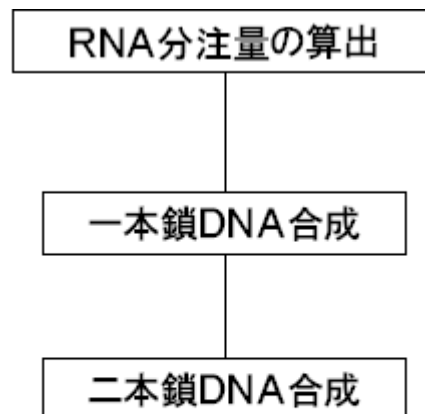




目 次

分類	項目	ページ
GEN109 Ver.3	作業手順の流れ図	1
	1. 序	2
	2. 試薬、器具及び機器	
	2-1. 試薬	2
	2-2. 器具	2
	2-3. 機器	2
	3. 試薬の調製	3
	4. 操作手順	
	4-1. 一本鎖 DNA 合成	4
4-2. 二本鎖 DNA 合成	4	

作業手順



## 1 序

本 SOP は、cDNA の合成手順について記載したものである。

## 2 試薬、器具及び機器

### 2-1 試薬

#### 1) Gene Chip 3' IVT Express Kit (BOX 2 of 2)

cDNA 合成試薬は Affymetrix の製品を用いて行う。

本セットは、GeneChip の反応用に各試薬の内容量が調整されている。

#### 【キットの構成成分】

・ First-Strand Enzyme Mix	33 $\mu$ L (30 回分)	-30°C 保存
・ First-Strand Buffer Mix	132 $\mu$ L (30 回分)	-30°C 保存
・ Second-Strand Enzyme Mix	66 $\mu$ L (30 回分)	-30°C 保存
・ Second-Strand Buffer Mix	165 $\mu$ L (30 回分)	-30°C 保存
・ Nuclease-free Water	1.75 mL (30 回分)	-30°C 保存

### 2-2 器具

- 1) Sterile-barrier, RNase-free Pipette Tips
- 2) Non-stick RNase-free microfuge tubes, 0.5 mL
- 3) Non-stick RNase-free microfuge tubes, 1.5 mL
- 4) 8-Strip PCR Tubes & Caps (0.2mL)

### 2-3 機器

- 1) Thermal Cycler with heated Lid
- 2) Vortex Mixer
- 3) Microcentrifuge

### 3 試薬の調製

試薬を調整する前に Enzyme 類は数回タッピングをした後、冷凍試薬は室温で完全に融解した後、氷上にて保持し使用する。

#### 1) 1本鎖cDNA用master mix

下表に従い、氷冷下でチューブにmixを調製する。

おだやかにボルテックスしよく混合してスピンドウン（上限5秒間）を行う。

使用まで氷冷下で保存する

試薬	1 サンプル分	25 サンプル分	50 サンプル分
First-Strand Buffer Mix	4 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L
First-Strand Enzyme Mix	1 $\mu$ L	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L
合計	5 $\mu$ L	125 $\mu$ L	250 $\mu$ L

#### 2) 2本鎖cDNA用master mix

下表に従い、氷冷下でチューブにmixを調製する。

おだやかにボルテックスしよく混合してスピンドウン（上限5秒間）を行う。

使用まで氷冷下で保存する

試薬	1 サンプル分	25 サンプル分	50 サンプル分
Nuclease-free water	13 $\mu$ L	325 $\mu$ L	650 $\mu$ L
Second Strand Buffer Mix	5 $\mu$ L	125 $\mu$ L	250 $\mu$ L
Second Strand Enzyme Mix	2 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L
合計	20 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1,000 $\mu$ L

#### 4 操作手順

##### 4-1 一本鎖 DNA 合成

- 1) [SOP-GEN107]に従って 100 ng/5  $\mu$ L になるように RNA 溶液と RNase-free Water の液量を算出する。
- 2)  $-80^{\circ}\text{C}$ で保存してある RNA 溶液サンプルを取り出し、融解後タッピングしてスピンドウンする。
- 3) フタとチューブにナンバリングした 8-Strip PCR Tubes に、1) で算出した液量の RNase-free Water と RNA 溶液を分注する。  
注) 分注は 1) RNase-free Water  $\rightarrow$  2) サンプルの順番で添加する。
- 4) 各サンプルチューブに 1 本鎖 cDNA 用 master mix (3.1) 参照) を 5  $\mu$ L ずつ添加し、おだやかにボルテックスし十分に混合した後、スピンドウン (上限 5 秒間) する。  
注) チップは、サンプルごとに交換する。
- 5)  $42^{\circ}\text{C}$ で 2 時間反応させる (サーマルサイクラー使用)。
- 6) 反応後スピンドウン (上限 5 秒間) を行い、次のステップまで氷上に置く。
- 7) 次のステップのためサーマルサイクラーを  $16^{\circ}\text{C}$ に設定する。

##### 4-2 二本鎖 DNA 合成

- 1) 各サンプルチューブに 2 本鎖 cDNA 用 master mix (3.2) 参照) 20  $\mu$ L を添加し、おだやかにボルテックスし十分に混合させ、スピンドウン (上限 5 秒間) する。スピンドウン後氷上にて保持する。
- 2)  $16^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させる (サーマルサイクラー使用)。
- 3)  $65^{\circ}\text{C}$ で 10 分間反応させる (サーマルサイクラー使用)。
- 4) スピンドウン (上限 5 秒間) を行う。  
  
この時点でサンプルを一晚保存可能 ( $-20^{\circ}\text{C}$ )。
- 5) 氷上下に置き、[SOP-GEN110-2]に従い、IVT 反応を実施する。

以下余白