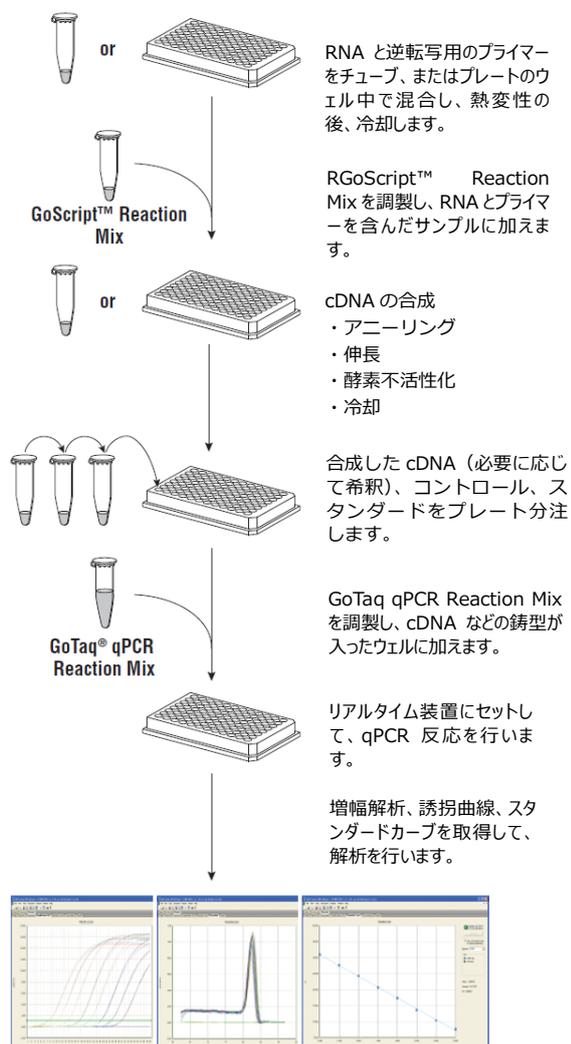


**プロトコル概要**



**GoScript™ 逆転写酵素による cDNA 合成**

4. GoScript™ Reaction Mix を順番に試薬を加えて調製します。

構成成分	GoScript™ Reaction Mix	Minus-Reverse Transcriptase Reaction Mix
Free Water (to a final volume of 10µl)	1.5µl	2.5µl
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4µl	4µl
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	2µl	2µl
PCR Nucleotide Mix, 10mM	1µl	1µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0.5µl	0.5µl
GoScript™ Reverse Transcriptase	1µl	0µl
最終容量	10µl	10µl

5. GoScript™ Reaction Mix に、1-3 で調製したプライマー + RNA を加えます。

構成成分	逆転写反応
GoScript™ Reaction Mix or Minus-Reverse Transcriptase Reaction Mix	10µl
RNA and reverse transcription primer prepared in Steps 1-3	10µl
最終容量	20µl

6. 次のような温度で cDNA 合成 (逆転写反応) を行います。

ステップ	温度	時間
アニーリング (オプション)	25°C	5 分間
伸長	42°C	1 時間
不活性化	70°C	15 分間

温度は、変更可能です。詳細は英文マニュアル TM337 を参照してください。

7. 合成した cDNA は 4°C、または氷上で次の反応まで保存します。cDNA は、-20°C で保存できます。

**GoTaq® qPCR Master Mix による cDNA の定量**

8. cDNA と標準サンプルを Nuclease-free water で希釈します。

9. 調製した cDNA サンプル、また標準サンプルをそれぞれ 10µl ずつ反応プレートに加えます。プレートなしのコントロール用には水 (Nuclease-free Water) を加えます。

**プロトコル**

**RNA と逆転写反応プライマーの準備**

1. RNA と逆転写反応用のプライマーを調製します。

構成成分	容量
RNA (up to 5µg/reaction)	___µl
Primer [Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer and/or Random Primer or gene-specific primer]	1µl
Nuclease-Free Water (up to a final volume of 10µl)	___µl
最終容量	10µl

- (オプション) 必要に応じて RNA とプライマーを 70°C で 5 分処理したのち、4°C で 5 分して変性させます。
- RNA とプライマーを逆転写反応を行うまで氷上で保存します。



10. GoTaq® qPCR Master Mixを室温に戻し、水、プライマーを加えてGoTaq® qPCR Reaction Mixを調製します。

構成成分	容量
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	25µl
Nuclease-Free Water (to a final volume of 40 µl)	—µl
Forward and reverse qPCR primers <sup>1</sup>	—µl
最終容量	40µl

注1: CXRの添加が必要な機器（右表参照）を利用する場合には、100×CXR reference dye をあらかじめ2×GoTaq® qPCR Master Mixに1mlに対して100×CXR reference dye 20µl を先に加えてください。その後、1サンプルあたり25.5µl 分注するなどの方法で行ってください。  
注2: プライマーの濃度は、増幅する配列によって異なります。50-500nM でご検討ください。

11. 40µlのGoTaq® qPCR Reaction Mixを、10µlのcDNAサンプル、標準サンプル、水（テンプレートなしのコントロール）が入ったウェルに分注します。軽く遠心します。
12. リアルタイムPCR装置の右表のようにフィルター、プログラムを設定します。
13. 準備した反応プレート装置にセットし、反応を行います。
14. 反応終了後に解析を行います。

#### 機器のフィルター設定

検出フィルター:	FAM™, SYBR® (BRYT®)
リファレンス波長:	ROX™ (CXR)

#### プログラムの設定（標準法とFast法）

	サイクル数	標準プログラム	Fastプログラム
ホットスタートの活性化	1	95°C、2分	95°C、2分
変性	40	95°C、15秒	95°C、3秒
アニーリング/伸長		60°C、60秒	60°C、30秒
解離	1	60-95°C	60-95°C

※プライマーや機種の違いによって温度等を変更する必要があるかもしれません。  
Fast法は、機種によって対応できない場合もあります。

#### CXR リファレンスダイの添加が不要な機種

Applied Biosystems 7500 & 7500 Fast Real Time PCR Systems
Stratagene Mx3000P® and Mx3005P® Quantitative PCR Systems
Roche LightCycler® 480
Roche LightCycler 1.5 and 2.0 systems
BioRad Chromo4™ Real-Time Detector
BioRad CFX Real-Time PCR Detection Systems
BioRad iCycler iQ5™ and MyCycler™
Eppendorf Mastercycler® ep realplex4 and realplex4 S
Qiagen Rotor-Gene™ Q, 3000, and 6000

#### CXR リファレンスダイの添加が必要な機種（終濃度 1X）

Applied Biosystems 7000 Sequence Detection System
Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems 7700 Sequence Detection System
Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems StepOne® and StepOne®Plus Real-Time PCR Systems

