

## SuperScript<sup>®</sup> VILO<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit

**Cat. no:**

**11754-050**

**11754-250**

**Size:**

**50 reactions (20 µl/reaction)**

**250 reactions (20 µl/reaction)**

**Store at -20°C (non-frost-free)**

### 製品概要

SuperScript<sup>®</sup> VILO<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kitは、リアルタイム定量RT-PCR (qRT-PCR)に用いるfirst-Strand cDNAを生成させるために、最適化した組成と耐熱性の高いSuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptaseが含まれています。この組合せにより、cDNA合成効率が向上し、微量から大量のRNA (20ul反応系で total RNAを2.5ugまで)に対応し、qPCRにおいて幅広い直線性を実現します。

10X SuperScript Enzyme Mixには、SuperScript III RT、RNaseOUT<sup>™</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor、および独自のhelper proteinが含まれています。SuperScript<sup>®</sup> III RTは、RNase H活性を低減させ、より熱安定性が増した改良型M-MLV 逆転写酵素です(1、2)。この酵素は、42~60°Cの温度範囲でcDNAを合成することができます。SuperScript<sup>®</sup> III RTは、ribosomal RNAおよびtransfer RNAによって著しく阻害されないため、total RNAからのcDNA合成に最適です。RNaseOUT<sup>™</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitorは、RNaseからmRNAの分解を保護する役割があります。

5X VILO Reaction Mixは、qRT-PCRに最適化した組成になっており、random primers、MgCl<sub>2</sub>およびdNTPsを含んでいます。

**注記:** 本キットは、EXPRESS<sup>™</sup> Two-Step qRT-PCR kitに含まれています。詳細なqRT-PCRプロトコールおよびガイドラインは、上記の製品のマニュアルをご参照ください。

製品には、20µl cDNA合成反応系に対して50 / 250反応分のキットがあります。

<b>Component</b>	<b>50-rxn kit</b>	<b>250-rxn kit</b>
10X SuperScript <sup>®</sup> Enzyme Mix	100 µl	500 µl
5X VILO <sup>™</sup> Reaction Mix	200 µl	1000 µl

Part no. 100002284

Rev. date: 8 Jan 2008

## ガイドライン

- ・ 高品質で分解のないRNAは、正確な定量が求められるqPCRにおいて不可欠です。RNAは、RNaseコンタミネーションを受けず、RNase freeの状態で取扱う必要があります。RNAの品質は、バイオアナライザーか、アガロースゲル電気泳動によって分析することができます。
- ・ 20- $\mu$ l cDNA合成反応において、最大2.5  $\mu$ gのtotal RNAをご使用いただけます。100ng相当よりも多いcDNA溶液をSYBR Green<sup>®</sup>またはSYBR<sup>®</sup>GreenER™で使用する際は事前に希釈の必要があります(次ページを参照)。RNA量は、260nmでのUV吸収度またはQuant-iT™ RNA Assay Kitを使用して測定することができます(ご注文情報については4ページをご参照ください)。
- ・ Total RNAの抽出には、PureLink™ RNA mini kit、TRIzol<sup>®</sup> ReagentまたはPureLink™ 96 Total RNA Purification Kitを推奨します(4ページをご参照下さい)。mRNAの分離する事で、cDNAの収率が改善される可能性があります、基本的には必要ありません。
- ・ Total RNAからgenomic DNAのコンタミネーションを除去するために、DNase I、Amplification Gradeを使用いただけます(4ページをご参照ください)。
- ・ 保温時間を短くしたり、高温(例えば、50°Cで30分)でを使用することによりcDNAの収率が減る可能性があります。
- ・ 保温時間を長くする(42°Cで120分まで)ことでcDNAの収量が高くなる可能性があります。

## 製品品質

各製品の詳細な品質管理情報は試験成績書(CofA)にてご確認いただけます。CofAについては、ウェブサイトの[www.invitrogen.com/cofa](http://www.invitrogen.com/cofa)にて入手可能です。各製品の箱に印刷されている製品ロット番号でご検索ください。

## First-Strand cDNA合成のプロトコール

以下のプロトコールは、two-step qRT-PCRに用いるためのfirst-Strand cDNAを生成させるために最適化されています。反応容量は、必要に応じて100 µlまでスケールアップすることができます。

1. 単一反応については、以下の組成が含まれるチューブを氷上に準備します。複数の反応については、RNAを含まないマスターミックスを先に調製します。

5X VILO™ Reaction Mix	4µl
10X SuperScript® Enzyme Mix	2µl
RNA (up to 2.5 µg)	x µl
DEPC-treated water	to 20µl

2. 溶液の入ったチューブを穏やかに混合し、25°Cで10分間、保温します。
3. チューブを42°Cで60分間、保温します。
4. 85°Cで5分保温し、反応を停止させます。
5. cDNA溶液は希釈後、またはそのまま(下記をご参照ください)qPCRにご使用いただけます。直ぐに使用しない場合は-20°Cにて保存してください。

## 蛍光プライマーまたはプローブを使用するqPCR

qPCR反応量の10%までcDNA溶液を加えることができます。(例えば、20-µl qPCRに対し2 µlまでの無希釈cDNAを用いる)

## SYBR GreenまたはSYBR GreenERを使用するqPCR

1反応あたり、100 ng以下のcDNAをqPCRに用いる場合、qPCR反応量の10%まで無希釈cDNAを加えることができます。(例えば、20-µl qPCRに対し2 µlまでの無希釈cDNAを用います)

1反応あたりのcDNA量が100 ngより多い場合、高濃度のcDNAがSYBR GreenおよびSYBR GreenERと反応し、シグナルのベースラインに影響を及ぼすため、qPCRの前にcDNAの希釈をお勧めします。例えば、2 µgのtotal RNAを20µlの反応容量で逆転写した場合、100ng/µlの相当のcDNAが生成されたことになります。このcDNAを20-µlのqPCR反応へ2µl用いるには、事前に20倍希釈してから使用します(qPCR量の10%以下)。1反応あたり10ng相当のcDNAが添加されたことになります。

## References

1. Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., Driftmier, K.M., Blodgett, K.P., and Gerard, G.F. (1985) Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 35, 249.
2. Gerard, G.F., D'Alessio, J.M., Kotewicz, M.L., and Noon, M.C. (1986) Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA* 5, 271.

## Additional Products

<u>Product</u>	<u>Amount</u>	<u>Catalog no.</u>
PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System	50 rxns	12183-018
PureLink™ 96 Total RNA Purification Kit	384 rxns	12173-011
TRIzol® Reagent	100 ml	15596-026
	200 ml	15596-018
DNase I, Amplification Grade	100 units	18068-015

## Limited Use Label License No. 5: Invitrogen Technology

The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) not to transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of patents owned or controlled by Invitrogen Corporation which cover this product based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008. Phone (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500. Email: [outlicensing@invitrogen.com](mailto:outlicensing@invitrogen.com)

©2008 Invitrogen Corporation. All rights reserved.

For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.