

PrimePCR Plate Assay 簡易プロトコール

*詳細は英文プロトコール([LIT10026370](#))をご確認ください。

PrimePCR Plate Assay では、Bio-Rad の試薬、機器をご使用いただくことを推奨しております。ご使用に際しては、以下のプロトコールに準じてお使いください。他社の試薬、機器をご利用する場合には、反応液量、反応温度等を検討してご使用ください。

- ① RNA の精製
- ② cDNA 合成 (逆転写反応)
- ③ リアルタイム PCR 反応
- ④ 解析

① RNA の精製

- 1) RNA の精製を行います。Aurum Total RNA ミニキット (カタログ番号 7326820) をお使いいただくことで、純度の高い RNA が精製可能です。他社キット等のご利用も可能です。
- 2) RNA の濃度、純度の検定を行います。
 吸光度から、RNA 濃度を算出します。 $A_{260} \times 40 = \text{RNA (ng/}\mu\text{l)}$
 吸光度の比から、純度を検定します。
 $A_{260}/A_{280} > 2.0$ RNA 純度が高い (DNA の混入確認)
 $A_{260}/A_{230} \sim 2.0$ RNA 純度が高い (タンパク質の混入確認)
 純度が低い場合には、再度精製するか、DNase 処理などをご検討ください。

② cDNA 合成 (逆転写反応)

- 1) 表 1 に従って反応液を調製します。ここでは、リアルタイム PCR 用の cDNA 合成に適している RNaseH 活性を持つ iScript Advanced cDNA synthesis Kit (カタログ番号 1725037) を利用した例を示しています。

表 1 cDNA 反応

Component	Volume
①で精製した RNA (100 fg to 7.5 μg)	variable
5x iScript Advanced cDNA Synthesis Kit	4 μl
iScript Reverse Transcriptase	1 μl
RT control *	1 μl
Nuclease-free water	variable
Total	20 μl

*RT control: プレデザインされた PrimePCR Plate Assay をご注文いただくと、PrimePCR RT Ctrl RNA Template (Cat# 10025695)が無償添付されます。200 μl の nuclease-free TE (pH7.5)を加えてからご使用ください。RT control は逆転写反応の効率を評価するために使用します。

2) 表 2 に従って、逆転写反応を行います。

表 2 反応温度と時間

Step	Temperature	Time	No. of Cycles
Reverse transcription (逆転写反応)	42°C	30 min	1
Inactivation (不活性化)	85°C	5 min	1

3) 逆転写反応後、リアルタイム PCR 反応を行うために、cDNA 濃度 (RNA 濃度) を調整します。1 µg の Total RNA から逆転写反応を行った場合には、反応後のサンプルに 80 µl の Nuclease-free water を加え 5 倍希釈します。

【各ステップにおける RNA 量】

1 ug RNA/ 20 µl RT reaction	50 ng/µl x 20 µl	(反応時)
→5x dilution	10 ng/µl x 100 µl	(希釈時)
→Use 1 µl /qPCR reaction	10 ng/reaction	(リアルタイム PCR 反応時)


① リアルタイム PCR 反応

1) 機器の設定 : Bio-Rad CFX システムをご利用の場合

(ア) CFX Manager 設定用のファイル Run File(.zip)を PrimePCR ウェブサイト

(www.bio-rad.com/primepcr)内の Plate assay 商品の詳細ページ等から「Run Flie (.zip)」をクリックし、データをダウンロードしてください。注文履歴等から希望のプレート情報へリンクすることも可能です。ファイルのダウンロード時はウェブサイトを英語表示にしてください。日本語表示のままダウンロードした場合、CFX Manager で正常に読み込めない場合があります。



(イ) ダウンロードした Run File(.zip)を解凍し、得られた実験ファイル (CSV 形式ファイル、例:  PrimePCR_xxxx_RunFile.csv 等)を CFX システムの PC にコピーします。CFX Manager を起動し、コピーした実験ファイルをメインウィンドウにドラッグ&ドロップします。プロトコール及びプレート設定 (遺伝子名) が自動的に設定され、直ちに Start Run が可能です。



2) リアルタイム PCR 反応

(ア) 試薬(SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix、カタログ番号 1725270)は、あらかじめ溶解した後に、攪拌、遠心しておきます(遮光、氷冷)。

