqMan Assayも含まれています。これらのアッセイは逆転写およびリアルタイムPCRのポジティブコントロールとして、目的遺伝子のアッセイと一緒に使用できるようにデザインされています（マルチプレックスPCRでは使用できません）。

**TaqMan® Gene Expression
Assay
P/N 4331182
P/N 4351372**

リアルタイムPCRによる定量的遺伝子発現解析用にあらかじめデザインおよび最適化されたTaqMan®プローブとプライマーのセットです。各TaqMan AssayはPCR用プライマーとTaqManプローブが20Xの混合液のready-to-useの状態を提供されます。TaqMan Assayはすべて同一のサーマルサイクリング条件で反応できるようにデザインされており、あらゆるアッセイの組み合わせを実行できます。ヒト、マウス、ラット、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、線虫、イヌおよびアカゲザル遺伝子用に700,000以上のアッセイを取りそろえているほか、カスタムのTaqMan Gene Expression Assayもご利用いただけます。

**Applied Biosystems Real-Time
PCR 装置
P/N についてはウェブまたは
カタログをご覧ください**

リアルタイムPCRの先駆者であるApplied Biosystemsは、その後もテクノロジーの開発を続け、技術を向上させたシステムをあらゆる規模の研究室に提供してきました。Applied Biosystems 7300、7500、7500 Fast、7900HT Fast、StepOne™およびStepOnePlus™ Real-Time PCRシステムからなるApplied Biosystemsのリアルタイムプラットフォームのラインナップは、リアルタイムPCRの操作性を高めた最先端のツールです。これらのシステムには次世代ソフトウェアが搭載されており、使いやすく、ご希望のリアルタイムPCRをフレキシブルに実行できます。

**RNaseZap® Solution
P/N AM9780、AM9782、AM9784**

RNaseZap® RNase Decontamination Solutionを表面にかけるか噴霧または塗布するだけで、RNaseをすぐに不活性化することができます。蒸留水で2回リンスすれば、残留するRNaseとRNaseZap Solutionは除去されます。

**RNase-free チューブおよび
チップ
P/N についてはウェブまたは
カタログをご覧ください**

Ambion® RNase-freeチューブおよびチップは、最も一般的に使用されるサイズおよび形状のものを提供しています。これらのチューブとチップは、RNaseフリーおよびDNaseフリーであることが保証されています。製品の詳細については、弊社の最新カタログまたはウェブサイト（www.ambion.com/prod/tubes）をご覧ください。

**RT-PCR Grade Water
P/N AM9935**

Ambion® RT-PCR Grade Waterは、ヌクレアーゼフリーの保証だけでなく、RT-PCRで偽陽性シグナルの原因となる核酸のコンタミがないことが保証されています。RT-PCR Grade Waterは即座に使用可能で、ヌクレアーゼフリーのための調製やオートクレーブは不要です。RT-PCR Grade WaterはAmbionの全てのヌクレアーゼフリー水製品と同様に脱イオン処理、オートクレーブおよびフィルタろ過滅菌済みです。それぞれのロットについて厳密な品質管理試験を2回ずつ実施し、ヌクレアーゼフリーであることを保証しています。

**PCR 用プラスチック製消耗品
P/N についてはウェブまたは
カタログをご覧ください**

Applied BiosystemsのMicroAmp®ディスポ製品は非常に優れた温度の精度と均一性を生み出すように最適化されており、迅速で効率的なPCR増幅を可能にします。プラスチック製品はリアルタイムPCR装置を含むさまざまなApplied Biosystemsプラットフォームに対応しています。必要なスループットや使用されるサーマルサイクラーのサンプルブロックに応じて、最適なフォーマットをお選びください。

**DNAZap™ Solution
P/N AM9890**

DNAZap™ PCR用DNA除去試薬は、単独では無害な2種類の溶液からなります。これらの2種類の溶液を混合後、実験器具の表面に処理すると、表面にコンタミしたDNAとRNAは高濃度であっても直ちに分解されます。

II. TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit の使用手順

A. 推奨されるコントロールと反復数

生物学的反復と 技術的反復

生物学的反復と技術的反復の定義にはさまざまな解釈がありますが、ここでは、生物学的反復は溶解反応ごとに設定し、技術的反復は各 PCR 反応毎に設定してください。反復の最低数および推奨数は以下の通りです。

