

RT² Profiler PCR Array プロトコールとトラブルシューティング

RT² Profiler PCR Array

RT² First Strand Kit

RT² SYBR[®] Green qPCR Mastermix

RT² SYBR Green Fluor qPCR Mastermix

RT² SYBR Green ROX[™] qPCR Mastermix

RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix

パスウェイ特異的遺伝子の発現を

リアルタイム RT-PCR を用いてプロファイリング



目次

プロトコール

RT ² First Strand Kit を用いた cDNA 合成	3
RT ² Profiler PCR Arrays Formats A、C、D、E、F、G を用いたリアルタイム PCR	5
RT ² Profiler PCR Arrays Format R を用いたリアルタイム PCR	14
RT ² Profiler PCR Arrays Format H を用いた場合の cDNA 合成とリアルタイム PCR	18
トラブルシューティング	22

プロトコール：RT² First Strand Kit を用いた cDNA 合成

最適な結果を得るために、また RT² Profiler PCR Array に入っている逆転写反応コントロールを検出するために、この RT² First Strand Kit を使用することが非常に重要です。Fluidigm™ BioMark real-time PCR system をご利用になる場合は、18 ページの cDNA 合成プロトコールならびにサンプル/プレート調製をご覧ください。

実験を始める前の重要事項

- 各サンプルの逆転写反応には同量のトータル RNA を使用してください。初めてキットをご使用になるユーザーは、96 ウェルプレートには 1 µg、Rotor-Disc™ 100 フォーマットには 0.8 µg、Format E および G 384 (4 x 96) option には 400 ng、Format E および G 384 HT option には 1 µg のトータル RNA を使用してください。100 ng 未満の RNA を使用すると偽陰性の割合が高くなります。100 ng 以下の RNA しか入手できない場合には、RT² PreAMP cDNA Synthesis Handbook を参照してください。
- DEPC 処理水は使用しないでください。高品質のヌクレアーゼフリー水をご利用ください。
- RT² First Strand Kit には Ambion 社の DNA-free キット試薬を使用できません。RNA サンプルを DNA-free キット試薬で処理した場合は、弊社テクニカルサポートにお問い合わせください。

操作手順

1. RT² First Strand Kit の試薬を解凍する。チューブをスピンドウン (10 ~ 15 秒) して、すべての液体をチューブの底に回収する。
2. 表 1 に従って、各 RNA サンプル用にゲノム DNA 除去用反応ミックスを調製する。ピペットで静かに吸排出を行ない混和してからスピンドウンする。

表 1. ゲノム DNA 除去用反応ミックス

成分	量
RNA*	25 ng ~ 5 µg
Buffer GE	2 µl
RNase フリー水	Variable
トータル容量	10 µl

* 初めてキットを使用する場合には、“実験を始める前の重要事項”で推奨されている RNA 量を使用する。

3. ゲノム DNA 除去用反応ミックスを 42°C で 5 分間インキュベートした後、すぐに氷上で 1 分以上インキュベートする。

4. 表 2 に従って逆転写反応ミックスを調製する。

表 2. 逆転写反応ミックス

成分	1 反応あたりの 容量	2 反応あたりの 容量	4 反応あたりの 容量
5x Buffer BC3	4 μ l	8 μ l	16 μ l
Control P2	1 μ l	2 μ l	4 μ l
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 μ l	4 μ l	8 μ l
RNase フリー水	3 μ l	6 μ l	12 μ l
トータル容量	10 μ l	20 μ l	40 μ l

5. 10 μ l のゲノム DNA 除去用反応ミックスが入った各チューブに 10 μ l の逆転写反応ミックスを添加する。ピペットで吸排出して静かに混和する。
6. 42°C で正確に 15 分間インキュベートする。その後 95°C で 5 分間のインキュベートを行ない、迅速に反応を停止する。
7. 91 μ l の RNase フリー水を各反応液に添加する。ピペットで数回吸排出して混和する。
8. 反応液を氷上で保冷し、リアルタイム PCR プロトコールに進む。

リアルタイム PCR を行なう前に反応液を保存する場合は、反応液を -20°C のフリーザーに入れてください。

RT² RNA QC PCR Array を用いて品質コントロール解析を行なう場合は、希釈したテンプレート cDNA から 6 μ l を分取し、RT² RNA QC PCR Array Handbook に従って操作してください。

プロトコール: RT² Profiler PCR Arrays Formats A、C、D、E、F、G を用いたリアルタイム PCR

本プロトコールは、RT² Profiler PCR Arrays と RT² SYBR Green Mastermixes を組み合わせたリアルタイム PCR について記述しています。RT² Profiler PCR Array で正確な結果を得るためには、RT² SYBR Green Mastermixes を使用することが重要です。RNA 品質や精製技術に確信が持てない場合は、このプロトコールを行なう前に、生物種あるいはサイクラーに特異的な RT² RNA QC PCR Arrays を用いて RNA 品質を確認してください。

