

条件検討その2

検量線範囲の設定 (2nd PCR)

0 注意点

分注には必ず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 μ L を分取するときは P20 のチップを使用する。

ピペッター本体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。

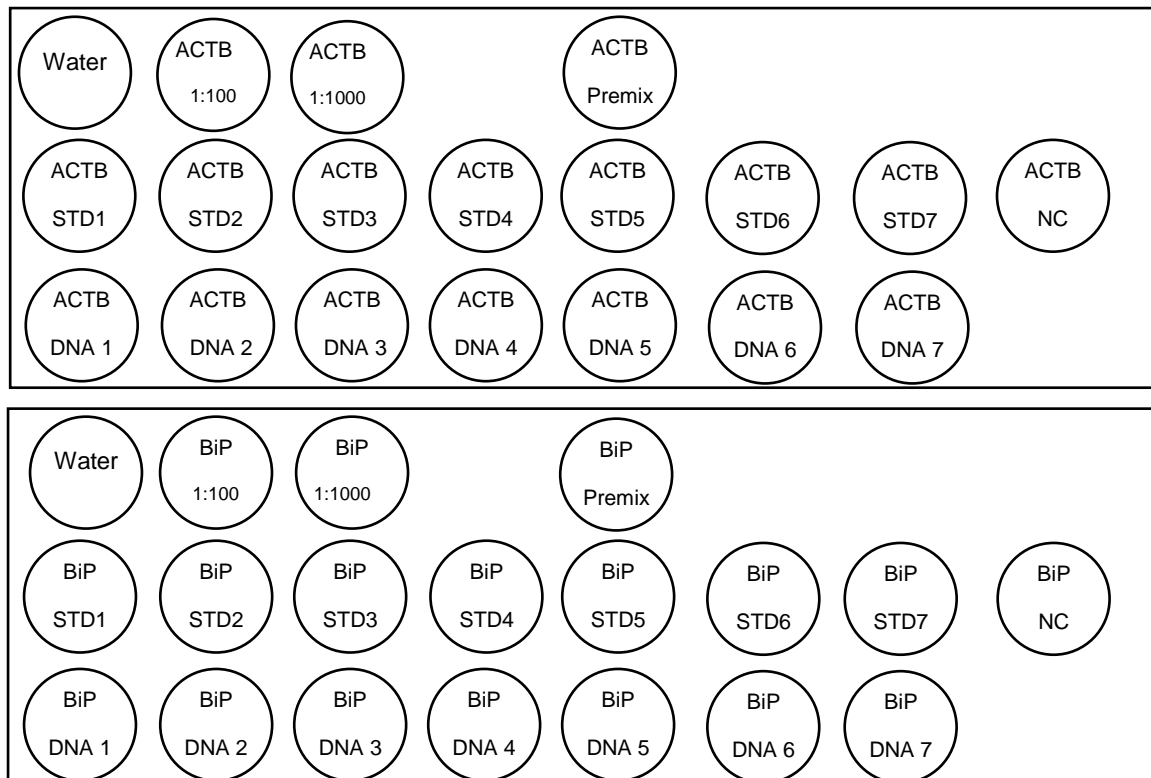
濃い DNA 溶液がついたチップは吐出後すぐ捨てる。

濃い DNA 溶液を触った後は手袋ごと手を洗うか、手袋を変えます。

1 準備

本実習ではここから 2 グループで一緒に実験します。各グループは BiP または ACTB を受け持ちます。

まず使用する 1.5mL チューブへのラベルを先に済ませます。下図参照。



各グループどちらか一方のみ行います。

“Water”とラベルした 1.5mL チューブにストックの水を 1mL を分取しておく。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 “~DNA7” 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 μ L ずつ入れておく。

1:100 とラベルしたチューブに水を 198 μ 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 μ L 入れます。

2 PREMIX 溶液の作成

以下の試薬を 1.5mL チューブに混ぜます。必要量+ α (1本分) を作ります。

今回は 17 本分の反応液を作ります。

ddH ₂ O	136	
2x Master Mix	170	
50x ROX	6.8	
<u>10μM Primer mix.</u>	<u>10.2</u>	(BiP or ACTB)
Total	323	(μ L)

ボルテックスで混ぜてスピンドウンする。

38 μ L ずつ“~STD”および“~NC”とラベルした 1.5mL チューブに分注する。（NC に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 μ L 加えてボルテックス、スピンする。

上記 Premix の入った 1.5mL チューブ 8 本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 “~DNA7” に水を 45 μ L ずついれておく。

1:100 とラベルしたチューブに水を 198 μ L いれておく。1:1000 とラベルしたチューブには水を 90 μ 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 μ 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 μ 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 μ L 入り) に 1:100 の溶液を 10 μ 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 μ 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 μ L 加えて同様に混ぜる。

以下 DNA7 まで繰り返す。

4 プレミックスとスタンダード DNA の混合

必ず一番薄い DNA7 から混合を始める。

3 で作成した DNA7 のチューブから 2 μ L を STD7 とラベルした Premix 溶液へ加える。ボルトックスで混合しスピンドウンする。以下これを反応溶液と呼ぶ。

STD6 から STD1 までを同様に処理する。

手袋をしたまま手を洗う。もしくは手袋を変える。

5 PCR 用チューブへの分注

8 連 PCR チューブ 2 つをチューブ立てに置く。

このときに横向きではなく縦向きに置く。一番奥(上)のチューブに NC/ネガティブコントロール(水)のサンプルが入り、一番手前(下)に STD1 が入ることになるので、必要ならばマーカーなどで方向の区別ができるようにしておく。

NC (ネガティブコントロール) の反応溶液を 20 μ L ずつ、2 つの 8 連チューブの一番端(奥)のチューブに入れる。(別紙 1 参照)

次に STD7 の反応溶液を奥から 2 番目のチューブに 20 μ 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 STD6 から STD1 までの反応溶液を 8 連チューブに 20 μ L ずつ分注する。

8 連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。