

プライマーの決定方法

- (1) NCBI より Nucleotide の項目を選ぶ。
- (2) 目的の遺伝子名または遺伝子番号を入れ、検索する。
- (3) 塩基配列のうち、codingDNA の位置を確認する。
- (4) codingDNA を Genetyx にコピーし、Nucleotide から Search PCR primer を開く。
- (5) 条件設定し、検索する。
- (6) 検索結果から T_m 値があうものを選ぶ。
- (7) Positive control で PCR を行い、設定した分子量の産物ができているか確認する。

RT-PCR

1. RNA の調整：手袋着用、実験台の清掃

- (1) 細胞培養ディッシュよりメディウムを除き、PBS (Phosphate Buffered Saline) を 5ml 加える。全体に行き渡らせた後、PBS を除き、ISOGEN を加える (10 cm²/ml、5-10x10⁶ cells/ml)。ISOGEN にはフェノールが入っており、目盛りがついたプラスチックピペットは溶け出す可能性があるため、使用しない。また、皮膚に付着するとやけどするので万が一付着した場合はすぐに洗い流す。
- (2) ISOGEN に細胞を溶かしだし、15 ml コニカルチューブに回収する。
- (3) 室温で 5 分間放置する。
- (4) クロロホルムを 200 μl/ISOGEN 1ml 加え、15 秒間ボルテックスにかける。2-3 分間室温で放置する。
- (5) 12000xg、15 分間、4°C 遠心する。
- (6) 上層 (水層:透明部分) を 15 ml コニカルチューブに移す。
- (7) イソプロパノールを 0.5ml/ISOGEN 1 ml 加え、転倒混和する。その後、5-10 分間、室温で放置する。
- (8) 12000xg、10 分間、4°C 遠心する。
- (9) 水層を取り除く。沈殿がでているのを確認する。
- (10) 70%エタノールを 1ml/ISOGEN 1ml 加え、7500xg、5 分間、4°C 遠心する。
- (11) 70%エタノールを除き、沈殿を乾かす。
- (12) DEPC-DDW (RNase-free) を適当量加え、溶かす。
- (13) (12) の RNA 溶液を 1μl 取り 100 倍希釈する。
- (14) A260nm を測定し、RNA 濃度を計算する。 (A260nm) x40x 希釈倍率
=RNA (μg/ml)

2. cDNA を合成する。(QIAGEN; Omniscript 使用)

- | | |
|----------------------|----------------|
| (1) 10x buffer RT | Final conc: 1x |
| 5mM dNTP mix | 0.5 mM |
| 50μM Oligo-dT primer | 1 μM |

40U/ μ l RNase inhibitor	10 units/20 μ l
4U/ μ l Omniscript Reverse Transcriptase	4 units/20 μ l
RNase-free water	variable
RNA	1 μ g/20 μ l (up to 2 μ g)

これらの試薬を全部で 20 μ l となるように加える。

- (2) 37°Cで 60 分間インキュベートする。終了後保存する場合は-20°C、すぐに使用する場合は氷上に置く。

3. PCR 反応を行う。(Fermentas; Taq polymerase 使用)

(1) 10x PCR buffer	Final conc: 1x
25 mM MgCl ₂	2 mM
20 mg/ml BSA	0.1 mg/ml
10 mM dNTP	0.2 mM
10 μ M PrimerA	0.4 μ M
10 μ M PrimerB	0.4 μ M
5 U/ μ l Taq polymerase	0.5 U/25 μ l
Template DNA	variable
Sterile DDW	variable

これらの試薬を全部で 25 μ l となるように加える。

- (2) PCR reaction
- | | | |
|------|--------|-----------|
| 94°C | 1 min | 35 cycles |
| 94°C | 30 sec | |
| 55°C | 30 sec | |
| 72°C | 2 min | |
| 72°C | 5 min | |
| 4°C | pause | |

- (3) 終了後の PCR 産物は 4°C保存

4. Agarose 電気泳動を行う。

- (1) Agarose 1g 測り、1x TAE を 100 ml 加える。(500 ml フラスコ)

- (2) 電子レンジで3分間加熱する。この際、突沸したらすぐ止めてフラスコを取り出して攪拌する。(熱いので軍手着用)
- (3) (2)の操作を何回か繰り返して Agarose を完全に溶かす。
- (4) 溶けた Agarose は 50°C前後になるまで冷ます。
- (5) ゲル板をセットする。
- (6) 冷めた Agarose に 10 mg/ml EtBr (毒性有り、手袋着用。使用したチップは専用ゴミ箱に捨てる) を 5 μ l 加え、攪拌する。
- (7) ゲル板へ流し込み、固まるまで待つ。
- (8) ゲルが固まったら、取り出し、1xTAE の入った泳動槽に置く。
- (9) 6x Loading buffer 1 μ l+PCR product 5 μ l 混ぜ、アプライする。
- (10) -から+へ 100V で電気泳動する。
- (11) 30分後にとめて UV 照射下で写真撮影を行う。