

# High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits

For 200 and 1000 Reactions

簡易プロトコール (RevE.06/2010 より抜粋)



© Copyright 2006, 2007, 2010 Applied Biosystems. All rights reserved.

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

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS 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.

**DISCLAIMER OF LICENSE:**

**No license is conveyed with the purchase of this product under U.S. Patents, and corresponding patent claims outside the U.S., relating to the 5' nuclease and dsDNA-binding dye processes. 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.**

**TRADEMARKS:**

AB (Design), Applied Biosystems, and GeneAmp are registered trademarks and Applera, MicroAmp, and MultiScribe are trademarks of Applied Biosystems or its subsidiaries in the U.S. and/or certain other countries.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

Part Number 4375575 Rev. E  
06/2010

## High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 使用方法

**概要** High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitsを使用した  
トータル RNAから一本鎖cDNAの合成手順:

2X Reverse Transcription Master Mixを準備



トータルRNA を2X RT Master Mix に加え  
1X mix を調製



サーマルサイクラーで逆転写反応



定量やその他PCRアプリケーションに  
直接逆転写反応液(cDNA)を使用

逆転写反応液(cDNA)  
を保存

### RNAテンプレートの ガイドライン

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitsで最適な反応  
を行うため、以下に挙げるRNAの状態を推奨しています:

- ・ 逆転写反応やPCR反応に対する阻害物質が含まれていない
- ・ PCR反応に適したバッファーや水に溶解している
- ・ RNase を含まない

注意: もし抽出したRNAにRNase が含まれている心配が  
あれば、逆転写反応液に終濃度1.0 U/ $\mu$ L となるようRNase  
Inhibitor を添加してください


### トータルRNAの 持ち込み量

1反応20 $\mu$ L当たり、トータルRNA量の上限は2 $\mu$ g

2×逆転写反应用  
マスターミックスの調製

反応プレートを準備する前に、2× 逆転写反応マスターミックスを調製してください。

2× 逆転写反应用マスターミックス組成 (1反応あたり 20μL):

1.	氷上で試薬を融解する																										
2.	<p>下記の組成表に従い、反応数に応じた試薬量を計算する</p> <p>注意:分注作業は氷上で行ってください。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Component</th> <th colspan="2">Volume/Reaction (μL)</th> </tr> <tr> <th>Kit with RNase Inhibitor</th> <th>Kit without RNase Inhibitor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10× RT Buffer</td> <td>2.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>25× dNTP Mix (100 mM)</td> <td>0.8</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>10× RT Random Primers</td> <td>2.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> </tr> <tr> <td>RNase Inhibitor</td> <td>1.0</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>Nuclease-free H<sub>2</sub>O</td> <td>3.2</td> <td>4.2</td> </tr> <tr> <td><b>Total per Reaction</b></td> <td><b>10.0</b></td> <td><b>10.0</b></td> </tr> </tbody> </table> <p>重要! 反応数が多い場合は、分注時にロスが生じますので余分に反応液を調製してください。</p> <p> <b>WARNING</b> CHEMICAL HAZARD. 10× Reverse Transcription Buffer は、目、皮膚、および呼吸器系の炎症を引き起こす場合があります。MSDS をよくお読みになり、操作手順書に従ってください。保護眼鏡、白衣、および手袋の着用を推奨しています。</p>	Component	Volume/Reaction (μL)		Kit with RNase Inhibitor	Kit without RNase Inhibitor	10× RT Buffer	2.0	2.0	25× dNTP Mix (100 mM)	0.8	0.8	10× RT Random Primers	2.0	2.0	MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0	1.0	RNase Inhibitor	1.0	—	Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3.2	4.2	<b>Total per Reaction</b>	<b>10.0</b>	<b>10.0</b>
Component	Volume/Reaction (μL)																										
	Kit with RNase Inhibitor	Kit without RNase Inhibitor																									
10× RT Buffer	2.0	2.0																									
25× dNTP Mix (100 mM)	0.8	0.8																									
10× RT Random Primers	2.0	2.0																									
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0	1.0																									
RNase Inhibitor	1.0	—																									
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3.2	4.2																									
<b>Total per Reaction</b>	<b>10.0</b>	<b>10.0</b>																									
3.	氷上に置き、2×逆転写反应用マスターミックスをやさしく混合する																										

逆転写反応液  
調製

以下の手順に従い、逆転写反応液の調製を行います:

1.	2X逆転写反応溶液を96ウェルプレートの各ウェル、またはチューブに10 $\mu$ Lずつ分注する
2.	RNA サンプルを10 $\mu$ L ずつ各ウェルに分注し、2回ピペティングで反応液を混合する
3.	プレートまたはチューブにフタをする
4.	プレートまたは チューブを軽く遠心し気泡を除去する
5.	サーマルサイクラーにセットするまで、プレートまたはチューブは氷上で保管する

逆転写反応  
温度条件

以下の反応温度条件で逆転写反応を行います:

1.	サーマルサイクラー ( <a href="#">英文マニュアルのP.4のTable 3 参照</a> ) に以下の温度条件を設定する 重要! 以下の温度条件は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitsを使用した際に最適な条件です。															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Step 1</th> <th>Step 2</th> <th>Step 3</th> <th>Step 4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Temperature (<math>^{\circ}</math>C)</td> <td>25</td> <td>37</td> <td>85</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Time</td> <td>10 min</td> <td>120 min</td> <td>5 min</td> <td><math>\infty</math></td> </tr> </tbody> </table>		Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Temperature ( $^{\circ}$ C)	25	37	85	4	Time	10 min	120 min	5 min	$\infty$
	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4												
Temperature ( $^{\circ}$ C)	25	37	85	4												
Time	10 min	120 min	5 min	$\infty$												
2.	反応液量を 20 $\mu$ L に設定する															
3.	プレート、チューブをサーマルサイクラーにセットする															
4.	ランを開始する															

**逆転写反応液  
cDNA の保管** High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitsを使用して  
逆転写したcDNAは、プレートまたはチューブに分注し  
以下の温度帯で保管が可能です。

保管期間	保管温度 (°C)
短期間 (使用前24時間まで)†	2 ~ 6
長期間	-15 ~ -25

† 2 ~ 6 °Cで保管期間を延長する場合は、陽イオンをキレートし核酸の分解を防ぐため、終濃度が1 mM となるようEDTAを添加します。

**重要！** 必要に応じて、保管前のプレートまたはチューブを軽く遠心し気泡を除去してください。

**Worldwide Sales and Support**

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists.

**Headquarters**

850 Lincoln Centre Drive Foster City,  
CA 94404 USA Phone: +1  
650.638.5800  
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224  
Fax: +1 650.638.5884

06/2010