RT² Profiler PCR Array Format H に関しては、18 ページを参照してください。

実験を始める前の重要事項

- RT² SYBR Green Mastermix および RT² Profiler PCR Array フォーマットがご利用のリアルタイムサイクラーに適していることを確認してください（英語版 Handbook 5 ページ参照）。RT² Profiler PCR Array のカタログ番号の最後の文字がフォーマットを示しています。適切でない RT² Profiler PCR Array フォーマットはリアルタイムサイクラーに適合せず、リアルタイムサイクラーに損傷を与えることがあります。
- RT² Profiler PCR Array のプラスチックプレートはカットしないでください。
- 正確で精度の高い測定を行なうために、マイクロピペッターが較正されていることをプロトコール開始前に確認してください。ピペティングの際に RT² Profiler PCR Array のウェルに気泡を入れないように注意してください。
- DEPC 処理水は使用しないでください。高品質のヌクレアーゼフリー水をご利用ください。
- Mastermix チューブ中に沈殿物が観察される場合は、42℃で1分間温めてから、簡単にボルテックスして溶解してください。必要に応じて繰り返します。

操作手順

1. **RT² SYBR Green Mastermix をスピンドウン (10 ~ 15 秒) して、すべての液体をチューブの底に回収する。**
注：RT² SYBR Green Mastermix に入っているホットスタート *Taq* DNA ポリメラーゼは熱活性化の後にのみ活性化されるので、反応液の調製は室温 (15 ~ 25℃) で行なえます。
2. 次ページの表 3 に記載されているように、使用する RT² Profiler PCR Array フォーマットに従って、5 ml チューブあるいは loading reservoir に PCR 反応ミックスを調製する。

表 3. PCR 反応ミックス

アレイフォーマット：	96 ウェル A、C、D、F	384 (4 x 96) option E、G	384 HT option E、G
2x RT ² SYBR Green Mastermix	1,350 µl	550 µl	2,000 µl
cDNA 合成反応液	102 µl	102 µl	102 µl
RNase フリー水	1,248 µl	448 µl	1,898 µl
トータル容量	2,700 µl	1,100 µl	4,000 µl

注：ここではピペッティングエラーを考慮して、300 µl (フォーマット A、C、D、F)、140 µl (フォーマット E、G:384 [4 x 96] option)、160 µl (フォーマット E、G:384 HT オプション) の溶液を過剰に調製しています。各ウェルに必要な量を確実に分注するために、できるだけ正確にピペッティングステップを行いません。

注：Custom RT² Profiler PCR Arrays に関しては、総反応数に必要な容量の 10% 増しになるように、PCR 反応ミックスを調製します。

注：残った 9 µl の cDNA 合成反応液は -20°C で保存し、品質コントロール解析が必要になった際に使用します。

3. 下に記載されているように、RT² Profiler PCR Array フォーマットに従って PCR 反応ミックスを RT² Profiler PCR Array に分注する。

注：ウェル間のクロスコンタミを回避するために、各ピペッティングステップの後、ピペットチップを取り変えてください。

注：このステップの自動化に装置を使用する場合は、弊社テクニカルサポートにご連絡ください。

Formats A、C、D、F (96 ウェル)

- 密封バッグから RT² Profiler PCR Array を慎重に取り出す。
- オプション：PCR 反応ミックスをチューブ中で調製した場合は、RT² PCR Array Loading Reservoir (cat. no. 338162) などの loading reservoir に移し替える。
- 8 チャンネルピペッター、あるいは 8 チップのみを装着した 12 チャンネルピペッターを用いて、25 µl の PCR 反応ミックスを RT² Profiler PCR Array の各ウェルに添加する。
- ステップ 4 に進む。

Formats E あるいは G 384 ウェル、(4 x 96) option

注：各 384 ウェルプレートには 96 アッセイが 4 回繰り返してアレイされているので、4 サンプルの解析に使用できます。各サンプルの反応は 1 ウェルおきの間隔で 1 枚のプレートにセットします (11 ページ、表 6 参照)。スタンダードのマルチチャンネルピペッターに一つ置きにチップをセットすることで、各サンプルを添加する際に行または列をスキップすることが可能です。図 6 を参考にして、各サンプルを正しいウェルセットにアプライしてください。

