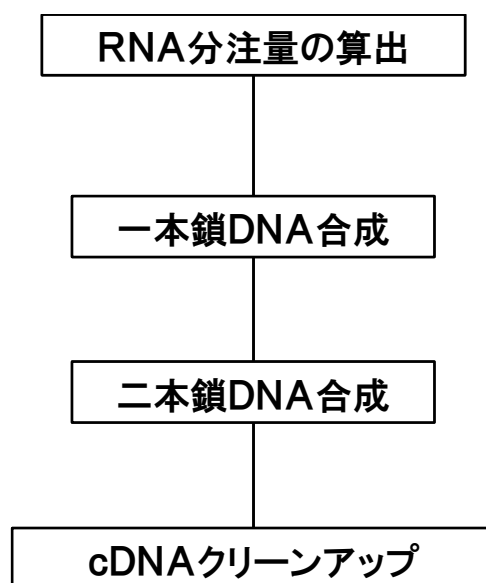


目 次

分類	項目	ページ
GEN109 Ver.4	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	2-3
	2-2. 器具	3
	2-3. 機器	3
	3. 試薬の調製	4
	4. 操作手順	
	4-1. 一本鎖 DNA 合成	5
	4-2. 二本鎖 DNA 合成	5-6
4-3. cDNA のクリーンアップ	6-7	

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

- ・ cDNA 合成試薬 cDNA 合成試薬は Affymetrix の製品を用いて行うが、使用形態には 2 種類ある。通常は 1) のセットを用いるが、T7-Oligo(dT) Primer と SuperScript II が残るため、2) のセットでは、上記 2 つ以外の試薬を単品で購入する。

1) One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, cat.# 900431, -20°C 保存)

本セットは、GeneChip の反応用に各試薬の含量が調整されているが、T7-Oligo(dT) Primer と SuperScript II が倍量入っている。

【キットの構成品】

・ T7-Oligo(dT) Primer, 50 μM	120 μL (60 回分)	
・ 5×1st Strand Reaction Mix	120 μL (30 回分)	
・ DTT, 0.1M	60 μL (30 回分)	
・ dNTP, 10 mM	120 μL (30 回分)	
・ SuperScript™ II (200 U/μL)	60 μL (60 回分)	
・ 5X 2nd Strand Reaction Mix	900 μL (30 回分)	
・ E.coli DNA Ligase (10 U/μL)	30 μL (30 回分)	
・ E.coli DNA Polymerase I (10 U/μL)	120 μL (30 回分)	
・ RNase H (2 U/μL)	30 μL (30 回分)	
・ T4 DNA Polymerase (5 U/μL)	60 μL (30 回分)	
・ EDTA, 0.5M	300 μL (30 回分)	室温保存
・ RNase-free Water	3.1 mL	室温保存

2) 1) セットの残り (T7-Oligo(dT) Primer, SuperScript II) と不足分の組み合わせ

- ・ **T7-Oligo(dT) Primer, 50 μM (①の残り : 60 μL を使用)**
- ・ **SuperScript™ II (200 U/μL) (①の残り : 30 μL を使用)**

【単品購入品目】

<ul style="list-style-type: none"> ・ 5×First Strand Buffer ・ 0.1M DTT 	1 mL 0.5 mL × 0.2 本	} セット
(0.1M DTT の単品購入が不可能な為、上記セットで購入する。 5×First Strand Buffer は不要なため廃棄可)		
・ 10 mM dNTP Mix (cat.# 18427-013)		100 μL × 20 本
・ 5×Second Strand Buffer (cat.# 10812-014)		500 μL × 3 本 E.coli
DNA Ligase (10 units/μL) (cat.# 18052-019)	10 μL × 5 本 E.coli	DNA
Polymerase I (10 units/μL) (cat.# 18010-025)	100 μL × 2 本 E.coli	RNase H (2
units/μL) (cat.# 18021-071 : 4 本セット)	15 μL × 3.4 本 (1 本での購入の場合、cat.# 18021-014)	
・ T4 DNA Polymerase (5 units/μL) (cat.# 18005-025)		50 μL × 2 本

