

# RealTime ready Focus Panels

## ヒトの主要パスウェイに関連する遺伝子アッセイ用のプライマー・プローブセットアップ済プレート

Cat. No. パネルによる

96 または 384 ウェルの LightCycler®480 マルチウェルプレートとシーリングフォル 各 2 枚

Ver.1/Jul.2009

保存温度+2~+8°C

### 1. 製品について

#### RealTime ready Focus Panel について

本製品は、リアルタイム PCR 遺伝子発現アッセイ用のプライマーとプローブが充填された LightCycler®480 マルチウェルプレートです。アポトーシスや細胞周期関連遺伝子のようなヒト細胞の主要パスウェイに含まれる遺伝子の定量 PCR 測定が行えます。

各アッセイはパフォーマンス検証済のデザインのため、サンプルと試薬を加えるだけで測定を始められます。

#### 内容

アッセイ搭載 LightCycler®480 Multiwell プレート(封入袋入り)と、シーリングフォイルが 2 枚ずつ含まれます。

#### 保存方法

保存温度：+2°C- +8°C(冷蔵) 遮光保存

輸送温度：室温

\* 上記温度条件においてラベル記載の使用期限まで安定です。

#### 追加で必要な機器・試薬

本製品は、LightCycler®480 プラットフォームで動作します。

以下の機器・試薬は別途ご用意ください。

- LightCycler®480 リアルタイム PCR システム
- スイングローター式プレート遠心機 (スピンドウン用)
- マイクロピペットおよびエアロゾル耐性ピペットチップ
- 2ml/5ml 滅菌反応チューブ
- LightCycler®480 Probes Master (増幅用マスターミックス)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (cDNA 合成試薬)

#### プレートレイアウト

パネルによって異なります。各製品同梱の説明書またはウェブサイト(<http://roche-biochem.jp/>)よりご確認ください。

#### 搭載遺伝子リスト

パネルによって異なります。各製品同梱の説明書またはウェブサイト(<http://roche-biochem.jp/>)よりご確認ください。

### 2. 使用方法

#### 2-1 測定の前に

セットアップ前に、サンプル調製(RNA 精製と cDNA 合成(RT)反応)を行います。

#### RNA サンプル調製

スタートサンプルとなる totalRNA は、ゲノム DNA や RNase の混入、RT や PCR 反応に対する阻害物質を含まない高純度の RNA を使用してください。RNA サンプル調製には下記製品の使用を推奨します。

- High Pure RNA Isolation Kit
- MagNA Pure LC/Compact と RNA 抽出用試薬

精製された RNA は、ゲル電気泳動や OD 測定、バイオアナライザ等を用いて、RNA 収量や純度、分解の程度などを確認してください。純度の指標となる OD<sub>260/280</sub> 比は、1.8-2.0 が目安となります。

qPCR 測定の反応サンプル量は、中程度発現の遺伝子の場合で 5ng RNA/well が目安となります。また、本製品の RT マイナスコントロールウェルではゲノム混入を確認することができます。

#### cDNA 合成

totalRNA サンプルから cDNA サンプルを合成します。

cDNA 合成には、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit の使用を推奨します。プライマーは、幅広い遺伝子の発現定量に最もバイアスが少なく Oligo[dT] とランダムヘキサマーのミックスプライマーの使用をおすすめします。

#### ※ 測定に必要なサンプル量について

- 発現レベル中程度の遺伝子の場合、5ng totalRNA / well が目安となります。プレート 1 枚あたりの RNA サンプル必要量は 0.5µg/96well Plate または、2µg/384well Plate となります。
- サンプル濃度は、必要に応じて 50pg~50ng/well (5ng~5µg/96 well Plate または 20ng~20µg/384well Plate) の間で最適化してください。
- パネルによって遺伝子数やレプリケート数が異なりますのでご使用のパネルの情報を確認して必要なサンプル量をご確認ください。
- RT プラス、RT マイナスコントロールウェル分の RNA サンプルと cDNA サンプルもあらかじめご準備ください。