- 密封バッグから RT² Profiler PCR Array を慎重に取り出す。
- オプション：PCR 反応ミックスをチューブ中で調製した場合は、RT² PCR Array Loading Reservoir (cat. no. 338162) などの loading reservoir に移し替える。
- 8 チャンネルピペッターあるいは 8 チップのみを装着した 12 チャンネルピペッター、および 384EZLoad Covers (付属) を用いて、図 6 に従って RT² Profiler PCR Array の各ウェルに PCR 反応ミックスを添加する。
- プレートの上に 384EZLoad Cover 1 (白色) を置く。サンプル 1 用の 10 μ l の PCR 反応ミックスをオープンウェル (A、C、E、G、I、K、M、O 列の奇数番号のウェル) に添加する。384EZLoad Cover 1 を取り除き廃棄する。
- プレートの上に 384EZLoad Cover 2 (黄色) を置く。サンプル 2 用の 10 μ l の PCR 反応ミックスをオープンウェル (A、C、E、G、I、K、M、O 列の偶数番号のウェル) に添加する。384EZLoad Cover 2 を取り除き廃棄する。
- プレートの上に 384EZLoad Cover 3 (黒色) を置く。サンプル 3 用の 10 μ l の PCR 反応ミックスをオープンウェル (B、D、F、H、J、L、N、P 列の奇数番号のウェル) に添加する。384EZLoad Cover 3 を取り除き廃棄する。
- プレートの上に 384EZLoad Cover 4 (赤色) を置く。サンプル 4 用の 10 μ l の PCR 反応ミックスをオープンウェル (B、D、F、H、J、L、N、P 列の偶数番号のウェル) に添加する。384EZLoad Cover 4 を取り除き廃棄する。

サンプル 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	A
B	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	B
C	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	C
D	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	D
E	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	E
F	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	F
G	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	G
H	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	H
I	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	I
J	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	J
K	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	K
L	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	L
M	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	M
N	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	N
O	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	O
P	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		

サンプル 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	A
B	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	B
C	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	C
D	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	D
E	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	E
F	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	F
G	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	G
H	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	H
I	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	I
J	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	J
K	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	K
L	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	L
M	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	M
N	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	N
O	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	O
P	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		

サンプル 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	A
B	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	B
C	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	C
D	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	D
E	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	E
F	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	F
G	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	G
H	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	H
I	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	I
J	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	J
K	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	K
L	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	L
M	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	M
N	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	N
O	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	O
P	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	5	4	3	4	3	4	3	4	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		

サンプル 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
B	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
D	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
F	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
H	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
J	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
L	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
N	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
P	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

図 6. RT² Profiler PCR Arrays Formats E あるいは G 384 (4 x 96) option へのアプライ

各サンプル用 PCR 反応ミックス 10 µl を、図に表記されているように同じ番号をもつ千鳥配置のウェルに添加する。

- ステップ 4 に進む。

Formats E あるいは G 384 HT option

- 密封バッグから RT² Profiler PCR Array を慎重に取り出す。
- オプション：PCR 反応ミックスをチューブ中で調製した場合は、RT² PCR Array Loading Reservoir (cat. no. 338162) などの loading reservoir に移し替える。
- 8 チャンネルピペッターあるいは 8 チップのみを装着した 12 チャンネルピペッターを用いて、10 µl の PCR 反応ミックスを RT² Profiler PCR Array の各ウェルに添加する。
- ステップ 4 に進む。

Custom RT² Profiler PCR Arrays

- 密封バッグから RT² Profiler PCR Array を慎重に取り出す。
- オプション：PCR 反応ミックスをチューブ中で調製した場合は、RT² PCR Array Loading Reservoir (cat. no. 338162) などの loading reservoir に移し替える。
- RT² Profiler PCR Array の各ウェルに PCR 反応ミックスを次の量で添加する：96 ウェル Custom RT² Profiler PCR Arrays には 25 µl、384 ウェル Custom RT² Profiler PCR Arrays には 10 µl。
- ステップ 4 に進む。

4. **Optical Thin-Wall 8-Cap Strips (Formats A および D) あるいは Optical Adhesive Film (Formats C、E、F、G) で RT² Profiler PCR Array を慎重にしっかりと密封する。**

重要： Bio-Rad[®] あるいは Eppendorf[®] のリアルタイム PCR 装置のユーザーは、リアルタイム PCR 装置が、RT² Profiler PCR Array プレートと、透明で平らな光学キャップを使用するように較正されたことを、ランを開始する前に確認します。

5. **室温 (15 ~ 25°C)、1,000 g で 1 分間遠心操作して気泡を取り除く。下方からプレートを視覚的に点検して、気泡がウェルに存在していないことを確認する。**
注：ウェル中に気泡が存在すると、結果が悪影響を受けます。

6. **PCR サイクリングプログラムのセット中は、RT² Profiler PCR Array を氷上で保冷する。**

注：必要に応じて、PCR 反応ミックスの入った RT² Profiler PCR Array をアルミホイルで包んで -20°C で最長 1 週間保存できます。

7. **使用するリアルタイムサイクラーに従って表 4、5、6 のいずれかを用いてリアルタイムサイクラーをプログラムする。サイクラーのソフトウェアによりプロンプトが表示された場合は、“Absolute Quantitation” を選択して開始する。**

注：装置のセットアップに関しては弊社 Instrument-Specific Setup Instructions および Protocol Files を www.SABiosciences.com/pcrarrayprotocolfiles.php でご覧ください。

