

TaqMan[®] Gene Expression Assays

安全およびバイオハザード指針については、TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol (PN 4333458)の「安全」のセクションを参照して下さい。全ての**赤い太字**の化学物質についてはMSDSを参照し、取扱説明書に従って下さい。適切な眼の保護具、保護服および保護手袋を着用して下さい。

1 トータルRNAの調製

- トータルRNAを抽出します。
- 抽出されたトータルRNAを評価します。

2 逆転写反応の実行

アプライドバイオシステムズは、RNAサンプルからcDNAを得るためにHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit等の使用を推奨しています。詳細は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Protocol (PN 4375575)を参照して下さい。

注記:すぐにPCRする必要がある場合、cDNA試料を-15 to ~-25 °Cで保存して下さい。凍結融解回数を最小限にするためには、試料を小分けにして下さい。

3 cDNAの評価

アプライドバイオシステムズは下記条件で使用することを推奨します：

- 20-μL反応あたり1~100 ngのcDNA
- 全サンプルについて等量のcDNA

4 PCR反応液の調製

- 各サンプル(4反復分)について滅菌済みの1.5mlマイクロチューブを用意します。
- 各チューブに以下を分注します：

PCR反応混合成分	20-μL反応(μL)	
	1反応分	4反応分 [†]
20X TaqMan [®] Gene Expression Assays	1.0	5.0
cDNA template [‡] + RNase-free water	9.0	45.0
2 X TaqMan [®] Gene Expression Master Mix [#]	10.0	50.0
Total Volume	20.0	100.0

[†] 分注時のロスを考慮して20%の余剰量を加えています。

[‡] 20ul反応あたり1~100 ngの cDNAテンプレート RNase-free water で希釈し、正確な量を加えます。

[#] (オプション)**TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (2X)**、または**TaqMan[®] Universal PCR Master Mix**を使用することができます。

- チューブのキャップを開け、数回転倒混和します。
- 簡単に、遠心します。

5 プレートセットアップ

- 48-, 96-,または384ウェルプレートおよびプレートカバー(シール、キャップ)を選択します。
- リアクションプレートの各ウェルにPCR反応液を20 μLずつ分注します。
- 適切なカバーでプレートをシールします。
- 簡単にプレートを遠心します。

重要! TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (2X)を使用する場合、プレートセットアップから2時間以内に反応を開始して下さい。開始できない場合には、プレートを冷蔵、または冷凍して下さい。

- 機器にプレートをセットします。

6 ラン開始

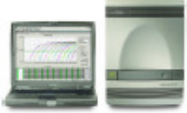
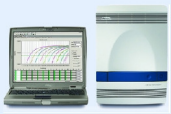
- アプライドバイオシステムズリアルタイムPCRシステムのソフトウェアを起動します。
- 2ページの表1**に示されているパラメータを使用した新規ファイルを作成します。
- ラン開始します。

7 結果解析

データ解析の詳細は使用するリアルタイムPCR機器によって異なります。ご使用機器のユーザーガイドを参照して下さい。

TaqMan® Gene Expression Assays Quick Reference Card

表1 TaqMan® Gene Expression Assaysのための実験パラメータ

システム	ランモード	リアクションプレート	標準的実験パラメータ	温度サイクリング条件		
				ステージ	温度 (°C)	時間 (mm:ss)
Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR システム 	Standard	96-well standard	・反応液量: 20 µL ・ランブ速度: Standard [†]	ホールド [§]	50	2:00
				ホールド	95	10:00
				サイクル (40サイクル)	95	0:15
					60	1:00
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR システム 	Standard	96-well Fast	・反応液量: 20 µL ・ランブ速度: Standard	ホールド [§]	50	2:00
				ホールド	95	10:00
				サイクル (40サイクル)	95	0:15
					60	1:00
	Fast	96-well Fast	・反応液量: 20 µL ・ランブ速度: Fast	ホールド [§]	50	2:00
				ホールド	95	0:20
				サイクル (40サイクル)	95	0:03
					60	0:30
Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR システム 	Standard	96-well standard	・反応液量: 20 µL ・ランブ速度: Standard	ホールド [§]	50	2:00
				ホールド	95	10:00
		384-well standard	・反応液量: 20 µL ・ランブ速度: Standard	サイクル (40サイクル)	95	0:15
					60	1:00
	Fast	96-well Fast	・反応液量: 20 µL ・ランブ速度: Fast	ホールド [§]	50	2:00
				ホールド	95	0:20
		384-well standard	・反応液量: 20 µL ・ランブ速度: Standard	サイクル (40サイクル)	95	0:01
					60	0:20
Applied Biosystems StepOne™ / StepOnePlus™ Real-Time PCR システム 	Standard	48/96-well Fast	・反応液量: 20 µL ・ランブ速度: Standard	ホールド [§]	50	2:00
				ホールド	95	10:00
				サイクル (40サイクル)	95	0:15
					60	1:00
	Fast	48/96-well Fast	・反応液量: 20 µL ・ランブ速度: Fast	ホールド [§]	50	2:00
				ホールド	95	0:20
				サイクル (40 サイクル)	95	0:01
					60	0:20

[†] 7300のシステムはStandardモードのみにあります。

[§] AmpErase® UNG 活性のためのステージです。UNGが含まれない場合は不要です。

© Copyright 2008, Applied Biosystems. All rights reserved. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Practice of the patented 5' Nuclease Process requires a license from Applied Biosystems. The purchase of the TaqMan® Gene Expression Assays includes an immunity from suit under patents specified in the product insert to use only the amount purchased for the purchaser's own internal research when used with the separate purchase of an Authorized 5' Nuclease Core Kit. No other patent rights are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. For further information on purchasing licenses contact the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

NOTICE TO PURCHASER: PLEASE REFER TO THE TAQMAN® GENE EXPRESSION ASSAYS PRODUCT INSERT AND PROTOCOL FOR LIMITED LABEL LICENSE OR DISCLAIMER INFORMATION.

Applera, Applied Biosystems, and AB (Design) are registered trademarks and StepOne and StepOnePlus are trademarks of Applera Corporation or its subsidiaries in the U.S. and/or certain other countries..

AmpErase and TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular システムs, Inc.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

07/2008

www.appliedbiosystems.com

Part Number 4428174 Rev. A