- ・生物学的反復：2～4
- ・技術的（PCR）反復：2～4

RT-PCR のネガティブ コントロール

minus-RT コントロール

minus-RT コントロールを設定する場合、20X RT Enzyme Mix を除く全ての RT 反応コンポーネントを添加します（20X RT Enzyme Mix の代わりに水が添加します）。minus-RT コントロールは、PCR は cDNA をテンプレートとして増幅されており、ゲノム DNA のコンタミによるものではないことを確認するために設定します。



注意

製品番号の末尾に「_m*」が付いている TaqMan® Gene Expression Assay を使用して cDNA を増幅する場合、minus-RT コントロールは必ずしも必要ありません。これらのアッセイはエキソン-エキソン接合部にまたがるようにデザインされているため、ゲノム DNA は増幅されません。

No-テンプレートコントロール

No-テンプレートコントロールには細胞ライセートを除く全ての PCR コンポーネントが含まれています（細胞ライセートの代わりに水が添加されています）。No-テンプレートコントロールから蛍光シグナルが生じれば、RT または PCR 試薬に DNA（例：前の反応の PCR 産物）が混入していたことを意味します。

B. 細胞溶解



注意

この手順は、新鮮な培養細胞を使用する場合を想定しています。実験に凍結培養細胞を使用する場合は、細胞を凍結する前にステップ 1（以下）の手順に従い冷 PBS で洗浄してから凍結することを推奨します。使用手順を開始する準備を整えてから、細胞を氷上で解凍し、ステップ 2 の手順から開始してください。

手順を開始する前に

- Stop Solution を解凍した後、チューブを数回反転またはタッピング（ボルテックスはしないでください）して十分に混合し、氷上に置きます。
- 1X PBS を 4°C で冷やします。

1. 培養プレート上の細胞に直接冷 PBS を加えて洗浄するか、または細胞を洗浄後、 10^5 個以下になるように調整し、チューブまたはプレートに移します



重要

使用できる細胞数の上限は細胞の種類によって多少異なりますが、一般的には 10^5 個です。1 反応あたりの細胞数の上限を決定するための予備実験の手順は、17 ページから始まるセクション IV.A で概説されています。1 回の溶解反応に使用する細胞数が多すぎると、不完全な溶解や RT-PCR の阻害につながる可能性があります。

96 または 384 ウェルプレート内で培養された接着細胞

使用する細胞は、プレートに完全に接着するまで十分に培養して下さい。接着が不十分だと、洗浄時に細胞が剥がれてしまいます。

- a. ウェルあたりの細胞数を概算（または細胞を計測）します。各ウェルの細胞数が $10 \sim 10^5$ 個であることを確認して下さい。
- b. ウェルから培地を吸引および除去します。
- c. 各ウェルに冷 1X PBS (4°C) 50 μ L を加えます。
- d. ウェルから PBS を吸引します。できるだけ細胞にダメージを与えないように、完全に PBS を除去してください。ステップ 2 に進みます。

その他の容器で培養された細胞（接着細胞および浮遊細胞）

- a. 接着細胞のみ（浮遊細胞はステップ b から開始してください）：細胞の種類に応じて、細胞の継代する際に通常行っている方法で、細胞を回収してください。なおトリプシンを使用される場合は、次のステップに進む前にトリプシンを不活性化してください。
- b. 細胞を計測し、穏やかな条件で細胞をペレット化させた後、培地を吸引および除去し、氷上に置きます。
- c. 細胞を冷 (4°C) PBS で洗浄します。細胞 10^6 個あたり約 0.5 mL PBS（細胞 10^5 個以下の場合は、約 50 μ L PBS）で細胞を再懸濁します。細胞を穏やかな条件でペレット化した後で培地を吸引および除去します。細胞のペレットを乱さずに、できるだけ完全に PBS を除去してください。その後、細胞を氷上に置きます。



注意

細胞を PBS で洗浄する前に、細胞を分割し、それぞれ別個に溶解反応に使用することも可能です。

- d. 細胞を新鮮な冷 1X PBS で再懸濁して、1 回の溶解反応に用いる細胞数（1 回の溶解反応につき細胞 10~10⁵ 個）が 5 µL 中に含まれるようにします。
- e. 細胞懸濁液を溶解反応 1 回分ずつに分注します：U 底マルチウェルプレート（ウェルまたはマイクロチューブ）に細胞懸濁液を 5 µL ずつ分注してください。細胞を氷上に置きます。