表 4. Applied Biosystems、Bio-Rad[†]、Stratagene、Eppendorf[‡] サイクラーのサイクリング条件 *

サイクル	時間	温度	コメント
1	10 分	95°C	ホットスタート <i>Taq</i> DNA ポリメラーゼはこの加熱ステップにより活性化。
40	15 秒 1 分	95°C 60°C	蛍光データの収集が行なわれる。

* 次のサイクラーに推奨：Applied Biosystems[®] models 5700、7000、7300、7500、7700、7900HT、StepOnePlus[™]、ViiA[®] 7；Bio-Rad models iCycler、iQ5、MyiQ、MyiQ2、CFX96、CFX384；Stratagene[®] models Mx3000P、Mx3005P、Mx4000P；Eppendorf Mastercycler[®] ep realplex models 2、2S、4、4S

[†] Bio-Rad models CFX96 および CFX384：ramp rate を 1°C/秒に調節する。

[‡] Eppendorf Mastercycler ep realplex models 2、2S、4、4S：Silver Thermoblock の ramp rate を 26 %、Aluminum Thermoblock の ramp rate を 35% に調節する。装置のセットアップに関する詳細については www.SABiosciences.com/pcrarrayprotocolfiles.php を参照する。

表 5. Roche® LightCycler® 480* のサイクリング条件

サイクル	時間	温度	コメント
1	10 分	95°C	ホットスタート <i>Taq</i> DNA ポリメラーゼはこの加熱ステップにより活性化。
45	15 秒 1 分	95°C 60°C	蛍光データの収集が行なわれる。

* Roche LightCycler 480 に推奨。Roche LightCycler 480 を使用する場合、ramp rate を 1°C/秒に調節する。Melt Curve Acquisition のセッティングに必要な変更に関しては www.SABiosciences.com/pcrarrayprotocolsfiles.php の “Instrument Setup Guide” を参照する。

表 6. Bio-Rad および Takara サイ클ラー、その他すべてのサイ클ラーでのサイクリング条件 †

サイクル	時間	温度	コメント
1	10 分	95°C	ホットスタート <i>Taq</i> DNA ポリメラーゼはこの加熱ステップにより活性化。
40	15 秒 30 ~ 40 秒	95°C 55°C	蛍光データの収集が行なわれる。サイ클ラーにより蛍光シグナルの検出に要する時間は異なる。サイ클ラーに応じて、適切な時間をアニーリングステップ (55°C) で選ぶ。
	30 秒	72°C	

† 次のサイ클ラーに推奨：Bio-Rad/MJ Research models Chromo4、DNA Engine Opticon、DNA Engine Opticon 2；Takara TP-800；その他すべてのサイ클ラー

8. **RT² Profiler PCR Array** をリアルタイムサイ클ラーにセットする。サイ클ラーのユーザーマニュアルにより推奨されている場合は、**Optical Adhesive Film** で密封した **RT² Profiler PCR Array** に圧縮パッドを使用する（フォーマット C、E、F、G）。ランを開始する。
9. 次のステップに記載されているようにリアルタイムサイ클ラーのソフトウェアを使用して **C_T (threshold cycle)** 値を計算する。

注：Roche LightCycler 480 を使用する際は、second derivate max 法を使用（この場合 C_T 値の計算不要）、あるいは “Fit Points” を使用（この場合ステップ 11 に記載されているようにマニュアルで C_T 値を決める）する 2 種類のデータ解析オプションがあります。

10. サイ클ーに **adaptive baseline function** が搭載されている場合には、自動化ベースラインオプションを選択してベースラインを決める。サイクラーに **adaptive baseline function** が搭載されていない場合には、マニュアルでベースラインを決める。ベースラインをマニュアルで決めるためには、増幅プロットの直線表示を使用して増幅の立ち上がりを決める。サイクル数が 2 と、最初の立ち上がりのサイクル数より 2 サイクル少ないサイクル数の間でサイクラーを設定するが、15 サイクルを超えないようにする。増幅の最初の立ち上がりは通常 14 ~ 18 サイクルで観察される。

11. 増幅プロットの対数表示を使用して閾値を決める。閾値はバックグラウンドシグナルより上にあるが増幅プロットの直線領域の 1/3 から 1/2 にあるものを選ぶ。

注：同一の解析において、閾値がすべての RT² Profiler PCR Array で同じ値であることを確認してください。閾値の絶対値よりも、すべてのアレイでこの値が一定であることが重要です。RNA サンプルの品質が十分に高く、サイクリングプログラムが適切に実行され、閾値を正確に定義していれば、C_T^{PC} (Positive PCR Control の C_T) 値は全アレイあるいはサンプルで 20 ± 2 になります。

12. 空白の Excel® スプレッドシートにすべてのウェルの C_T 値をエクスポートすると、このデータを **SABiosciences PCR Array Data Analysis Template Excel** やウェブベースのソフトウェアで使用できる。

注：Excel ベースの PCR Array Data Analysis Templates は 96 ウェル、384 ウェル、カスタムフォーマットが www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php で入手可能です。ウェブベースの PCR Array Data Analysis Software は www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php で利用可能です。