- 3) GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix, cat.# 900371 : 30 反応分)
室温保存
使用期限 : 購入日から 1 年以内
 - ・ cDNA Binding Buffer 20 mL
 - ・ cDNA Wash Buffer, 6mL concentrate 6 mL (作成法は、3.4 に記載)
 - ・ cDNA Elution Buffer 15 mL注) cRNA クリーンアップ試薬と一緒に入っているので間違えないように注意する。
- 4) DEPC-Treated water (Ambion, cat.# 9915G または同等品)
室温保存
使用期限 : 購入日から 1 年、開封後から 3 ヶ月
- 5) 0.5M EDTA Disodium Salt (Sigma, cat.# E-7889) または同等品
冷蔵保存
使用期限 : 購入日から 1 年、開封後から 3 ヶ月
- 6) エタノール(和光純薬工業、cat.# 057-00456、特級、規格 : 99.5%以上)または同等品
室温保存
使用期限 : 購入日から 3 年

2-2 器具

- 1) GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix, cat.# 900371:30 反応)
 - ・ cDNA Cleanup Spin Column 30 個
 - ・ 1.5 mL Collection Tube (for elution) 60 個
 - ・ 2 mL Collection Tube 60 個

注) cDNA のクリーンアップ用カラムは、cRNA のクリーンアップ用カラムと一緒に入っているの間違いに注意する。

(cDNA 用カラム : 薄い紫色、cRNA 用カラム : 透明・ナチュラル)

注) 同封されている 1.5 mL Collection Tube は、蓋の付け根が柔らかい為、カラムをセットして遠心すると蓋が取れてしまう場合があるので、ここでは使用しない。

- 2) DNase/RNase フリー、Pyrogen フリー 1.5 mL 容マイクロチューブ
(ビーエム機器, BM-15 BM リングロックチューブまたは同等品)

2-3 機器

- 1) ヒートブロック (エッペンドルフ ; Thermomixer Comfort、タイテック ; DryThermoUnit DTU-N または同等品)
- 2) 微量高速冷却遠心機 (トミー工業、MX-300 または同等品)

3 試薬の調製

1) 一本鎖 DNA 合成用 mix

下表に従い、1.5 mL 容チューブに mix を調製する。各試薬は融解後、タッピング及びスピンドウンした後使用すること。

使用直前に調製し、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
5×First Strand Buffer	4 μL	100 μL	200 μL
0.1M DTT	2 μL	50 μL	100 μL
10 mM dNTPs mix	1 μL	25 μL	50 μL
合計	7 μL	175 μL	350 μL

2) 二本鎖DNA合成用mix

下表に従い、mix を調製する。各試薬は融解後、タッピング及びスピンドウンした後使用すること。タッピングにてよく攪拌し、ボルテックスミキサーは使用しないこと。使用直前に調製し、使用まで氷冷下で保存する（泡立てると酸化の原因になり、ポリメラーゼ類に悪い影響を与えるため）。

試薬	1 サンプル分	25 サンプル分	50 サンプル分
DEPC-Treated water	91 μL	2,275 μL	4,550 μL
5×Second Strand Buffer	30 μL	750 μL	1,500 μL
10 mM dNTP Mix	3 μL	75 μL	150 μL
<i>E. coli</i> DNA Ligase	1 μL	25 μL	50 μL
<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	4 μL	100 μL	200 μL
<i>E. coli</i> DNA RNase H	1 μL	25 μL	50 μL
合計	130 μL	3,250 μL	6,500 μL

3) cDNA Wash Buffer

使用期限：調製後1ヶ月、室温保存

Wash Bufferのボトルに24 mLのエタノール(96~100%、TGPでは99.5%以上のものを使用)を添加し使用する。エタノールを添加した際、ボトルキャップのチェックボックスにチェックを入れ、作成日を記載する。

1ヶ月以内に全量使用しない場合は、使用量に応じてWash Bufferのボトルより分取し、DNase/RNaseフリーの容器内にて調製する。

4 操作手順

4-1 一本鎖 DNA 合成

- 1) [SOP-GEN107]に従って 5 µg/10 µL になるように RNA 溶液と RNase-free Water の液量を算出する。
- 2) -80°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) 1.5 mL 容マイクロチューブ（蓋に識別番号を記載）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 → 2) サンプルの順番で添加する。
- 4) T7-Oligo(dT) Primer, 50 µM をサンプル溶液に 2 µL 添加し、タッピングによりよく混合した後、スピンドウンする（チップはサンプルごとに交換する）。
- 5) 70°Cで 10 分間インキュベートを行う（タイテック製ヒートブロック使用）。
- 6) 反応後、2 分間以上氷冷下に置き、スピンドウンする。
- 7) 各サンプルチューブに一本鎖 DNA 合成用 mix (3, 2) 参照) を 7 µL ずつ添加し、タッピングでよく混合した後、スピンドウンする。
注) チップは、サンプルごとに交換する。
- 8) 42°Cで 2 分間反応させる（タイテック製ヒートブロック使用）。
- 9) サンプル液に SuperScript II RT 1 µL を添加し、ピペッティングにより完全に出し切った後、タッピングでよく混合させスピンドウンする（泡立て禁止）。
注 1) チップはサンプルごとに交換する。
注 2) 酵素は酸化に弱いので素早く添加し、過剰なピペッティングは禁止
- 10) 42°Cで 1 時間反応させる。（タイテック製ヒートブロック使用）

