

# リアルタイム PCR 本実験

## 0 注意点

フィルターチップを使う。

なるべく長いチップを優先する。5 $\mu$ L とるときは P20 のチップ。ピペッターの先のほうがチューブ入り口の壁面につかないようにする。

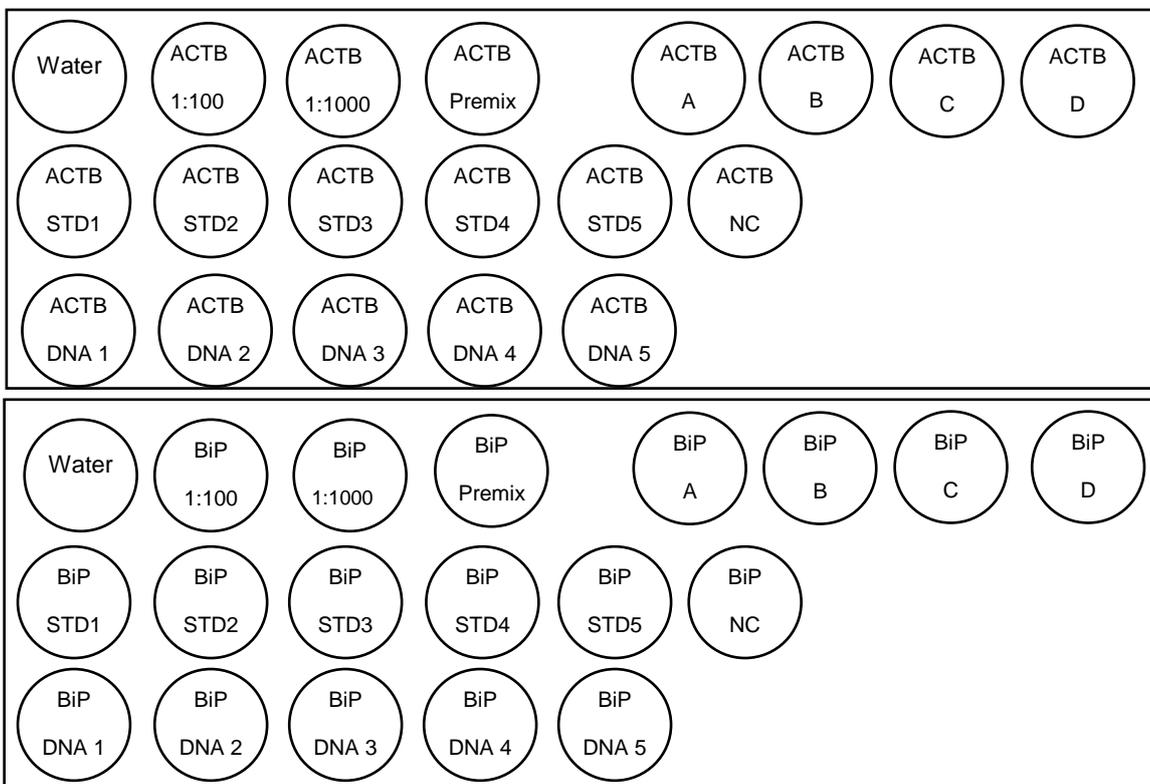
濃い DNA 溶液を吸ったチップは吐出後すぐ捨てる。

## 1 準備

使用する分の 1.5mL チューブをチューブ立てにならべ、ラベルを先にすましておく。

2 グループで 1 つの解析を行います。グループ毎に ACTB または BiP を受け持ちます。

今回は Sample A, B に加えて、Sample C と D も一緒に測定してみます。



各グループどちらか一方のみ行います。

本実験では 2nd PCR の結果を踏まえて検量線の範囲とポイント数を決めます。今回は ACTB、BiP 両プライマーともに 2nd PCR の STD1 から STD5 までの 5 ポイントを同じ希釈で作成します。

水用の 1.5mL チューブを用意し 1mL を分注しておく。すべての水はここから使用する。ストックの水を汚染しないため。

“～DNA1” から “～DNA5” とラベルしたチューブ（スタンダード DNA 希釈系列用）に水を 45 $\mu$ L ずつ入れておく。

1:100 とラベルしたチューブに水を 198 $\mu$ L 入れておきます。1:1000 とラベルしたチューブには水を 90 $\mu$ L 入れます。

## 2 PREMIX 溶液の作成

---

以下の試薬を “～premix” とラベルした 1.5mL チューブに混ぜます。必要量+ $\alpha$  (1本分) を作ります。今回の場合、検量線用 10 + 検体用 12 + NC 用 2 +  $\alpha$ 用 1 = 25 本分です。

ddH <sub>2</sub> O	200
2x Thunderbird Master Mix	250
50x ROX	10
<u>10<math>\mu</math>M Primer mix. (BiP or ACTB)</u>	<u>15 (<math>\mu</math>L)</u>
Total	475