13. 推奨：PCR の特異性を検証するために解離（融解）曲線解析を行なう。融解曲線プログラムを実行し、リアルタイムサイクラー用ソフトウェアを使用して各ウェルの一次導関数解離曲線を作製する。80°C を超える温度でシングルピークが各反応で観察されなければならない。

注：ご利用の装置にデフォルトの融解曲線プログラムがない場合は、次のプログラムをご利用ください：95°C、1 分；65°C、2 分 (optics off)；2°C/分で 65 ~ 95°C (optics on)。

注：サイクラーに特異的な融解曲線解析の設定は、ご利用のサイクラーの Instrument Setup Guide を www.SABiosciences.com/pcrarrayprotocolfiles.php でご確認ください。

注：プレートはアルミホイルで包んで -20°C で保存し、後日、融解曲線解析を行なうことが可能です。融解曲線解析をすぐに行なう場合は、室温 (15 ~ 25°C) でプレートを温め、リアルタイムサイクラーにセットし、融解曲線解析プログラムを実行します。

注：ウェルのいずれかから蒸発した形跡がないか、実行後にプレートを視覚的に点検してください。蒸発が観察される場合、これはデータ分析の結果に影響を与える可能性があるため、どのウェルが影響を受けているかを記録してください。

注：既に処理済みの RT² Profiler PCR Array は開かないでください。RT² Profiler PCR Arrays から Optical Thin-Wall 8-Cap Strips あるいは Optical Adhesive Film を取り外すと、PCR 産物が空气中に放出され、次回のリアルタイム PCR 実験でコンタミして実験結果に悪影響を及ぼすことがあります。

プロトコール：RT² Profiler PCR Arrays Format R を用いたリアルタイム PCR

実験を始める前の重要事項

- Rotor-Gene™サイクラーで RT² Profiler PCR Array Format R と RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix を使用していることを確認します。RT² Profiler PCR Array のカタログ番号の最後の文字がフォーマットを示します。
- 正確で精度の高い測定を行なうために、マイクロピペッターが較正されていることをプロトコール開始前に確認してください。ピペッティングの際に RT² Profiler PCR Array のウェルに気泡を入れないように注意してください。
- DEPC 処理水は**使用しないでください**。高品質のヌクレアーゼフリー水をご利用ください。
- Mastermix チューブ中に沈殿物が観察される場合は、42℃で 1 分間温めてから、簡単にボルテックスして溶解してください。必要に応じて繰り返してください。

操作手順

1. RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix、水、cDNA 合成反応液をスピンドウン（10 ~ 15 秒）して、すべての液体をチューブの底に回収する。

注：RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix に入っているホットスタート Taq DNA ポリメラーゼは熱活性化の後にのみ活性化されるので、反応液の調製は室温（15 ~ 25℃）で行なえます。

2. 表 7 に記載されているように、5 ml チューブに PCR 反応ミックスを調製する。

表 7. PCR 反応ミックス

アレイフォーマット：	Rotor-Disc 100
2x RT ² SYBR Green ROX FAST Mastermix	1,150 µl
cDNA 合成反応液	102 µl
RNase フリー水	1,048 µl
トータル容量	2,300 µl

注：ここではピペッティングの誤差を考慮して、300 µl 過剰に溶液を計算しています。各ウェルに必要な量を確実に分注するために、できるだけ正確にピペッティングステップを行ないます。

注：残った 9 µl の cDNA 合成反応液は -20℃ で保存し、RT² RNA QC PCR Array を用いた品質コントロール解析が必要になった際に使用します。

3. 密封バッグから **RT² Profiler PCR Array** を慎重に取り出す。位置 **A1** にあるタブとチューブのガイド穴を使って、アレイを **Rotor-Disc 100 Loading Block** にスライドする。

4. **20 µl** の PCR 反応ミックスを、**RT² Profiler PCR Array** の各アレイに添加する。ステップ 5 に進む。

注：ウェル間のクロスコンタミを回避するために、各ピペッティングステップの後にピペットチップを取り変えてください。

注：PCR 反応ミックスの分注はマニュアル、または QIAgility™ (www.qiagen.com/goto/QIAgility) を用いて自動で行なえます。

注：97 ~ 100 番目のウェルにはアッセイが入っていませんが、RT² Profiler PCR Array の最適なバランスのために PCR 反応ミックスを必ず添加してください。

5. **Rotor-Disc Heat Sealer** を用いて、**Rotor-Disc Heat-Sealing Film** で **RT² Profiler PCR Array** を慎重にシールする。

詳細は Rotor-Gene Q User Manual (日本語版あり) をご覧ください。

注：必要に応じて、PCR 反応ミックスの入った RT² Profiler PCR Array はアルミホイルで包んで -20°C で最長 1 週間保存できます。

6. 表 8 に従ってリアルタイムサイクラーをプログラムする。

注：装置のセットアップに関しては、弊社 Instrument-Specific Setup Instructions および Protocol Files を、www.SABiosciences.com/pcrarrayprotocolfiles.php でご覧いただけます。

