

FastLane Kit — RNA 精製不要の遺伝子発現解析



Sample & Assay Technologies

実験工程のスピードアップと簡便化

FastLane™ Kit は培養細胞からのリアルタイム RT-PCR 解析の迅速化と能率化を実現します。RNA 精製操作の必要性を排除し、本キットを用いて細胞ライセートからリアルタイム RT-PCR を直接行なえます。本キットは、siRNA による遺伝子発現ノックダウンの検証のような迅速でハイスループットな遺伝子発現解析を必要とする実験に最適です。

FastLane Kit の利点：

- RNA 精製が不要なため時間を顕著に短縮
- 細胞からリアルタイム RT-PCR までわずか 3 ステップ
- 384 ウェルプレートのハイスループット解析にも対応
- ユニークな gDNA Wipeout Buffer により RNA のみを検出
- 至適化済みの試薬とプロトコールを用いて即座に実験開始

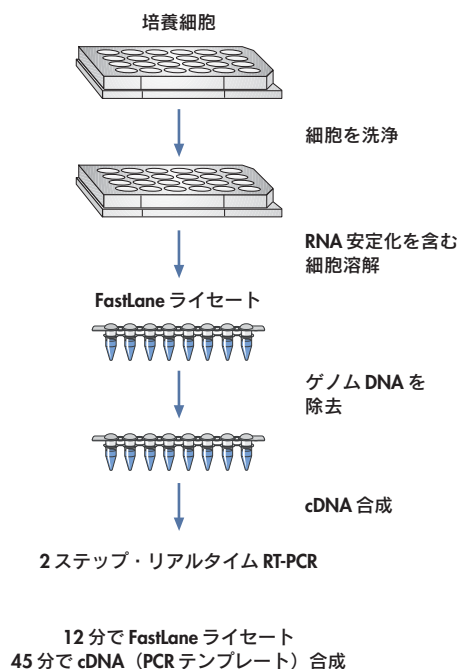
表 1. リアルタイム RT-PCR 用 FastLane Kit

操作方法	検出方法	対応するプレート	Kit	ページ
2 ステップ RT-PCR	全てに対応	96 ウェルまで *	FastLane Cell cDNA Kit	3
1 ステップ RT-PCR	SYBR® Green	384 ウェルまで †	FastLane Cell SYBR Green Kit	4
1 ステップ RT-PCR	プローブ	384 ウェルまで †	FastLane Cell Probe Kit	5
1 ステップ RT-PCR	マルチプレックス	384 ウェルまで †	FastLane Cell Multiplex Kit	6

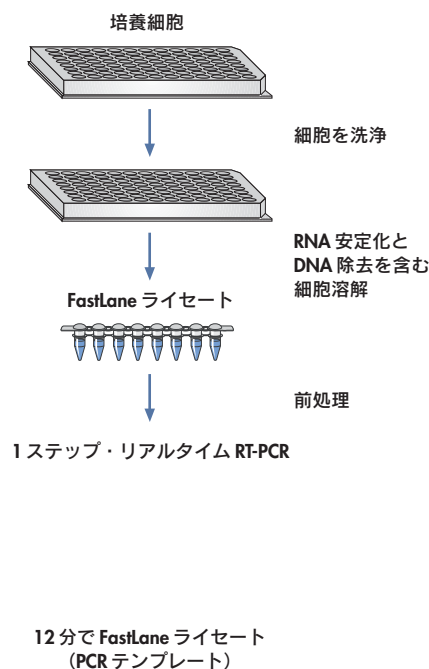
* 96 ウェルフォーマットでは QuantiTect® Reverse Transcription Kit (50) 1 個が追加が必要です。

† 384 ウェルフォーマットでは PCR 量を 50 µl から少なくとも 25 µl に減らすか、あるいは追加で QuantiTect RT-PCR Kit が必要です；お問い合わせください。

