

条件検討その1

遺伝子の増幅と Ct 値のチェック (1st PCR)

1 準備と注意点

1.5mL チューブのラベル（2本）を先にすましておく（下図参照）。



使用する水はあらかじめ十分量を 1.5mL に分取し、そこから使用します（ストックの水を汚染しないため）。

溶液の分取には必ずフィルターチップを使います。

チップはすぐに捨てて常に新しいものを使います（コンタミの防止）。

2 反応溶液の作成

以下の試薬をラベルした 1.5mL チューブに加えます。

（プライマーごとにチューブを分けます。）

ddH ₂ O	16	
2x Master Mix	20	
50x ROX	0.8	
<u>10μM each Primer mix.</u>	<u>1.2</u>	<u>(BiP or ACTB) (μL)</u>
Total	38	

加え終わったらボルテックス後スピンドウン。

19 μ L ずつ PCR チューブ (2 連のものを 2 セットお渡しします) に分注する。

サンプルを区別できるようにチューブ側面上部に印やグループ番号等を小さく書いておいてください (あまり大きく書くと測定に影響します) 。

逆転写した cDNA を 1 μ L ずつ入れて蓋をします。

(SampleA, SampleB, SampleA, SampleB の順番)

最終的に

BiP primer SampleA cDNA	BiP primer SampleB cDNA	ACTB primer SampleA cDNA	ACTB primer SampleB cDNA
----------------------------	----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

の 2 連チューブが 2 本できます。

ボルテックスで混ぜてスピンドウン。

リアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始します。

リアルタイム PCR 用のチューブには測定に影響するため色付きペンでのラベリングはできません。また黒色でラベルする場合でも上部側面に小さい点を描くくらいにとどめます。

(すぐに反応を始めない場合はアルミホイルで遮光して 4 $^{\circ}$ C の冷蔵庫で保管する) 。