

Quick Reference Card

High Capacity RNA-to-cDNA Kit

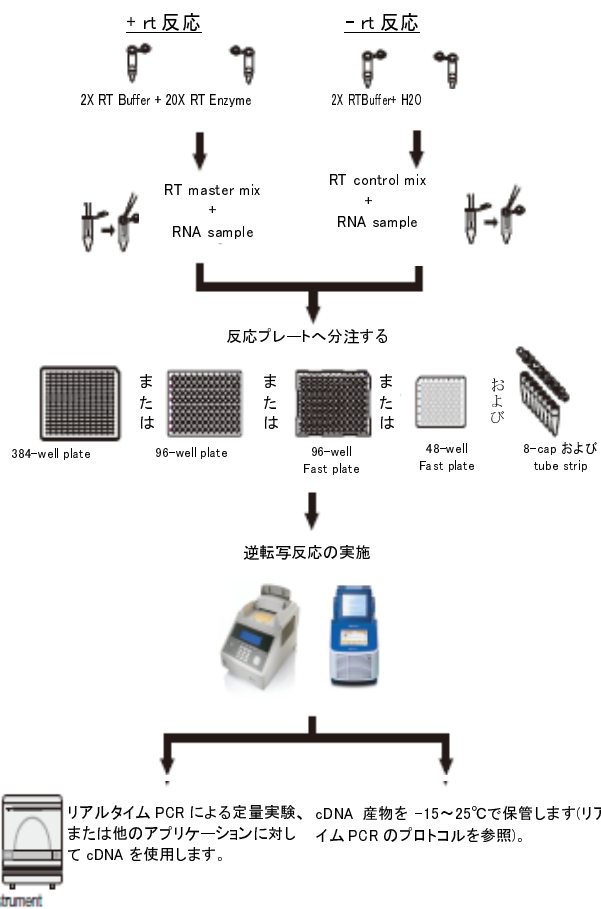
安全およびバイオハザード指針については、High Capacity RNA-to-cDNA Kit Protocolの「Safety」のセクションを参照して下さい。すべての**赤い太字**の化学物質については、MSDSを参照し、取扱説明書に従って下さい。適切な眼の保護具、保護服および保護手袋を着用して下さい。

概要

High Capacity RNA-to-cDNA Kitを使用してtotal RNAから一本鎖cDNAを合成します：

High Capacity RNA-to-cDNA Kitの最適なパフォーマンスを得るために、Appliedbiosystems は以下のRNAを使用することを推奨しています。


- 逆転写およびPCR阻害剤を含まない
- TE bufferはPCRに適しているbufferに溶解している
- RNaseを含まない



リアルタイム PCR による定量実験、cDNA 産物を -15~25℃で保管します(リアルタイム PCR または他のアプリケーションに対して cDNA を使用します)。