FastLane 2 ステップ RT-PCR 操作手順



FastLane 1 ステップ RT-PCR 操作手順



2ステップ RT-PCR — FastLane Cell cDNA Kit

細胞からの迅速な cDNA 合成法

FastLane Cell cDNA Kit の利点：

- 細胞から cDNA までわずか 4 ステップ
- 高い cDNA 収量により高感度な RT-PCR
- 再現性の高い cDNA 合成
- 迅速な遺伝子発現プロファイルのスナップショット

FastLane Cell cDNA Kit で合成した cDNA を用いて、2 ステップ・リアルタイム RT-PCR で高感度な再現性のある結果が得られます (図 1、2)。本キットで合成した cDNA を用いて 10^5 個から 1 個の細胞までの幅広い範囲で正確な検出が行なえます。

リアルタイム RT-PCR において RNA だけを確実に検出するため、ゲノム DNA の除去に画期的な gDNA Wipeout Buffer を使用しています。RNA 特異的なプライマーあるいはプローブをデザインする必要がないので時間および労力を節約できます。

リアルタイム定量 RT-PCR に至適化された QuantiTect Kit を FastLane Cell cDNA Kit と共に使用すると、複数の細胞サンプルを数時間以内に処理し、解析することができます。従って、siRNA による遺伝子発現ノックダウンの検証のような実験において、複数の転写物のスナップショットが可能です (図 3)。

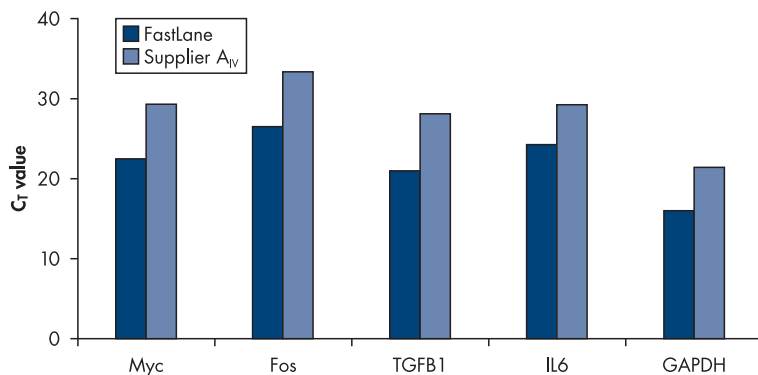


図 1. ガン遺伝子解析でより優れた感度 HeLa 細胞の様々なガン遺伝子の 2 ステップ・リアルタイム RT-PCR 解析において、A_{IV} 社の類似キットの代わりに FastLane Kit を用いて cDNA を調製した時に、より低い C_T 値が得られた。

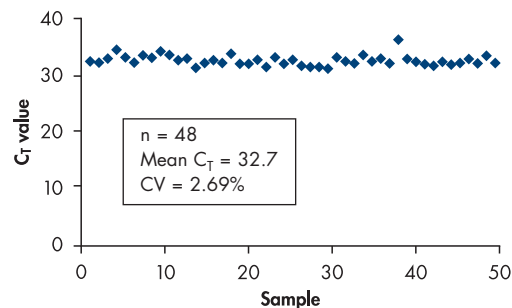


図 2. 再現性の高い cDNA 調製 HeLa 細胞を含む 48 ウェルプレートから FastLane Kit を用いて cDNA を調製した。Tubulin B (構成タンパク質) の発現を 2 ステップ・リアルタイム RT-PCR により解析した。

