

逆転写反応

1 準備と注意点

実験中は常に手袋をし、白衣を着ます。

今回は SampleA（野生型細胞）と SampleB（薬剤処理細胞）について遺伝子発現比較を行います。

ACTB 遺伝子を内部標準遺伝子として用い、BiP 遺伝子の発現量を比較します。

0.2mL PCR チューブ 2 本の側面または蓋の周囲に区別のための印をしておきます。

使ったチップはすぐに捨てて、常に新しいものを使用します（コンタミの防止）。

2 反応溶液の作成

逆転写反応試薬

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を使います。

この試薬では 1pg から 1000ng までの Total RNA からの逆転写が可能です。

本実習では 100ng を鋳型として使います。

Total RNA を印をつけた 0.2mL PCR チューブに加え蓋をします。

(Sample ごとにチューブを分けます。計 2 本。)

Total RNA	8 μ L (100ng)
-----------	-------------------

65°Cで 5 分間、熱変性を行います。サーマルサイクラーを使用します。

氷上で急冷します。

(サーマルサイクラーでの冷却ではなく、65°C反応中にそのまま氷上に移します。)

5x Master Mix を 2 μ L 加えピペッティングでよく混合し (なるべく泡立てない) 、蓋をしてスピンドウンします。

必要に応じて no-RT コントロールも同様に行います。

(本実習ではゲノム研究分野スタッフが代わりに行います。)

サーマルサイクラーにセットし以下の温度変化で反応します。

37°C 15min. (逆転写反応)

50°C 5min. (逆転写反応)

98°C 5min. (酵素失活反応)

4°C hold

4°Cまたは-20°Cで保存します。今回は氷上に置きます。

1st PCR 反応に進みます。