2. （オプション）DNase I を Lysis Solution で 1:100 となるように希釈します

細胞溶解のステップでゲノム DNA を除去する場合、まず実験に必要な Lysis Solution 量を確認し、DNase I を Lysis Solution で 1:100 で希釈しておきます。まとめて調整する場合は、必要量より約 10% 余分に調製してください。調製の例を以下の表 2 に示しています。

表 2. DNase I を含む Lysis Solution の調製

コンポーネント	1 反応	96 反応	384 反応
Lysis Solution	49.5 µL	5.23 mL	20.91 mL
DNase I	0.5 µL	52.8 µL	211 µL

3. Lysis Solution 50 µL を加えた後、5 回混合します

- a. 各サンプルに Lysis Solution（DNase I 含有または不含）50 µL を加えます。
- b. ピペティングを 5 回繰り返して溶解反応液を混合します。泡立たないように、ピペッターは 35 µL に設定し、溶液を排出する際にはチップ内の溶液を完全に排出しないように注意してください。



注意

Lysis Solution および Cells-to-CT ライセートは室温で濁って見えることがあります、問題ありません。

4. 室温（19~25°C）で 5 分間インキュベートします

溶解反応液を室温（19~25°C）で 5 分間インキュベートしてください。

5. Stop Solution 5 µL または XenoRNA™ Control を含む Stop Solution 6 µL を加えた後、5 回混合します



注意

マルチチャンネルピペッターを用いて Stop Solution を分注する場合、リザーバーを使用せず、ストリップチューブまたは 96 ウェルプレートを用いて Stop Solution を分注してください。必要に応じて、未使用の Stop Solution は適切に密封すれば、これらのチューブ内で凍結保存できます。

- a. （オプション）TaqMan Cells-to-CT Control Kit を使用して外因性のコントロールを設定することが可能です。実際の操作では XenoRNA™ Control を予め Stop Solution に添加しておきます（Stop Solution 5 µL に対して XenoRNA Control 1 µL を添加）。
- b. ピペットを使用して、Stop Solution のみ 5 µL または XenoRNA Control を含む Stop Solution 6 µL を各溶解反応液に直接添加します。

チップの先をライセートの液面につけ、Stop Solution 全量がライセートに添加されたことを確認してください。

- c. ピペティングを 5 回繰り返して溶解反応液を混合します。泡立たないように、ピペッターは 35 µL に設定し、溶液を排出する際にはチップ内の溶液を完全に排出しないように注意してください。



重要

Stop Solution をライセートに十分混合することが非常に重要です。

6. 室温で2分間インキュベートします

室温(19~25°C)で2分間インキュベートしてください。
Cells-to-CT 処理したライセートを Stop Solution 添加後に室温で20分以上置かないでください。



ストップポイント

ライセートは氷上で2時間、-20°C または -80°C で5ヶ月まで保存できます。

C. 逆転写 (RT)

1. サーマルサイクラーをRT用にプログラムします

サーマルサイクラーを表3に示したようにプログラムします。

表3. サーマルサイクラーのRT用設定

	Stage	Reps	Temp	Time
逆転写 (hold)	1	1	37°C	60 min
逆転写酵素の不活性化 (hold)	2	1	95°C	5 min
Hold	3	1	4°C	∞

2. RT Master Mix を調製し、反応チューブ/プレートに分注します

- a. RT 反応数を確認し、表4に従い、全反応分に対して約10%多めに RT Master Mix を氷上でヌクレアーゼフリーのマイクロチューブ内で調製してください。

各 RT 反応に対して 10 µL ライセート (推奨量) を添加する場合の反応液のセットアップを表4に示しています。必要に応じて、Cells-to-CT ライセートは RT 反応液量の 45% (22.5 µL) まで増量可能です。その場合は Nuclease-free Water の量を調節してください。