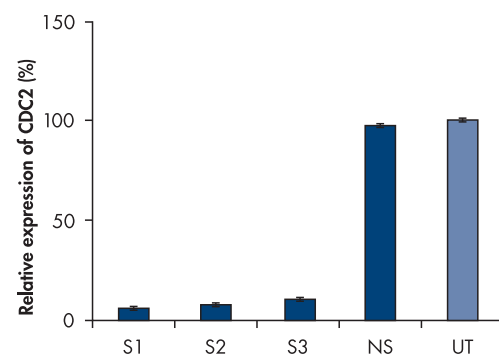


図 3. CDC2 ノックダウンの優れた解析結果 異なる CDC2 siRNAs (S1、S2、S3) あるいは nonsilencing siRNA (NS) を MCF-7 細胞にトランスフェクトした。48 時間後に FastLane Kit を用いて cDNA を調製した。GAPDH (内因性コントロール) に対する CDC2 (細胞周期関連タンパク質) の相対的な発現を 2 ステップ・リアルタイム RT-PCR により解析した。未処理細胞中 (UT) の相対的な CDC2 発現を 100% とした。

FastLane のその他の利点は 2 ページをご覧ください。

1 ステップ RT-PCR — FastLane Cell SYBR Green Kit

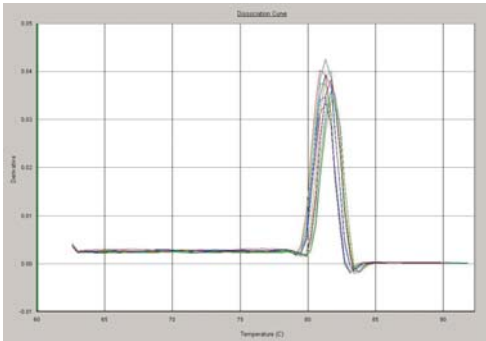


図4. 特異性の高い定量 FastLane Kit と INPP5D (ホスファターゼの一種) に特異的な QuantiTect Primer Assay を用いた 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR で HeLa、HepG2、Cos 細胞中の特異的な転写物の定量を行なった結果、融解曲線解析において単一のピークが得られた。

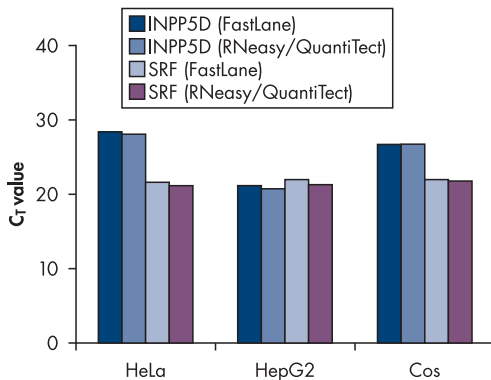


図5. RNA 精製なしに高感度な検出 2 種類の発現量の低い転写物、INPP5D (ホスファターゼの 1 種) と RF (serum response factor) を 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR により定量した。FastLane Kit により、RNeasy® Mini Kit と QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit を用いて得られる値に相当する C_T 値が得られた。

図7. 様々な転写物の信頼できる検出結果 FastLane Kit を用いて 384 ウェルプレート中の A549 細胞の Eg5、GAPDH、HMBS、Rab5 の発現を解析した。データは 3 つのウェルからの C_T 平均値と標準偏差を示している。データ提供； Anne Grabner, Cenix BioScience GmbH, Germany

ハイスピードで特異的な SYBR Green を用いた検出

FastLane Cell SYBR Green Kit の利点：

- SYBR Green を用いた定量で高い特異性
- 発現量の低い転写物を高感度で検出
- ハイスループット解析において再現性の高い結果
- 96 ウェルあるいは 384 ウェルプレートを簡単に処理

FastLane Cell SYBR Green Kit は非特異的産物やプライマーダイマーの形成を回避するユニークな RT-PCR バッファーを使用しているため、1 ステップ・リアルタイム RT-PCR において高感度な定量を実現します (図 4)。RNA 精製工程がないにもかかわらず、感度の高い定量が行なえます (図 5)。ハイスループット実験における結果の再現性は非常に高く (図 6、7)、またゲノム DNA コンタミによる影響もありません。

本キットを QuantiTect Primer Assay と組み合わせて使用すると、転写物を高い特異性で確実に検出できます。QuantiTect Primer Assay はデザイン済みのゲノムワイドなプライマーセットで、ウェブサイトを検索、注文ができます (www.qiagen.com/GeneGlobe)。