表 8. Rotor-Gene サイクラーのサイクリング条件

サイクル	時間	温度	コメント
1	10 分	95°C	ホットスタート <i>Taq</i> DNA ポリメラーゼはこの加熱ステップにより活性化。
40	15 秒 30 秒	95°C 60°C	蛍光データの収集が行なわれる。

7. **RT² Profiler PCR Array** を **Rotor-Disc 100 Rotor** に挿入し、**Rotor-Disc 100 Locking Ring** でしっかり閉める。ランを開始する。

詳細は Rotor-Gene Q User Manual をご覧ください。

- リアルタイムサイクラーのソフトウェアを使用して C_T (threshold cycle) 値を計算する。ベースラインを定義するために、“Dynamic Tube” (デフォルトの解析設定) を選んで、増幅が始まる直前に各ウェルの平均バックグラウンドが決定されていることを確認する。

オプション：“Ignore First” を選択します。ラン開始後のサイクルからの蛍光シグナルは、前回のランが影響している場合があります。従って初期サイクルを無視すると良い結果が得られます。最大 5 サイクルを無視できます。

オプション：“Noise Slope Correction” を選択します。このオプションを選択すると、傾斜が著しいベースライン (初期サイクル) をもつデータを改善することができます。“Noise Slope Correction” は、生データのバックグラウンドがテイクオフポイント (C_T) 前で上昇あるいは下降しているデータを改善することができます。

注：同一の解析において、設定がすべての RT² Profiler PCR Array で同じであることを確認してください。

- 増幅プロットの対数表示を使用して閾値を決める。バックグラウンドシグナルより上にある閾値を選ぶ。閾値は増幅プロットの直線範囲の半分より低い値になるように設定する。

注：同一の解析において、閾値がすべての RT² Profiler PCR Array で同じであることを確認してください。閾値の絶対値よりも、すべてのアレイでこの値が一定であることが重要です。RNA サンプルの品質が十分に高く、サイクリングプログラムが適切に実行され、閾値を正確に定義していれば、 C_T^{PPC} 値は全アレイあるいはサンプルで 14 ± 2 になります。

- 空白の Excel スプレッドシートにすべてのウェルの C_T 値をエクスポートすると、このデータを SABiosciences PCR Array Data Analysis Template Excel やウェブベースのソフトウェアで使用できる。

注：Excel ベースの PCR Array Data Analysis Templates は RT² Profiler PCR Array Rotor-Gene が www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php で入手可能です。ウェブベースの PCR Array Data Analysis Software は www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php で利用可能です。

- 推奨：PCR の特異性を検証するために解離 (融解) 曲線解析を行なう。融解曲線プログラムを実行し、リアルタイムサイクラー用ソフトウェアを使用して各ウェルの一次導関数解離曲線を作製する。シングルピークが各反応で観察されなければならない。

注：融解曲線解析は Rotor-Gene Q PCR プログラムの作製中に追加することができます。

注：Rotor-Gene Q 融解曲線解析の設定は、Instrument Setup Guide を www.SABiosciences.com/pcrarrayprotocolfiles.php でご確認ください。

注：Rotor-Disc はアルミホイルで包んで -20°C で保存し、後日、融解曲線解析を行なえます。融解曲線解析をすぐに行なう場合は、室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) でプレートを温め、リアルタイムサイクラーにセットし、融解曲線解析プログラムを実行します。

注：ウェルのいずれかから蒸発した形跡がないか、実行後に Rotor-Disc を視覚的に点検してください。蒸発が観察されている場合、これはデータ分析の結果に影響を与える可能性があるため、どのウェルが影響を受けているかを記録してください。

注：既に処理済みの RT² Profiler PCR Array は開かないでください。RT² Profiler PCR Arrays からフィルムを取り外すと、PCR 産物が空气中に放出され、将来のリアルタイム PCR 実験でコンタミして実験結果に悪影響を及ぼすことがあります。

プロトコール：RT² Profiler PCR Arrays Format H を用いた場合の cDNA 合成とリアルタイム PCR

本プロトコールは、Fluidigm Biomark real-time PCR system のユーザー用です。本プロトコールでは、RT² First Strand Kit (96 x 96) を用いて cDNA 合成を行いません。次に、RT² PreAMP Pathway Primer Mix Format H を用いた事前増幅を行いません。最後に RT² Profiler PCR Array Format H と TaqMan® Gene Expression Master Mix を組み合わせてリアルタイム PCR を行いません。

操作手順

RT² First Strand Kit (96 x 96) を用いた cDNA 合成

1. **Buffer GE2** および **BC5 Reverse Transcriptase Mix** を氷上で解凍する。チューブをスピンドウン (10 ~ 15 秒) して、すべての液体をチューブの底に回収する。
2. 表 9 に従って、**96 ウェルプレート** の 1 ウェル中にある各 RNA サンプル用に **ゲノム DNA 除去用反応ミックス** を調製する。