ボルテックスで混ぜてスピンドウンする。

BiP または ACTB A (B, C, D) とラベルしたチューブに 57 $\mu$ L ずつ分注する。

～STD および NC とラベルした 1.5mL チューブに 38 $\mu$ L ずつ分注する。（NC は最後に入れるほうがよい。）

NC ネガティブコントロールのチューブに水を 2 $\mu$ L 加えてボルテックス、スピンする。

プレミックス溶液の入った 1.5mL チューブは引き出しに入れておく。

### 3 スタandard DNA 希釈溶液の作成

---

(準備の項目で行った操作)

Standard DNA 希釈系列用 1.5mL チューブ “~DNA1” から “~DNA5” に水を 45 $\mu$ L ずついれておく。

1:100 とラベルしたチューブに水を 198 $\mu$ L いれておく。1:1000 とラベルしたチューブには水を 90 $\mu$ L いれておく。

条件検討 1 で増幅した反応溶液（これを Standard 溶液原液とします。）を希釈して検量線用 Standard 溶液を作成します。サンプル A から増幅した反応溶液を使います。

**(重要) ここで初めて Standard 溶液原液を実験台に持ってくる。**

1:100 のチューブ (水が 198 $\mu$ L 入っている) に 1st PCR の反応後溶液（プライマーが同じもの）を 2 $\mu$ L 加えてボルテックスで混ぜ、スピンドウンします。

1:1000 のチューブ (水 90 $\mu$ L 入り) に 1:100 の溶液を 10 $\mu$ L 加えてボルテックス、スピンドウンします。

**ここで手に DNA 溶液がついた場合には以降の操作で混入しないように手袋ごと手を洗うか、手袋を取り替えます。**

DNA1 に 1:1000 の溶液を 5 $\mu$ L 加える。このとき必ず P20 のチップを使う。P2-10 用の短いチップではピペッター本体の先端に濃い DNA 溶液がついてしまう可能性がある。

ボルテックスで混ぜる。蓋の裏につかなければスピンドウンはしなくてよい。ついた場合はスピンドウン。

DNA2 に DNA1 を 5 $\mu$ L 加えて同様に混ぜる。

以下 DNA5 まで繰り返す。

## 4 PREMIX と DNA の混合

---

1 日目に作成した Sample A の逆転写 DNA 3 $\mu$ L を ACTB A または BiP A とラベルした 1.5mL チューブ (Premix 入り) に加える。

ボルテックス後、スピンドウン。

Sample B, C, D についても同様に 3 $\mu$ L を Premix 入り 1.5mL チューブに加え、ボルテックス、スピンドウンします。

スタンダード DNA 溶液を 2 $\mu$ L ずつプレミックス入り 1.5mL チューブに加え、**反応溶液**を作成する。手順は以下の通り。

必ず一番薄い DNA5 から混合を始める。

DNA5 のチューブから 2 $\mu$ L を STD5 とラベルしたプレミックス溶液へ加える。ボルテックスで混合しスピンドウンする。

STD4 から STD1 までも同様に処理する。

手袋をしたまま手を洗う。

## 5 PCR 用チューブへの分注

---

連結 PCR チューブをチューブ立てに置く。今回は 6 連にカットしてあります。

Sample A～D の反応溶液を 20 $\mu$ L ずつ 3 つの PCR チューブに分注します（3 反復とします）。**別紙 2 参照。**

チューブに蓋をしておく。

ネガティブコントロールとして水が入った反応溶液を 20 $\mu$ L ずつ、2 つの連結 PCR チューブの一番奥に入れる。

次に STD5 の反応溶液を 2 番目のチューブに 20 $\mu$ L ずつ入れる。

このときに反応溶液を吸ったままのチップが決してネガティブコントロールのチューブの上を通らないようにする。以下同じく反応溶液を吸ったままのチップがそれよりも薄い DNA 濃度の反応溶液のチューブ上を通らないようにする。

同様に STD4 から STD1 までの反応溶液を 8 連チューブに 20 $\mu$ L ずつ分注する。

チューブに蓋をする。

スピンドウンしてリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始する。

すぐに PCR 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。