注意

RT 反応 50 µL では、以後の PCR アッセイに不十分である場合、RT 反応液量を比例的にスケールアップすることが可能です。

表4. RT Master Mix : 最終反応液量 50 µL

コンポーネント	1 反応あたり	96 反応	384 反応
2X RT Buffer	25 µL	2.64 mL	10.56 mL
20X RT Enzyme Mix*	2.5 µL	264 µL	1.056 mL
Nuclease-free Water	12.5 µL	1.32 mL	5.28 mL
RT 反応液の最終容量	40 µL	4.22 mL	16.9 mL

* Minus-RT コントロールの場合は 20X RT Enzyme Mix の代わりに Nuclease-free Water を添加します。

3. ライセートを加えた後、十分に混合します

- a. 分注した RT Master Mix にサンプルライセートを添加し、1 反応あたりの最終的な反応液量を 50 µL にします。
- b. サンプルライセートを添加して穏やかに混合した後、スピンドウンして反応液を反応容器の底に集めます。

**ストップポイント**

調製済みの RT 反応液は 4℃ で 4 時間まで保存できます。

4. サーマルサイクラーの RT プログラムを実行します

サーマルサイクラー（またはリアルタイム PCR 装置）を用いて 37℃ で 60 分間インキュベート後、95℃ で 5 分間処理して RT 酵素を不活性化します。

**ストップポイント**

反応終了後の RT 反応液は -20℃ で保存できます。

D. リアルタイム PCR**1. リアルタイム PCR 装置をプログラムします**

リアルタイム PCR 装置を表 5 に従ってプログラムします。

**重要**

Fast モードのサーマルサイクリングが可能な Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置を使用される場合には Standard モードを選択してください。

- TaqMan® Gene Expression Master Mix には ROX™ パッシブリファレンス色素が含まれています。
- 実験のため TaqMan Gene Expression Assay に使用する蛍光色素を指定してください。TaqMan Cells-to-CT™ Control Kit の ACTB および XenoRNA™ Gene Expression Assay は FAM™ 色素と非蛍光クエンチャーで標識されています。

表 5. リアルタイム PCR のサイクリング条件

	Stage	Reps	Temp	Time
UDG のインキュベーション (hold)	1	1	50℃	2 min
酵素の活性化 (hold)	2	1	95℃	10 min
PCR (cycle)	3	40	95℃	15 sec
			60℃	1 min

2. PCR Cocktail を調製し、反応チューブ/プレートに分注します

- 実験の PCR アッセイ数を確認します。表 6 に従い、全反応分に対して約 10% 多めに **PCR Cocktail** を室温でヌクレアーゼフリーのマイクロチューブ内で調製してください。各 PCR 反応の全容量に対して、20% の容量の cDNA (推奨量) を添加する場合の反応のセットアップを表 6 に示しています。必要に応じて、cDNA サンプルは PCR 容量の 45% まで増量可能です。その場合は Nuclease-free Water の量を調節してください。

**注意**

使用前に TaqMan Gene Expression Master Mix のボトルを振って混合してください。TaqMan Assay は、チューブを短時間ボルテックスまたは数回タッピングして混合した後、スピンドウンします。

**重要**

使用するリアルタイム PCR 装置に対応するプレート、チューブ、およびキャップを必ずご使用ください。

3. cDNA サンプルを添加し、十分に混合します

表 6. PCR Cocktail のセットアップ

コンポーネント	PCR 20 µL	PCR 50 µL
TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X)	10 µL	25 µL
TaqMan® Gene Expression Assay* (20X)	1 µL	2.5 µL
Nuclease-free water	5 µL	12.5 µL
PCR Cocktail 反応液の最終容量	16 µL	40 µL