表 9. ゲノム DNA 除去用反応ミックス

成分	ウェルあたりの容量
RNA	25 ng ~ 5 µg*
Buffer GE2	3 µl
RNase フリー水	Variable
トータル容量	7 µl

* 初めて実験を行なう場合は 1 µg の RNA を推奨。

3. **ゲノム DNA 除去用反応ミックス** を 37°C で 5 分間インキュベートした後、即座に氷上で 1 分以上インキュベートする。
4. **3 µl の BC5 Reverse Transcriptase Mix** を各ウェルに加える。
5. **リアルタイムサイクラー** を 1 サイクルあたり次のようにプログラムする：
42°C で 15 分、95°C で 5 分、4°C 保存。サイクラーに **96 ウェルプレート** をセットし、プログラムを開始する。
これは逆転写反応ステップです。
6. 反応液を氷上で保冷し、事前増幅プロトコールに進む。
反応液を保存する場合には、-20°C のフリーザーに入れてください。

RT² PreAMP Pathway Primer Mix Format H を用いた事前増幅

7. RT² PreAMP Pathway Primer Mix および RT² PreAMP PCR Mastermix を氷上で解凍する。チューブをスピンドウン (10 ~ 15 秒) して、すべての液体をチューブの底に回収する。
8. 表 10 に従って specific target amplification mix を調製する。

表 10. specific target amplification mix

成分	1 サンプルあたりの 容量	96 ウェルあたりの 容量 *
RT ² PreAMP Pathway Primer Mix	3 μ l	331.2 μ l
RT ² PreAMP PCR Mastermix	5 μ l	552 μ l
トータル容量	8 μ l	883.2 μ l

* ピペティングの誤差を考慮して、15%増して計算した容量。

9. 8 μ l の specific target amplification mix を空の 96 ウェルプレートの各ウェルにピペットで入れる。
10. 次にステップ 6 の 96 ウェルプレート中の各ウェルから 2 μ l の一本鎖 cDNA を、ステップ 9 の 96 ウェルプレート中の各ウェルに加える。
残った一本鎖 cDNA は将来の実験用に保存可能です。
11. ボルテックスにより混和後、スピンドウンする。
12. 表 11 に従ってリアルタイムサイクラーをプログラムする。リアルタイムサイクラーに 96 ウェルプレートをセットし、プログラムを開始する。

表 11. 事前増幅用サイクリング条件

サイクル	時間	温度	コメント
1	10 分	95°C	ホットスタート <i>Taq</i> DNA ポリメラーゼはこの加熱ステップにより活性化。
14	15 秒 2 分	95°C 60°C	
Hold		4°C	

13. サイクリングが終了したらプレートをリアルタイムサイクラーから取り出して氷上で保冷する。

14. 1 μl の Side Reaction Reducer を各ウェルに添加する。ピペッティングにより静かに混和する。
15. 37°C で 15 分間インキュベートしてから、95°C で 5 分間の熱不活化を行なう。
16. 44 μl の low EDTA-TE buffer (0.1 mM EDTA) を各ウェルに添加する。
これは 5 倍希釈液です (11 μl の preamplification mix + 44 μl のバッファー) が、必要に応じて希釈率は至適化することができます。
17. リアルタイム PCR を開始する前に氷上で保冷するか、-20°C で保存する。

Sample mix 調製

18. 表 12 に従って sample mix を調製する。

表 12. Sample mix

成分	1 反応あたりの容量	BioMark 96 x 96 Chip 一枚あたりの容量 *
2x TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, cat. no. 4369016)	3 μl	330 μl
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm, cat. no. 100-0388)	0.3 μl	33 μl
20x EvaGreen dye (Biotium, cat. no. 31000)	0.3 μl	33 μl
1x Low EDTA-TE buffer (0.1 mM EDTA)	0.9 μl	99 μl
トータル容量	4.5 μl	495 μl

* ピペッティングの誤差を考慮して、14%増して溶液を計算。

19. 60 μl の sample mix を 8-strip PCR tube の各チューブにピペットで入れる。
20. 8 チャンネルピペッターを用いて、4.5 μl の sample mix を空の 96 ウェルプレートの各ウェルに移す。
21. ステップ 17 から事前増幅済み各サンプル 1.5 μl を、sample mix が入った 96 ウェルプレートの各ウェルに添加する。
注：8 チャンネルピペッターを用いて、事前増幅済みサンプルを移すことができます。
22. プレートをプレートシールでカバーする。ボルテックスで混和してスピンドウンする。
23. プレートに “sample” と記入する。