(イ) PrimePCR plate を室温に戻します。

(ウ) 表 3 に従って、反応液を調製します。

表 3 リアルタイム PCR 反応液

Component (96 well の場合)	1 反応	96 反応例
20x PrimePCR assay (plate)	Dried in well	
2x SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	10 μ l	1 ml
②-3)により希釈した cDNA sample (100 ng – 100 fg)	1-4 μ l	100 μ l
Nuclease-free water	Variable	900 μ l
Total	20 μ l	2 ml

(エ) プレートの各 well に反応液を 20 μ l ずつ分注します。

(オ) PCR コントロール反応用の well (PCR) (アッセイ例では E12) に、PrimePCR PCR Ctrl Primer Assay (PrimePCR Plate Assay に無償添付)を 1 μ l 追加してください(反応液 21 μ l)。

(カ) キャップもしくはシール後、プレートを遠心して、泡を除きます (4000 rpm x 2 min)

(キ) 表 4 に従って、反応を行います。

表 4 反応サイクル (すでに PrimePCR 用の Run File を取り込んでいる場合には設定不要)

Step	Temperature	Time	No. of Cycles
Activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	5 sec	40
Annealing/Extension	60°C	30 sec	
Denaturation	95°C	5 sec	1
Melt Curve	65-95°C (+0.5°C)	5 sec/step	-

Product: PrimePCR Pathway Plate, 96 Well
Plate Name: Angiogenesis H96, Human
Concentration: 20x
Purification: Desalted
Format: 96-wells x 20µl reactions
Item: 10025073
Instrument: CFX96 Touch
Quantity: 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AKT1	CCL2	CXCR2	EPAS1	FGF2	HIF1A	ITGB5	NOTCH3	PIK3CD	SERPINE1	TGFBR2	TBP
B	ANG	CD34	CXCR4	EPHA2	FGF9	HMOX1	KDR	NRP1	PIK3CG	SHC1	THBS1	GAPDH
C	ANGPT1	CEACAM1	CYR61	EPHB2	FGFR1	HPSE	MAPK14	PDGFB	PRKCA	SHH	TNFRSF12A	HPRT1
D	ANGPT2	COL18A1	EDN1	EPHB4	FGFR2	IGFBP7	MCAM	PDGFRA	PRKCD	SSTR2	TNFSF12	gDNA
E	ANPEP	COL4A1	EDNRA	EPO	FIGF	IL18	MMP14	PDGFRB	PTEN	SYK	TYMP	PCR (オ)
F	ANXA2	CTGF	EDNRB	ETS1	FLT1	ITGA2	MMP2	PGF	PTK2	TEK	VEGFA	RQ1
G	BMP4	CTNNB1	EGF	F2R	FLT4	ITGAV	NOS3	PIK3CA	PTK2B	TGFB1	VEGFC	RQ2
H	CAV1	CXCL12	ENG	FGF1	FN1	ITGB1	NOTCH1	PIK3CB	ROBO1	TGFB1	VHL	RT

④ 解析

CFX Manager のメインメニューから File>Open>Data File で該当データファイルを開きます。

【コントロール実験の評価】

- gDNA : サンプル中の gDNA 混入が多い。 Cq < 35
- PCR : 阻害物等により PCR パフォーマンスが低下している。 Cq ≥ 30
 (PrimePCR PCR Ctrl Prime Assay を PCR 反応に追加, ③の(オ)参照)
- RQ1, RQ2 : 分解により RNA の品質が低下している。 Cq(RQ2)-Cq(RQ1) > 3.0
 (長鎖 RNA と短鎖 RNA に対するアッセイ)
- RT : 逆転写反応(cDNA 合成)の効率が悪い。 Cq ≥ 30
 (RNA サンプルに PrimePCR RT Ctrl RNA Template を加える、②参照)

Ordering Information

カタログ番号	品名	回数	価格
RNA 精製キット			
7326820	Aurum Total RNA ミニキット	50 回分	¥35,000
cDNA 合成キット			
1725037	iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	20 µl x 25 反応	¥16,000
1725038	iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	20 µl x 100 反応	¥49,000
リアルタイム試薬			
1725270	SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	20 µl x 200 反応	¥25,000
1725271	SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	20 µl x 500 反応	¥55,000
プレートシール			
MSB1001	Microseal 'B' シーリングフィルム	100 枚	¥31,000

製品の学術的なお問い合わせは

Mail : life_ps_jp@bio-rad.com

Tel : 03-6404-0331

Fax : 03-6404-0334