*TaqMan Gene Expression Cells-to-CT Kit には含まれていません。

b. PCR Cocktail を室温で各 PCR チューブまたはリアルタイム PCR プレートの各ウェルに分注します。

a. 表 7 に従い、RT 反応液 (cDNA サンプル) の一部を分注済みの各 PCR Cocktail に添加します。

表 7. PCR のセットアップ

コンポーネント	PCR 20 µL	PCR 50 µL
PCR Cocktail	16 µL	40 µL
RT 反応液 (cDNA)	4 µL	10 µL

b. プレートまたはチューブのフタをして穏やかに混合した後、スピンドウンして泡を除去し、反応液をウェル/チューブの底に集めます。

4. リアルタイム PCR 装置で PCR を実行します

反応液をリアルタイム PCR 装置にセットし、12 ページのステップ [D.1](#) に記載されている設定に従ったプログラムで PCR を開始します。

データの評価に関する情報については、使用されるリアルタイム PCR 装置ガイドをご参照ください。

III. トラブルシューティング

A. PCR 産物が得られない、または非特異的な PCR 産物が得られた

Stop Solution の添加または混合に問題がある

Lysis Solution の成分が Stop Solution によって完全に不活性化されていない場合、RT-PCR を阻害することがあります。

- Stop Solution をライセートに直接添加してください。Stop Solution を添加する際にはチップの先をライセートにつけて添加し、5 または 6 μL の Stop Solution の全量が各サンプルに添加されたことを確認してください。
- ピペッティングを 5 回繰り返して混合することを推奨します。

手順を開始する前に RNA が分解されていた

RNA の分解を避けるため、細胞溶解を行うまで細胞を氷上に置いてください。細胞を氷中から取り出したら、直ちに Lysis Solution を添加してください。

サンプル中の RNase が完全に不活性化されていない

1 回の溶解反応に使用した細胞数が多すぎた

この手順では、1 サンプルあたりの細胞数が多すぎるとサンプル中の RNase が完全に不活性化されないことや、細胞成分やデブリが逆転写や PCR を阻害することがあります。

- Cells-to-CT™ 処理の手順では一般的に最大で細胞 10^5 個を処理可能ですが、RT または PCR に問題が生じた場合は、より少ない細胞数（例、 $1/10 \sim 1/5$ の細胞数）を試してください。
- 細胞種に応じた最適な細胞数を決定するため、予備実験を実施することも検討してください（17 ページのセクション [IV.A](#)）。

細胞に PBS が残ってしまい、Lysis Solution が希釈された

Lysis Solution 添加時にサンプルに残存している PBS が $5 \mu\text{L}$ を越えると Lysis Solution が希釈されすぎてしまい、細胞内 RNase が完全に不活性化されない可能性があります。これを避けるためには、細胞に Lysis Solution を添加する前に PBS をできる限り除去するか、PBS 洗浄後に細胞を分ける場合は細胞 $10 \sim 10^5$ 個からなる各サンプルを $5 \mu\text{L}$ 以下の PBS に再懸濁してください。

RT を行う前のライセートの保存期間が長すぎた

Stop Solution を添加後のライセートを室温で 20 分以上置かないでください。ライセートを -20°C または -80°C で凍結するか、RT 反応を開始してください。また、ライセートは氷上で溶解後 2 時間まで問題なく保存できます。

サンプルにターゲット RNA が含まれていない

ネガティブな結果が得られたときに、それが有効な結果なのかどうかを確認するのは簡単ではありません。サンプル中で目的 RNA が発現されていないと結論づける前に、以下の実験の実施を検討してください。

- 10 ページのステップ [II.B.5.a](#) のサンプルに XenoRNA™ Control (TaqMan Cells-to-CT Control Kit に付属、別売りされています) を添加することにより、TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ 処理手順に問題がないことを確認してください。その後、12 ページのセクション [II.D](#) に記載されている指示に従い、

XenoRNA TaqMan Gene Expression Assay を使用して XenoRNA ターゲットを増幅します。XenoRNA の増幅が得られたにも関わらず、目的遺伝子の PCR では増幅が得られなかった場合、細胞内で目的 RNA が発現していないか、この手順では目的 RNA を検出できないものと判断します。

- **細胞 100 個未満のサンプルを用いる実験では**、各サンプル中の実際の細胞数を確認することをお勧めします。細胞中で必ず発現されている内在性コントロール遺伝子（例、 β -アクチン）用の TaqMan Gene Expression Assay、または TaqMan Cells-to-CT Control Kit（別売り）に付属されている ACTB アッセイを用いてリアルタイム PCR を行うことにより、インタクト RNA を含む細胞がサンプルに含まれていることを確認してください。
- **PCR プライマー、試薬および装置を用いてターゲットの PCR を実施することができるか確認してください。**この確認では、同一の生物種（または同種）に由来する精製済み RNA から調製した cDNA を使用します。精製済み RNA から調製した cDNA を使用しても良好な増幅結果が得られない場合には、Cells-to-CT 処理したライセートを使用しても増幅はうまくいきません。