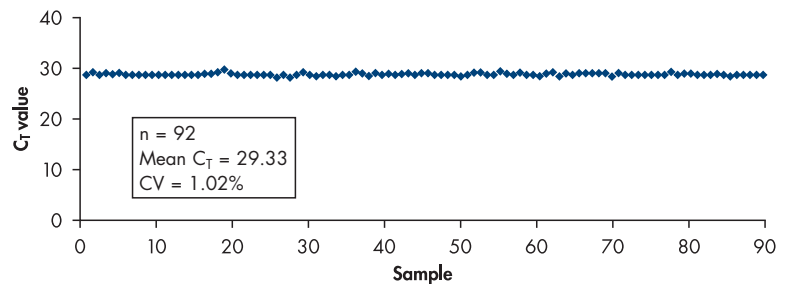
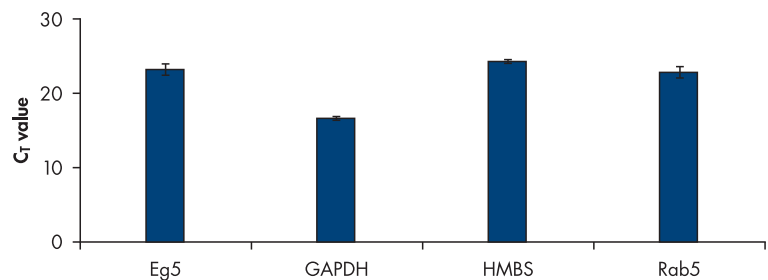


図6. 96 ウェルプレートを用いて再現性の高い解析結果 FastLane Kit と INPP5D (ホスファターゼの一種) に特異的な QuantiTect Primer Assay を用いた 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR で HeLa ACC 細胞を含む 96 ウェルプレートから再現性の高い C_T 値が得られた。



FastLane のその他の利点は 2 ページをご覧ください。

1 ステップ RT-PCR — FastLane Cell Probe Kit

ハイスピードで再現性の高いプローブを用いた定量

FastLane Cell Probe Kit の利点：

- RNA 精製なしの、確立されたプローブ検出
- 低コピー・ターゲットの高感度なプローブ検出
- ハイスループット解析において再現性の高い結果
- 96 ウェルあるいは 384 ウェルプレートを簡単に処理

FastLane Cell Probe Kit は、RNA 精製を行わずに 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR においてプローブを用いた高感度な検出を実現します (図 8)。本キットを用いたリアルタイム定量は、類似のキットと比較してより高感度で、かつ幅広いテンプレート範囲で直線性があり (図 9、10)、高い再現性を示します (図 11)。さらにゲノム DNA による定量への影響はありません。

ほとんどのタイプのプローブを FastLane Cell Probe Kit とともに使用できます。使用可能なプローブには TaqMan® あるいはその他のダブル標識プローブ、LightCycler® hybridization (FRET) プローブ、Molecular Beacons が含まれます。即使用可能な RT-PCR マスターミックスはプローブ濃度やその他の PCR パラメーターの至適化を行なう必要がありません。

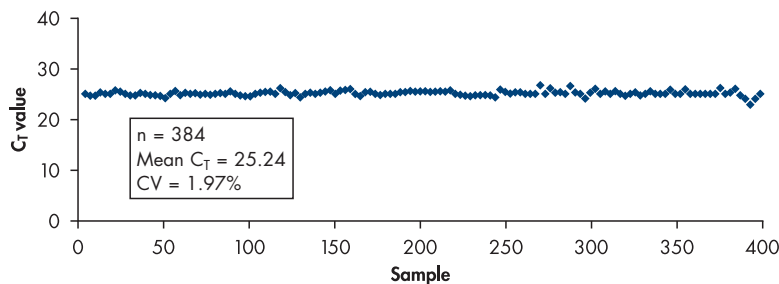


図 11. 384 ウェルプレートを用いて再現性の高い解析結果 FastLane Kit を用いた 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR による NFκB1 (転写因子) の発現解析で、HeLa 細胞の 384 ウェルプレートから再現性の高い C_T 値が得られた。