Assay mix 調製

24. RT² Profiler PCR Array Format H を -20°C から取り出す。室温 (15 ~ 25°C) で 10 分間解凍する。プレートホルダーをボルテックス後スピンドウンして、ウェルの底に溶液を回収する。
25. RT² Profiler PCR Array のキャップに印をつけて、元の順番でセットできるようにする。キャップを除去する。
26. 45 µl の 2x Assay Loading Reagent (Fluidigm により販売) を 8-strip PCR tube の各チューブにピペットで入れる。
27. 8-strip tube から 3 µl の 2x Assay Loading Reagent を空の 96 ウェルプレートの各ウェルに入れる。
このステップは 8 チャンネルピペッターで行なえます。
28. RT² Profiler PCR Array の各ウェルから 3 µl を、ステップ 27 の 96 ウェルプレートの対応するウェルに入れる。
29. プレートをプレートシールで覆う。ボルテックスで混和して、スピンドウンする。
30. このプレートに “assay” と記入する。

サンプルおよびアッセイを BioMark Chip にアプライ

31. BioMark Chip の裏面から青い保護フィルムを剥がす。BioMark Chip を IFC Controller にセットする。
32. スタンダードの Fluidigm プロトコルを用いて 96 x 96 BioMark Chip を処理する。
詳細は Fluidigm 96.96 Real-Time PCR Workflow Reference Guide (Fluidigm cat. no. 68000088) を参照してください。
33. 8 チャンネルピペッターを用いて、“sample” プレートの各ウェルから 5 µl を、BioMark Chip の適切なサンプル注入口に入れる。
34. 8 チャンネルピペッターを用いて、“assay” プレートの各ウェルから 5 µl を、BioMark Chip の適切な assay 注入口に入れる。
35. IFC Controller HX Software を用いて、Load Mix (138x) Script for 96.96 IFCs を実行する。
このステップは 90 分かかります。
36. BioMark Chip を IFC Controller から取り出す。
37. BioMark Chip 表面から 塵粒子を取り除く。
38. BioMark Chip を開始しデータを回収するためには、BioMark Advanced Development Protocol (ADP) 15 のソフトウェアのセットアップに関する詳細な説明を参照にする。
ADP 15 は techsupport@fluidigm.com にお問い合わせください。

トラブルシューティング

コメント

ゲノム DNA のコンタミが存在する

- a) DNase 分解が行なわれていない RNeasy® Mini Kit を用いた RNA 精製の際は、カラム上での DNase 分解ステップを行なうことを推奨する。
- b) RT² First Strand Kit を使用していない cDNA 合成には RT² First Strand Kit を必ず使用することを推奨。本キットにはゲノム DNA 除去ステップが入っている。
- c) 試薬、チップ、チューブのコンタミ 英語版 Handbook 22 ページの “Preparing a workspace free of DNA contamination” を参照。RT² RNA QC PCR Array を使用する際は、NTC (no template control) が実験セットアップでの DNA コンタミレベルを示す。
- d) 除去困難なゲノム DNA 遺伝子発現の Fold-changes を得ることができる。しかし、“-RT” コントロールを含む厳密なリアルタイム PCR 解析を別途行なうことにより個々の遺伝子の結果を検証すること非常に重要である。

逆転写反応が効率的でない

RNA 品質が低い

RNA サンプルの A_{260}/A_{280} および A_{260}/A_{230} の吸光度比をチェックする。RNase-free Tris pH 8.0 で希釈して分光光度計で測定すること。必要に応じて、RNeasy Mini Kit などのスピнкаラム法を用いてもう一度 RNA を精製する。

PCR 増幅効率が低い

- a) リアルタイムサイクラーの感度
サイクラーの感度
- リアルタイムサイクラーの感度のレベルがばらつく。ポジティブ PCR コントロール (PPC) において、平均 C_T^{PPC} 値 20 ± 2 を得ることが難しい場合は、RT² Profiler PCR Arrays 間での差が 2 サイクルを超えない限りは、観測された平均 C_T^{PPC} 値を許容可能である。
- b) サイクリング
プログラムが不適切
- 95°C での最初の熱活性化ステップで、デフォルトの短時間から 10 分間に延長したことを確認する。その他のサイクルパラメータすべてを、プロトコールで推奨されている方法に従って正確にインプットしたことも確認する。
- c) RNA 品質が低い
- RNA サンプルの A_{260}/A_{280} および A_{260}/A_{230} 比をチェックする。RNase-free Tris pH 8.0 で希釈して分光光度計で測定すること。必要に応じて、RNeasy Mini Kit などのスピнкаラム法を用いてもう一度 RNA を精製する。

Trademarks: QIAGEN®, QIAgility™, RNeasy®, Rotor-Gene™, Rotor-Disc™ (QIAGEN Group); Fluidigm™ (Fluidigm Corp.); Roche®, LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); Applied Biosystems®, ROX™, StepOnePlus™, ViiA® (Applied Biosystems or its subsidiaries); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); Stratagene® (Stratagene); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Excel® (Microsoft, Inc.); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.co.jp の "Trademarks and Disclaimers" をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.co.jp から入手可能です。

© 2011 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