B. ネガティブコントロール反応液中に RT-PCR 産物が見られた

no-template PCR コントロール中に PCR 産物が見られた

No-template PCR コントロール中に PCR 産物が得られる場合は、サンプルに DNA がコンタミしたことを示しています。PCR 試薬、ピペッターおよび実験台に DNA がコンタミしていないか、検討してください。

- 反応液に PCR 産物がコンタミするのを避けるためには、実験操作を慎重に行うことが重要です。PCR 反応液を調製する場所では、濃縮された DNA 溶液（PCR 産物、抽出済みのプラスミドなど）を扱わないでください。実験台とピペッターには Ambion DNAZap™ Solution (P/N AM9890) などの DNA 分解試薬を日常的に使用し、清潔にしてください。PCR 試薬のピペット操作時にはバリアチップを使用し、反応が完了した PCR 液は PCR 試薬とは異なる場所で保存してください。汚染された試薬は廃棄し、再調製しなければなりません。
- 毎回の PCR 実験に no-template ネガティブコントロールを設定することが理想的です。No-template コントロール中に PCR 産物が常に見られる場合、手順をより厳密に進めてコンタミを抑制してください。

**minus-RT コントロール中に
PCR 産物が見られた**

minus-RT コントロール中に PCR 産物が見られ、no-template コントロールに PCR 産物が見られない場合は、サンプル中にゲノム DNA が残存し、ゲノム DNA がリアルタイム PCR で増幅されたことを示しています。以下の方法で検討してください。

- サンプルからゲノム DNA を効率的に除去するため、10 ページのステップ [II.B.2](#) で Lysis Solution に DNase I を十分に混合してください。
- エキソン-エキソン接合部にまたがるようにデザインされた TaqMan Gene Expression Assay（製品番号の末尾に「_m*」が付いているもの）の使用を検討してください。
- 1 回の溶解反応に用いる細胞数を減らしてください。
- 室温の Lysis Solution を使用して細胞を溶解し（10 ページのステップ [II.B.3](#)）、室温（19～25°C）で溶解反応を行っていることを確認してください。

minus-RT コントロールの非特異的 PCR 増幅が改善されない場合、以下の 2 つの方法を順番に試してください。

- 10 ページのステップ [II.B.4](#) で溶解反応液のインキュベーション時間を 8 分に延長してください。
- 25°C にした Lysis Solution を使用して細胞を溶解してください（10 ページのステップ [II.B.3](#)）。

IV. 付録

A. 予備実験

この予備実験の目的は、TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™反応に使用可能な細胞数の上限を決定することです。細胞が多すぎると、不完全な細胞溶解と RT-PCR の阻害が起こる可能性があります。細胞数の上限は細胞の種類によって多少異なります。

この検証実験の操作は簡単で、段階希釈した細胞を調整し、通常のプロトコールに従って溶解します。TaqMan Cells-to-CT Control Kit (P/N 4386995) をお持ちの場合は、Cells-to-CT ライセートの調製に使用する Stop Solution に XenoRNA™ Control を添加することをお勧めします。ライセートを用いβ-アクチンなどの内在性コントロール遺伝子に対してリアルタイム RT-PCR を行い (ACTB TaqMan Gene Expression Assay は TaqMan Cells-to-CT Control Kit に付属)、ライセート中の細胞数(対数)に対して各ライセートの Ct 値をプロットし、グラフを作成します。このときプロットが直線性を示した細胞数レンジは実験に適した細胞数と判断し、逆に直線性が得られなかった細胞数は、細胞の溶解が不完全になったり、RT-PCR の反応阻害が生じると判断します。またこの cDNA を XenoRNA TaqMan Gene Expression Assay (Cells-to-CT Control Kit に付属) を用いてチェックすることも可能です。内在性コントロール遺伝子を用いた場合と異なり、各ライセート中の細胞数が異なっても、XenoRNA の C_T値はほぼ一致すると予想されます。これは、反応液に同量の Xeno-RNA ターゲットを添加してアッセイを行うためです。

1. 細胞を回収、計測および洗浄します

細胞の回収に関しては9ページの手順 [II.B.1](#) に記載されている指示に従ってください。PBS による細胞の再懸濁に関しては手順 [2](#) (次) の指示に従ってください。