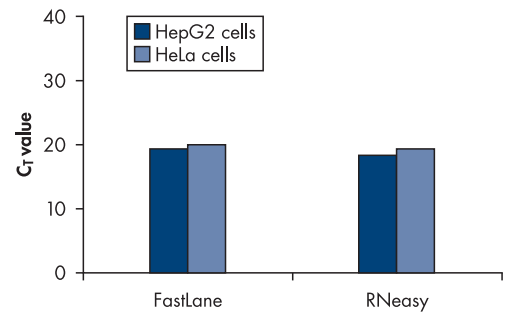


図 8. RNA 精製なしに高感度なプローブ検出 β-アクチン (細胞骨格タンパク質) の発現を 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR により解析した。FastLane Kit を用いた時、RNeasy Mini Kit と QuantiTect Probe RT-PCR Kit を用いて得られる値に相当する C_T 値が得られた。

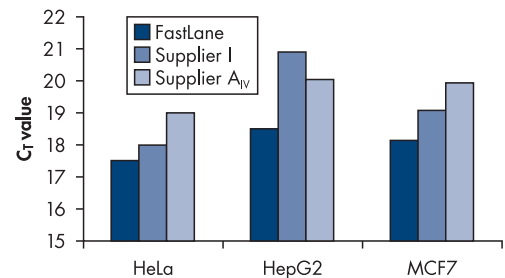


図 9. その他のキットに比較してより高い感度 他社の類似するキットに比べて FastLane Kit は 1 ステップ・リアルタイム RT-PCR でより低い C_T 値を示した。各キットは PPIA (イソメラーゼの 1 種) を用アッセイと一緒に使用した。

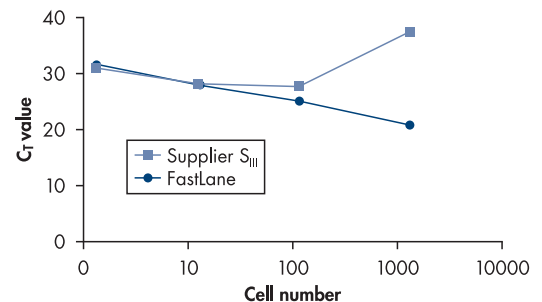


図 10. 単一細胞まで直線性のある検出 FastLane Kit は 1 ~ 10,000 個の HeLa 細胞中の β-アクチンを高い直線性で検出できた (ライセートの段階希釈を解析した)。しかし、S_{III} 社の類似するキットによる検出結果は直線性を示さなかった。

FastLane のその他の利点は 2 ページをご覧ください。

1 ステップ RT-PCR — FastLane Cell Multiplex Kit

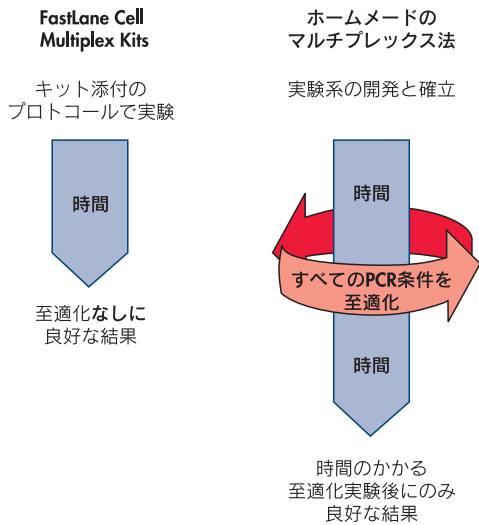


図 12. 至適化ステップ不要のマルチプレックス解析
FastLane Cell Multiplex KitはPCRパラメーターに関する多くの至適化が不要である。