## 2-2 プレートへのサンプルセットアップ

本製品は、LightCycler®480 Probes Master [2x 濃度]を用いた反応に最適化されています。あらかじめ、測定に必要な反応数と試薬量を確認してご用意ください。

### PCR 反応液の調整

① 必要な試薬を全て融解します。開封前によく溶解し、フタに付いた試薬も遠心スピンドウンしてください。

② 氷上においた反応液調製用チューブに必要な量を調製します。

\*ピペティング時はデッドボリュームが生じますので少なくとも 10%程度多めに反応液量を調製するようにしてください。

### 反応液の調製 (1 ウェルあたり)

コンポーネント	濃度	液量 (96well)	液量 (384well)	最終 濃度
LightCycler®480 Probes Master	2x	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l	1x
水, PCR グレード*	-	10-X $\mu$ l	5-X $\mu$ l	-
cDNA サンプル (希釈したもの)*	適宜	X $\mu$ l	X $\mu$ l	5ng RNA*
Total Volume		20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	

\*サンプルとなる cDNA は濃度や量に応じて希釈してください。(参考: cDNA(RNA)濃度は 1  $\mu$ g RNA/20  $\mu$ l の RT 反応の場合で 50ng RNA/ $\mu$ l となります) また、RT コントロール用サンプルとして、cDNA のかわりに RT 前の RNA の反応液を 1well 分作成してください。

③ 調製した反応液(②)をピペティング等で穏やかに混和し、スピンドウンします (Voltex の使用は避けてください)。

④ プレートを封入袋から取り出し、シールをはがします。

⑤ 反応液(③)を、プレートの各 well に分注します。

\* RT+ と RNA- の cDNA はターゲット遺伝子ウェルと同じサンプルを、RT-, RNA ウェルには cDNA のかわりに RT 前の RNA を含む反応液を分注します。

⑥ 新しいシーリングフイル(同梱)でプレートを封印し、スイングローター式プレート遠心機にセットして 1,500x g, 2 分のスピンドウンを行います。プレートのセットアップはこれで完了です。

⇒2-3 LightCycler®480 のセットアップへ

### 反応液の調製例 1: Apoptosis Panel, 384 (379gene, 3RT(+), 2RT(-))

- cDNA 溶液\*を PCR グレード水で適宜希釈します (2.5 ng/ $\mu$ l) \*
- PCR ミックスを調製します。

コンポーネント	濃度	液量 (420 well)	液量 (384well)	最終 濃度
LightCycler®480 Probes Master	2x	2,100 $\mu$ l	5 $\mu$ l	1x
水, PCR グレード*	-	1,260 $\mu$ l	3 $\mu$ l	-
cDNA サンプル (希釈したもの)*		840 $\mu$ l (2100 ng)	2 $\mu$ l	5ng RNA*
Total Volume		4,200 $\mu$ l	10 $\mu$ l	

\* 50ng RNA/ $\mu$ l の cDNA 42  $\mu$ l を 20 倍希釈したものの場合

\*\*デッドボリュームを考慮し、420well 分を作成しています。

このほかに、2well 分の RT-, RNA コントロールサンプル(cDNA のかわりに RT 前の RNA を 2  $\mu$ l 加えたもの)を作成します。

③ 調製した反応ミックスを、Target 遺伝子と RT+コントロールのウェルに各 10  $\mu$ l ずつ添加します。

④ RT-コントロール用ミックス(RNA サンプル)を RT-, RNA のウェルに添加します。

⑤ シーリングフイルでシールし、スピンドウンを行います。

### 反応液の調製例 2: Apoptosis Panel, 96 (91gene, 3RT(+), 2RT(-))

- cDNA 溶液を PCR グレード水で希釈します (1 ng/ $\mu$ l) \*
- PCR ミックスを調製します。

コンポーネント	濃度	液量 (420 well)	液量 (384well)	最終 濃度
LightCycler®480 Probes Master	2x	1,060 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1x
水, PCR グレード*	-	530 $\mu$ l	5 $\mu$ l	-
cDNA サンプル (希釈したもの)*		530 $\mu$ l (530 ng)	5 $\mu$ l	5ng RNA*
Total Volume		2,120 $\mu$ l	20 $\mu$ l	

