Real-time PCR -III

SYBR Green kit を用いた Real-time PCR

2014.8 ver. 1

by M. Furuoka

① サンプルの調製

Takara Thermal Cycler Dice Real Time System Lite: 標準溶液量・・・25 µL

最低溶液量・・・20 µL

反応系【Duplicate(2点取り)またはTriplicate(3点どり)で測定する。】

SYBR Premix Ex Taq (*1)	12.5 µL
Primer Forward (10 μ M)	$1.0 \mu L$ $> 23.0 \mu L$
Primer Reverse (10 μ M)	1.0 µL
MQW (*2)	8.5 μL
<u>Template cDNA(10</u> 倍希釈)(*3)	2.0 µL
Total	25.0 μ L /well

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

*2: MQW は新しいものを使用する。

*3:希釈率は必要に応じて変更する。

サンプル調製例 (Primer 3 セット、Template 2 種類、Duplicate の場合)

・反応液:各 Primer セットにつき、<2 (temp) x 2 (well) + 1 = 5> サンプル分、調製する。

SYBR Premix Ex Taq	$12.5 \text{ x} 5 = 62.5 \ \mu\text{L}$
Primer Forward (10 μ M)	$1.0 \ge 5 = 5.0 \ \mu L$
Primer Reverse (10 μ M)	$1.0 \ge 5 = 5.0 \ \mu L$
MQW (*2)	$8.5 \text{ x} 5 = 42.5 \ \mu\text{L}$
Total	115.0 µL (23.0 µL x 5)

・Template (10 倍希釈の場合): <3 (primer) x 2 (well) + 1 = 7>サンプル分、調製する。

Template	;	1.4 µL
MQW		12.6 µL
	Total	14.0 _μ L (2.0 μL x 7)

③ サンプルアプライ

チューブまたはプレートに Template を 2 μL ずつアプライする。

 \downarrow

反応液を23 µL 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
画面左上の□ をクリック、または File → 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
Ţ
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 \rightarrow FAM
    ・Sample List サンプル名を入力
        Type \rightarrow UNKN
        Calibrator \rightarrow 相対的グラフで「1」と示すサンプルは ves、他は no
 \rightarrow Update
 → Plate のセットアップ (Target と Sample の位置を設定)
```

Thermal Profile Setup

<u>Hold (初期変性)</u> 95℃ 10 sec <u>2 Step PCR : 40 cycles</u> 95℃ 5 sec 60℃ 20-30 sec

※ 温度や反応時間は必要に応じて変更する。

※ 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 \rightarrow FAM \mathcal{E} \mathcal{P} \mathcal{P} \mathcal{P}

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)



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)



Relative Quantity Chart: 相対定量結果のグラフ。計算方法はΔΔCt method を選択。

Text Report: $\Delta\Delta$ Ct Rel.Qty(CP)にチェックを入れ、表として表示させる。 → 表上で右クリック → Export Data → Excel でデータを取り出す。

取り出した Excel データを PC 上で開き、ΔΔCt Rel.Qty の行をコピーする。

- → 別の行に値貼り付けすると数値が表示される。
- → グラフを作成するなどの解析を行う。
 - ※ ハロゲンランプは約1000時間で交換時期を迎える。

※ Plate setup および Thermal Profile Setup の Load Template で以前の設定を利用できる。

【参考】 ΔΔCt 法



[試料] コントロール試料 = control, 対象試料 = sample

[遺伝子] 目的の遺伝子 = GOI (Gene of Interest), リファレンス遺伝子 = REF (Reference Gene)