4-2 二本鎖 DNA 合成

- 1) 各サンプルチューブに二本鎖 DNA 合成用 Mix(3.3) 参照) 130 µL を添加し、タッピングで混合させ、スピンドウンする（泡立て禁止）。
注) 二本鎖 DNA 合成用 Mix の添加は 1 本のチップで行うが、サンプル及び内壁等に付着した恐れがある場合はチップを交換する。
- 2) 16°Cで 2 時間反応させる（エッペンドルフ製ヒートブロック使用）。
注) タイテック製のヒートブロックは冷却機能がついていないので使用しない事

- 3) 反応後、T4 DNA Polymerase を 2 μL 添加し、ピペッティングにより完全に出し切った後、タッピングでよく混合させスピンドウンする（泡立て禁止）。

注 1) チップはサンプルごとに交換する。

注 2) 酵素は酸化に弱いので素早く添加し、過剰なピペッティングは禁止

- 4) 16°C で 5 分間反応させる（エッペンドルフ製ヒートブロック使用）。
- 5) 0.5 M EDTA 溶液 10 μL を添加し、ボルテックスミキサーにてよく混合後、スピンドウンする。

注) この段階で -20°C 保存可能である。

4-3 cDNA のクリーンアップ

以下に記載する全ての操作は、室温で実施する。

- 1) サンプル溶液 (162 μL) に 600 μL の cDNA Binding Buffer を加え、ボルテックスを用いて 3 秒間混合し、スピンドウンする。

注) cDNA Binding Buffer の添加は 1 本のチップで行うが、サンプルや buffer が内壁等に付着した恐れがある場合はチップを交換する

- 2) 溶液の色が黄色であることを確認する（cDNA Binding Buffer に近い色）。
* オレンジもしくはミドリ色の場合は、工程責任者に連絡する。
- 3) cDNA Cleanup Spin Column (蓋に識別番号を記載) を 2 mL Collection Tube (コレクションチューブ) にセットする。
- 4) Column にサンプル溶液 500 μL を分注し、蓋を閉めた後、微量高速冷却遠心機を用いて遠心 (10,500 rpm、1 分、室温) する。
注) チップはサンプルごとに交換する。
- 5) 遠心後、コレクションチューブ内の溶液を廃棄し、再度、コレクションチューブをセットする。
- 6) Column に残りのサンプル溶液 (262 μL) を分注し、蓋を閉めて遠心 (10,500 rpm、1 分、室温) する。
- 7) 遠心後、コレクションチューブ内の溶液及び使用したコレクションチューブを廃棄する。
- 8) Column を新しい 2 mL コレクションチューブにセットする。
- 9) cDNA Wash Buffer 700 μL を Column に分注し、蓋を閉めて遠心 (10,500 rpm、1 分間、室温) する。

- 10) 遠心後、コレクションチューブ内の溶液を廃棄し、再度、コレクションチューブをセットする。
- 11) 蓋を開けた状態で Column を遠心 (15,000 rpm、5 分間、室温)する。
- 12) 遠心後、コレクションチューブ内の溶液及び使用したコレクションチューブを廃棄する。
- 13) Column を新しい 1.5 mL 容マイクロチューブ (蓋に識別番号を記入)にセットする。
- 14) 14 μ L の cDNA Elution Buffer を Column membrane の上に添加する。
注 1) 必ずメンブランの上に液が乗るよう滴下すること。
注 2) cDNA Elution Buffer の添加は 1 本のチップで行うが、サンプルや buffer が内壁等に付着した恐れがある場合はチップを交換する
- 15) 1 分間静置後、遠心 (15,000 rpm、1 分間、室温)する。
*約 12 μ L の溶液が回収可能。
- 16) [SOP-GEN110]に従い、IVT 反応を実施する。

以下余白