\* 50ng RNA/ $\mu$ l の cDNA 11  $\mu$ l を 50 倍希釈したものの場合

\*\*デッドボリュームを考慮し、106well 分を作成しています。

このほかに、2well 分の RT-, RNA コントロールサンプル(cDNA のかわりに RT 前の RNA を 5  $\mu$ l 加えたもの)を作成します。

③ 調製した反応ミックスを、Target 遺伝子と RT+コントロールのウェルに各 10  $\mu$ l ずつ添加します。

④ RT-コントロール用ミックス(RNA サンプル)を RT-, RNA コントロールのウェルに添加します。

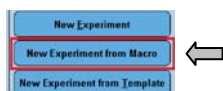
⑤ シーリングフイルでシールし、スピンドウンを行います。

## 2-3 LightCycler®480 のセットアップ

LightCycler®480 のセットアップには、Run と解析のプロトコル、プレート情報が全て含まれる **Macro ファイル**を用いる方法(1)と、プロトコルやプレート情報を手動で入力したりインポートする方法(2)があります。特に理由が無いかぎり操作の簡便な(1)をおすすめします。

### (1) Macro をインポートしてセットアップする

- ① ウェブサイト (ロシュ・オンラインカタログの製品ページ) から Zip ファイルをダウンロードして解凍します。
- ② 解凍フォルダに含まれる『パネル名 LightCycler\_480\_ (I または II) .ixo』ファイルを機器制御 PC へ移します。  
お使いの装置にあわせて、I または II をご選択ください。本体とファイルの認識が異なった場合はメッセージが表示されます。
- ③ ソフトウェアを起動し、Navigator (🔍) を開きます。
- ④ Import ボタンをクリックし、②の Macro ファイル (.ixo) を開いてから Save (💾) をクリックして適当なフォルダへ保存します。
- ⑤ Overview (📄) 画面へ戻り、New Experiment from Macro をクリックし、



表示されたリストから、パネルに対応したマクロファイル(④で保存したもの)を選択します。

これでプロトコルのセットアップは完了です。

- ⑥ サンプルを分注しシールしたプレート本体にロードします。
  - ⑦ Run Macro をクリックするとランが始まります。Experiment ファイル名をつけて保存してください。(Experiment ファイルを指定しなければ実験ファイルが保存されないのをご注意ください。)
- 測定中、測定後に、必要に応じてサンプル名を入力してください。

**⚠** Macro を用いた Run 中は、誤操作防止のためプログラム編集および『End Program』機能を使うことができません。緊急停止の必要な時のみ、『Abort Run』をクリックしてランを停止してください。

**⚠** Abort Run によって停止されたデータは信頼性の保証できないデータとしてデータ解析が作成できなくなりますのでご注意ください。

### (2) 手動でセットアップする

#### (2)-1 サンプル情報のインポート

- ① ウェブサイト (ロシュ・オンラインカタログの製品ページ) から Zip ファイルをダウンロードして解凍します。
- ② 解凍フォルダに含まれるサンプルテンプレート(.txt)ファイルを制御 PC へ移します。
- ③ ソフトウェアを起動し、Overview (📄) から New Experiment を開きます。
- ④ Sample Editor を表示し、Sample Editor 画面右下の Import (📄) を開き、(...) をクリックし②のテンプレートファイルを選択します。
- ⑤ Scan file (🔍) をクリックし、ファイル内容のチェックを行います。
- ⑥ (👉) をクリックしてファイル情報が取り込まれたらインポート終了です。ファイルにはターゲットの遺伝子名、相対定量解析のサンプルタイプ、サンプル名(RT コントロールのみ)が含まれます。