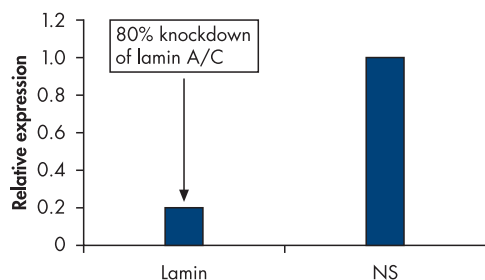


図 13. 遺伝子サイレンシングの信頼できる検証
HCT116細胞の入った96ウェルプレートでウェル5つに lamin A/C siRNA (**Lamin**) あるいは nonsilencing siRNA (**NS**) をトランスフェクトした。FastLane Kitおよび lamin A/C (構成タンパク質) と 18S rRNA (内因性コントロール) 用の TaqMan アッセイを用いてマルチプレックス・リアルタイム RT-PCR により細胞を解析した。データ提供； Angela Quinn, Genzyme Corporation, USA

最高4ターゲット*までをハイスピード解析

FastLane Cell Multiplex Kitの利点：

- RNA 精製なしで行なえる初めてのマルチプレックス RT-PCR キット
- 通常必要な反応条件の至適化実験は不要
- ハイスループット解析において再現性の高い結果
- ウェルあたり最高4個のターゲット*を解析可能

ホームメイドのマルチプレックス法と違い FastLane Cell Multiplex Kit は最初の1ステップのマルチプレックス・リアルタイム RT-PCR 実験で良好な結果を実現します (図 12)。これは斬新な RT-PCR バッファーとホットスタート DNA ポリメラーゼを含む最適化されたマスターミックスによります。96 ウェルや 384 ウェルプレートでのマルチプレックス解析は高い再現性を実現します (図 14)。

本キットは、siRNA による遺伝子発現ノックダウンの検証のような迅速でハイスループットな遺伝子発現解析に最適です (図 13)。同じ反応液中でターゲットおよびコントロール遺伝子を同等の高い PCR 効率で増幅するので $\Delta\Delta C_T$ 法による相対的な定量が可能です。

蛍光補正のために ROX 色素が必要なサイクラー用に FastLane Cell Multiplex Kit、およびその他のサイクラーに対応する FastLane Cell Multiplex NR Kit の2種類のキットフォーマットがあります。

* サイクラーに依存します。

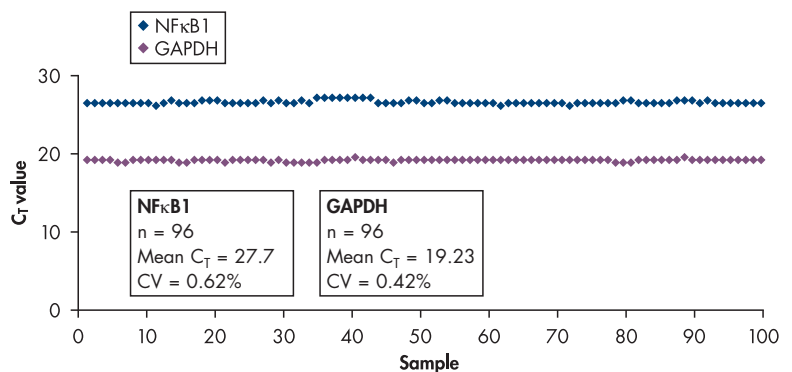


図 14. 96 ウェルプレートを用いて再現性の高い解析結果 FastLane Kit を用いた1ステップ・リアルタイム RT-PCR による NFκB1 (転写因子) と GAPDH (内因性コントロール) の発現解析で、HeLa 細胞の96ウェルプレートから再現性の高い C_T 値が得られた。