2. 細胞を 2×10^5 個/μL に希釈します

細胞 2×10^5 個/μL を含む細胞懸濁液を調製します。調製した細胞懸濁液を氷上に置いてください。

3. 細胞を 5 倍希釈で、5 段階の希釈系列を調整します

- 冷 1X PBS 45 μL を含む 5 本のチューブを氷上で準備します。
- 1 本目のチューブに細胞 2×10^5 個/μL を含む細胞懸濁液 5 μL を添加し (5 倍希釈)、穏やかかつ十分に混合します。調製した希釈液 5 μL を次のチューブに分注するという操作を繰り返して、細胞濃度が 2×10^4 、2000、200、20、2 個/μL の 5 段階の希釈系列からなる細胞懸濁液を調製します。

4. 3 反復(n=3)で細胞を反応容器に分注します

各細胞懸濁液を 5 μL ずつ反応チューブまたはマルチウェルプレートのウェルに移します。各濃度の生物学的反復数は 3 とします (n=3)。

最終的な細胞数は 10^5 、 10^4 、1000、100 および 10 個となります。

5. 細胞を Lysis Solution 50 μL で溶解し、室温で 5 分間 インキュベートします

- a. ステップ 4 で調製した各サンプルに Cells-to-CT Lysis Solution 50 μL を添加します。
- b. ピペッティング操作を 5 回繰り返して十分に混合します。
- c. 室温で 5 分間インキュベートします。

6. Stop Solution 5 または 6 μL を添加して混合し、室温で 2 分間インキュベートします

- a. (オプション) Stop Solution に XenoRNA Control を添加します。XenoRNA Control 16.5 μL を Stop Solution 82.5 μL と混合したものを次のステップで使用します。
- b. Stop Solution のみの場合は 5 μL、XenoRNA Control を添加した場合は Stop Solution 6 μL を各細胞溶解反応液に添加し、ピペッティング操作を 5 回繰り返して十分に混合します。
- c. 室温で 2 分間インキュベートします。

7. RT-PCR を行います

全てのサンプルを、セクション II. の C ~ D に記載されているプロトコールに従って逆転写およびリアルタイム PCR を行ってください。

- Applied Biosystems の Endogenous Control TaqMan Gene Expression Assay (例、Cells-to-CT Control Kit に付属されている ACTB アッセイなど) を使用して増幅してください。
- XenoRNA Control をサンプルに添加した場合、Cells-to-CT Control Kit に付属する XenoRNA TaqMan Gene Expression Assay を使用して増幅することができます。
- 目的とするターゲットに TaqMan Gene Expression Assay を使用すれば細胞希釈系列液のリアルタイム PCR 結果も評価でき、検出に必要な細胞数の下限の決定にも役立ちます。

8. 結果を評価します

内在性コントロール

ライセート中の細胞数 (対数) に対して C_T 値をプロットします。本手順に使用できる細胞数のレンジでは、細胞数の増加にともなって C_T 値が直線的に減少します。1 回の溶解反応に使用する細胞数が本システムの処理能力を越えると不完全な溶解や RT-PCR の阻害が起こり、データの直線性が損なわれます。以後の実験では、溶解に使用する細胞数は、予備試験で直線性が認められた範囲を超えないように設定してください。

XenoRNA™ Control

XenoRNA Control の C_T 値は、ライセート中の細胞数とは関係なく一定 ($\pm 1 C_T$) であれば、Cells-to-CT ライセート中に RT-PCR 阻害物質は存在しないと判断します。1 回の溶解反応に使用する細胞数が過剰であると C_T 値が予測より高くなります。この場合、この細胞数では RT-PCR が阻害物質に影響されていると判断します。以後の実験で 1 回の溶解反応に使用する細胞数は、 C_T 値が予測より高くならなかった範囲で設定してください。

目的とするターゲット

予備実験により、目的とするターゲットの検出に必要な細胞数に関する有用な情報を得ることができます。結果を慎重に検討し、実験で十分なシグナルを得られる細胞数を選択してください。