リアルタイム PCR 装置

手順

STEP	ACTION																					
1	Total RNAの入力量	20 μ L 反応あたり 2 μ g までの Total RNA が使用できます。																				
2	逆転写反応液の調整	<p>キットに含まれる構成成分を用いて逆転写反応液の調整を行います。</p> <p>逆転写反応液 (20μL 反応あたり) の作成:</p> <p>a. 氷上で試薬を解凍します。 b. 次の表を参照して反応数に応じて必要とされる試薬の量を算出します。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">コンポーネント</th> <th colspan="2">量/反応(μL)</th> </tr> <tr> <th>+RT</th> <th>-RT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2\times RT Buffer</td> <td>10.0</td> <td>10.0</td> </tr> <tr> <td>20\times RT Enzyme Mix</td> <td>1.0</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>Nuclease-free H₂O</td> <td>Q.S.[†]</td> <td>Q.S.[†]</td> </tr> <tr> <td>Sample</td> <td>up to 9 μL</td> <td>up to 9 μL</td> </tr> <tr> <td>Total per Reaction</td> <td>20.0</td> <td>20.0</td> </tr> </tbody> </table> <p>[†] Quantity Sufficient、必要量</p> <p>Note: 逆転写反応は氷上で行ってください。ピペティング誤差を考慮して反応液は少し多めに調整します。</p> <p> WARNING CHEMICAL HAZARD. 2\times RT/バッファーは目、皮膚および気道刺激作用を生じる可能性があります。MSDSを参照し、取扱説明書に従ってください。適切な保護めがね、保護服および保護手袋を着用してください。</p>	コンポーネント	量/反応(μ L)		+RT	-RT	2 \times RT Buffer	10.0	10.0	20 \times RT Enzyme Mix	1.0	—	Nuclease-free H ₂ O	Q.S. [†]	Q.S. [†]	Sample	up to 9 μ L	up to 9 μ L	Total per Reaction	20.0	20.0
コンポーネント	量/反応(μ L)																					
	+RT	-RT																				
2 \times RT Buffer	10.0	10.0																				
20 \times RT Enzyme Mix	1.0	—																				
Nuclease-free H ₂ O	Q.S. [†]	Q.S. [†]																				
Sample	up to 9 μ L	up to 9 μ L																				
Total per Reaction	20.0	20.0																				
3	cDNA逆転写反応の調製	<p>cDNA 逆転写反応の準備:</p> <p>a. WellまたはtubeにRT反応液を20μL分注します。 b. Plateまたはtubeを密封します。 c. 反応液を底に落とし、気泡を除去するために、軽くplateとtubeを遠心します。</p> <p>Thermal cyclerまたはApplied Biosystems Real-TimePCR system にセットする準備ができるまで、氷上にplateまたはtubeを静置します。</p>																				

ステップ	アクション													
4	逆転写反応の実施	<p>逆転写を行うには:</p> <p>a. High Capacity RNA-to-cDNA Kit Protocol (製品番号4387951)で、「Materials and Equipment」に記載されている推奨 thermal cyclerを使用して、温度条件をプログラムします:</p> <p>IMPORTANT! これらの条件は、High Capacity RNA-to-cDNA Kitを使用する場合に最適化されています。</p> <table border="1" data-bbox="743 479 1334 580"> <thead> <tr> <th></th> <th>Step 1</th> <th>Step 2</th> <th>Step 3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>温度(°C)</td> <td>37</td> <td>95</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>時間</td> <td>60 min</td> <td>5 min</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table> <p>b. 反応容量を20 µLに設定します。 c. 反応 plate もしくは tube を thermal cycler または Applied Biosystems Real-TimePCR Systemにロードします d. 逆転写反応を開始します。</p>		Step 1	Step 2	Step 3	温度(°C)	37	95	4	時間	60 min	5 min	∞
	Step 1	Step 2	Step 3											
温度(°C)	37	95	4											
時間	60 min	5 min	∞											
5	cDNA逆転写反応の保存	<p>High Capacity RNA-to-cDNA Kit で調整されたcDNA 産物は以下の条件で短期間、あるいは長期間保存可能です。</p> <table border="1" data-bbox="707 846 1372 947"> <thead> <tr> <th>保管期間</th> <th>保存温度(°C)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>短期 (使用前の24時間まで)</td> <td>2~8</td> </tr> <tr> <td>長期</td> <td>-15~-25</td> </tr> </tbody> </table> <p>必要に応じて反応済みplateまたはtubeを軽く遠心して、溶液から気泡を取り除きます。</p>	保管期間	保存温度(°C)	短期 (使用前の24時間まで)	2~8	長期	-15~-25						
保管期間	保存温度(°C)													
短期 (使用前の24時間まで)	2~8													
長期	-15~-25													

© Copyright 2007, Applied Biosystems. All rights reserved.

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

Applera, Applied Biosystems, and AB (Design) are registered trademarks of Applera Corporation or its subsidiaries in the U.S. and certain other countries. All other trademarks are the sole property of their respective owners.

9/2007

www.appliedbiosystems.com



Part Number 4392339 Rev. A