FastLane のその他の利点は2ページをご覧ください。

オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.	価格 (¥)
FastLane Cell cDNA Kit (50)	Buffer FCW, Buffer FCP, and components for 50 x 20 µl reverse-transcription reactions	215011	73,000
FastLane Cell SYBR Green Kit (200)	FastLane Cell One-Step Buffer Set and FastLane Cell SYBR Green RT-PCR Mixes	216213	168,000
FastLane Cell Probe Kit (200)	FastLane Cell One-Step Buffer Set and FastLane Cell Probe RT-PCR Mixes	216413	145,000
FastLane Cell Multiplex Kit (200)*	FastLane Cell One-Step Buffer Set and FastLane Cell Multiplex RT-PCR Mixes	216513	169,000
FastLane Cell Multiplex NR Kit (200)†	FastLane Cell One-Step Buffer Set and FastLane Cell Multiplex RT-PCR NR Mixes	216713	169,000
2ステップ RT-PCR 製品 (SYBR Green、プローブ、マルチプレックス検出)			
QuantiTect SYBR Green PCR Kit (200)	For 200 x 50 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x Master Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204143	49,000
QuantiTect Probe PCR Kit (200)	For 200 x 50 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x Master Mix, 2 x 2 ml RNase-Free Water	204343	54,500
QuantiTect Multiplex PCR Kit (200)*‡	For 200 x 50 µl reactions: 3 x 1.7 ml 2x Master Mix (with ROX dye), 2 x 2 ml RNase-Free Water	204543	71,500
QuantiTect Reverse Transcription Kit (50)	Components for 50 x 20 µl reverse-transcription reactions	205311	39,000
QuantiTect Reverse Transcription Kit (200)	Components for 200 x 20 µl reverse-transcription reactions	205313	134,000

* Applied Biosystems 製のサイクラー用に推奨。

† その他のメーカーのサイクラーに推奨。 ‡ 他のサイクラー用に ROX 色素の入っていないキットが入手可能ですので、お問い合わせください。

FastLane、QuantiTect 製品および RNeasy Mini Kit 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。

Trademarks: QIAGEN®, FastLane™, QuantiTect®, RNeasy® (QIAGEN Group); LightCycler® (Roche Group); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); TaqMan® (Roche Group).

Purchase of the FastLane Cell SYBR Green Kit, QuantiTect SYBR Green PCR Kit, and QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit is accompanied by a limited, non-transferable immunity from suit to use it with detection by a dsDNA-binding dye as described in U.S. Patents Nos. 5,994,056 and 6,171,785 and corresponding patent claims outside the United States for the purchaser's own internal research. No real-time apparatus or system patent rights or any other patent rights, and no right to use this product for any other purpose are conveyed expressly, by implication or by estoppel.

The FastLane Cell Probe Kit, FastLane Cell Multiplex Kits, QuantiTect Probe PCR Kit, QuantiTect Probe RT-PCR Kit, QuantiTect Multiplex PCR Kits, and QuantiTect Multiplex RT-PCR Kits are an Authorized 5' Nuclease Core Kit without Licensed Probe. Its purchase price includes a limited, non-transferable immunity from suit under certain patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd, for using only this amount of the product in the practice of the 5' nuclease process solely for the purchaser's own internal research when used in conjunction with Licensed Probe. No right under any other patent claims (such as apparatus or system claims) and no right to use this product for any other purpose is hereby granted expressly, by implication or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Purchase of the FastLane Cell SYBR Green Kit, FastLane Cell Probe Kit, FastLane Cell Multiplex Kits, QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QuantiTect Probe RT-PCR Kit, and QuantiTect Multiplex RT-PCR Kits is accompanied by a limited, non-transferable license under RT and Reverse Transcription-PCR patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd to use it for the purchaser's own internal research. No real-time patent rights of any kind, no right under any other patent claims (such as apparatus or system claims), and no right to use this product for any other purpose is hereby granted expressly, by implication or by estoppel.

QuantiTect Primer Assays are compatible for use in the 5' nuclease process or the dsDNA-binding dye processes covered by patents owned by Roche or owned by or licensed to Applied Biosystems. No license under these patents to practice the 5' nuclease process or the dsDNA-binding dye processes are conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product.

© 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

