Real-time PCR -II

Primer Check (SYBR Green の kit を使用する場合)

2014.8 ver. 2

by M. Furuoka

※ Primer Check には、目的遺伝子が十分発現しているサンプルを用いる

①希釈系列の作製

ターゲット遺伝子の検量線作成のために、templateの希釈系列を段階希釈でつくる

(1/2、1/10、1/50、1/250、1/1250 倍希釈)

※ 段階希釈の際はチップを毎回換える

Template は 2 μ L/ well なので Duplicate(2 点取り)の場合、[(2 μ L×2well×プライマー数)+1] μ L に足りる量ずつ作製する。

※ MQW は新しいものを使用

(例:3種類プライマーがある場合、(2×2×3) +1=13 µL あればよいので cDNA を 20 µL 作製 → MQW: cDNA=10 µL: 10 µL で 1/2 希釈 → MQW: 1/2 希釈液=16 µL: 4 µL で 1/10 希釈 → MQW: 1/10 希釈液=16 µL: 4 µL で 1/50 倍希釈……)

②反応液作製

Total	23.0 µL /well
MQW	8.5 µL
Primer Reverse (10 μ M)	1.0 µL
Primer Forward (10 μ M)	1.0 µL
SYBR Premix Ex Taq*	12.5 μL

*: Takara #RR820B SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)

③サンプルアプライ

 \mathcal{F}_{2} ープまたはプレートに Template を 2 μ L ずつアプライする。

 \downarrow

反応液を23µL加え、泡立てないよう注意しながら慎重にピペッティングして混和する。

※ 泡は増幅反応における温度上昇に影響するので必ず取除く。

※ スピンダウンして液は底に落とす。

※ 液量がそろっていないとばらつきの原因になるので、チップに液が残っていないかに注意しながらア プライする。

④設定

Real-Time system 本体の電源を ON

※ ハロゲンランプのスタンバイに約15分かかる。

```
※ ランプには寿命があるのであまり早くつけない。
\downarrow
PC の電源 ON→「TaKaRa DiceRealTime~」を起動
\downarrow
画面左上の □ をクリック、または File \rightarrow New experiment を開く
\downarrow Experiment Type \rightarrowRQ
↓ User ID → Cell Regulation (反応終了時にランプを自動で OFF)
↓ OK
\downarrow
Plate Setup
    ・Target List 遺伝子名を入力
         Type→内在性コントロールは REF、その他 Target Gene は TOI
         Dye→FAM
    ・Sample List サンプル名を入力(0.5、0.1、0.02、0.004、0.0008 にする)
         Type→全て STD に
  \rightarrow Update
  → Plate のセットアップ (Target と Sample の位置を設定)
\downarrow
Thermal Profile Setup
         Hold(初期変性)
```

95°C 10 sec <u>2 Step PCR : 40 cycles</u> 95°C 5 sec 60°C 20-30 sec

※ 変更したいときは変更したい部分をダブルクリックする

→2 step PCR のタブを選択し、下の Pattern のリストから Dissociation を選択

 \rightarrow Add Pattern.

 Dissociation

 95°C
 15sec

 60°C
 30sec

 95°C
 15sec

 \downarrow

装置の STANBY が点灯していることを確認し、「Start Run」 →File を保存したら反応が開始される

④解析

Filter→FAM をクリック Selector→Well を選択 Amplication plot: 増幅曲線(同サンプル間でばらつきが小さいことを確認。あまりにばらつきがひどい場合

はやり直す)

良い例

悪い例



Dissociation Curve:融解曲線(同遺伝子間でピークが同じであることを確認)

良い例



悪い例

Standard Curve:検量線。

- R2(相関係数;直線性を表す):0.98以上であることが望ましい。低濃度あるいは高濃度のポイントが 直線から外れる場合は、それらのポイントを除いて0.98以上になるようにする。
- Eff(増幅効率):95-105%の間に入っているかどうかを確認

良い例

Target	D/M	R2	Eff	Standard Curve
А	Default	0.999	102.7	Y = -3.260 * LOG(X) + 18.86
悪い例				
Target	D/M	R2	Eff	Standard Curve
В	Default	0.978	51.0	Y = -5.584 * LOG(X) + 21.49