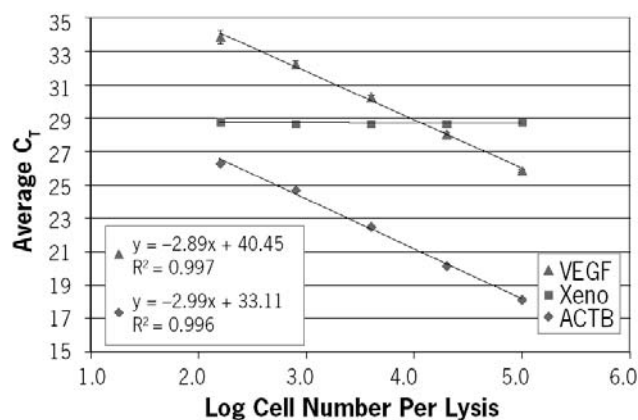


図 3. 予備実験の例

予備実験のプロトコールに従って HeLa 細胞を希釈および溶解しました。指定の Taq-Man Gene Expression Assay を使用し、8 反復でライセートを逆転写および増幅しました。得られた C_T 値を、ライセート中の細胞数（対数）に対してプロットしました（推奨法に準拠）。この実験では、1 回の溶解反応に細胞 10^5 個を使用しても RT-PCR はライセートに由来する反応阻害物質に影響されることが判明しました。また、予備実験で検討した最少の細胞数（1 回の溶解反応あたり 160 個）は血管内皮増殖因子 (VEGF) の検出限界に近いことも判明しました。

B. 安全性情報

Applied Biosystems または Ambion が提供する薬品の化学物質の MSDS は、無料で毎日 24 時間ご利用いただけます。



重要

Applied Biosystems または Ambion が提供する以外の化学薬品の MSDS を入手するには、各製造元にお問い合わせください。

化学物質等安全性 データシートの入手方法

- 化学物質等安全性データシート (MSDS) は、弊社ウェブサイト (www.ambion.com/techlib/msds) に掲載されている各製品のリンク先で印刷またはダウンロードできます。
- また、MSDS_Inquiry_CCRM@appliedbiosystems.com 宛に電子メールでご請求いただくことも可能です。製品カタログまたは製品番号をご指定いただければ、関連する MSDS を電子メールで送付いたします。FAX による送付を希望される場合は、その旨をお知らせください。
- インターネットまたは FAX をご利用いただけないお客様は、テクニカルサービス部門が電話または郵送による MSDS のご請求に対応します（郵送によるご請求の処理には 1~2 週間を要します）。

薬品に関する 安全性ガイドライン

薬品の危険性を最小限にするため、以下を徹底してください。

- 薬品や危険物を保存する、取扱う、または使用する前に、製造元の提供する化学物質等安全性データシート (MSDS) をよく読み、理解してください。
- 薬品との接触を最小限に抑えてください。薬品の取扱い時には、適切な保護具（例、安全めがね、保護手袋、保護服）などを着用してください。その他の安全上のガイドラインについては、MSDS をご参照ください。
- 薬品の吸入を最小限に抑えてください。薬品の容器を開けたままにしないでください。必ず適切な換気の下（例、ドラフト）でご使用ください。その他の安全上のガイドラインについては、MSDS をご参照ください。
- 薬品の漏れやこぼれがないかを定期的にチェックしてください。漏れやこぼれがあった場合には、MSDS で製造元の推奨する清掃手順に従ってください。
- 薬品の貯蔵、取扱い、廃棄に関する国や地方自治体の法律および規制に従ってください。

C. 品質管理

機能試験

溶解キットのコンポーネントは、細胞 $10 \sim 10^5$ 個を含む連続希釈液からの cDNA 生成、リアルタイム PCR による PPIA の検出、および Cells-to-CT ライセートからの増幅シグナルと同一細胞由来の精製済み RNA からの増幅シグナルとの比較による機能試験が行われています。

ヌクレアーゼ試験

関連するキットのコンポーネントは、以下のヌクレアーゼアッセイにより検査されています。

RNase 活性

サンプルを標識 RNA 25 ng とインキュベートして PAGE 分析したときに、基準以上であることを確認しています。

非特異的エンドヌクレアーゼ活性

サンプルを環状プラスミド DNA 300 ng とインキュベートしてアガロースゲル電気泳動分析したときに、基準以上であることを確認しています。

エキソヌクレアーゼ活性

サンプルを *Sau3A* で消化した標識 pUC19 のフラグメント 40 ng とインキュベートして PAGE 分析したときに、基準以上であることを確認しています。

プロテアーゼ試験

サンプルをプロテアーゼ基質 1 μ g とインキュベートして蛍光分析したときに、基準以上であることを確認しています。