- ⑦ サブセット『RT コントロールサンプル群』と『全ての遺伝子アッセイ』をあらかじめ作成しておくことと解析の際に便利です。

#### (2)-2 温度プログラムの入力

- ① ソフトウェアを起動し、Overview (📄) から New Experiment を開きます。または、編集途中の Experiment ファイルの Run から温度プログラム編集画面を開きます。
- ② 温度プログラムを入力します。  
または、あらかじめ作成したプロトコルがあれば Apply Template (🔍) から呼び出します。

#### 96-well 用反応プロトコル

Detection Format		Block Type	Reaction Volume			
Monocler Hydrolysis Probe/UPL		384-well	10 µl			
Filter Combination* : Dynamyc Mode, FAM : 483-533 (System I)または 465-510 (System II) *Detection Format を選択すると自動的に設定されます。						
Program Name						
Analysis Mode	Cycle	Target Temp. [°C]	Acquisition Mode**	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]*	
<b>Pre-Incubation (熱変性)</b>						
None	1	95°C	None	00:10:00	4.8	
<b>Amplification (増幅)</b>						
Quantification	45	95°C	None	00:00:10	4.8	
		60°C	None	00:00:30	2.5	
		72°C	Single	00:00:01	4.8	
<b>Cooling (冷却)</b>						
None	1	40°C	None	00:00:30	2.5	

#### 384-well 用反応プロトコル

Detection Format		Block Type	Reaction Volume			
Monocler Hydrolysis Probe/UPL		96-well	20 µl			
Filter Combination* : Dynamyc Mode, FAM : 483-533 (System I)または 465-510 (System II) *Detection Format を選択すると自動的に設定されます						
Program Name						
Analysis Mode	Cycle	Target Temp. [°C]	Acquisition Mode**	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]*	
<b>Pre-Incubation (熱変性)</b>						
None	1	95°C	None	00:10:00	4.4	
<b>Amplification (増幅)</b>						
Quantification	45	95°C	None	00:00:10	4.4	
		60°C	None	00:00:30	2.2	
		72°C	Single	00:00:01	4.4	
<b>Cooling (冷却)</b>						
None	1	40°C	None	00:00:30	2.2	

\*Ramp Rate[°C/s]の変更は必要ありません。

\*\*Analysis Mode と Acquisition Mode は必ず設定ください。設定されない場合、シグナル取得ができなくなってしまうのでご注意ください。

- ③ Start Run をクリックして測定を開始します。

## 2-4 データ解析

セットアップの際にマクロファイルを使用した場合、Analysisは測定終了後に自動生成されます。

結果については、下記のとおり解析・判定を行ってください。

### コントロールサンプルの確認


- ① Analysisを開き、Create New AnalysisのAbs Quant/<sup>2nd</sup> Derivative Maxを選択します。Subsetは、RTコントロール(RT+、RT-)ウェルのサブセットを指定します。設定がなければAll Samplesで行います。
- ② Calculateをクリックし、RTサンプルウェル(RT+、RT-)がそれぞれ適切な増幅かどうか判定を行います。

コントロール	判定
RT+, 3ウェル分 (5'/middle/3')	増幅○ = 適切にRNA精製と逆転写反応が行われている可能性が高いです。 増幅× = サンプルRNAが分解しているか、RT反応が不十分な可能性があります。
RT-, cDNA RT-, RNA	RTマイナスRNAとcDNAのCp差が<10サイクル、 RTマイナスRNAのCp<32の増幅が見られる場合、 genomicDNAが著しく混入している可能性があります。

### ターゲット遺伝子アッセイの相対定量

- ① Analysisを開き、Create New AnalysisからAdvanced Relative Quantificationを選択します。
- ② Create new Analysisウィンドウが開きます。  
相対定量の対象データのセッティングを行います。

Analysis Type	Advanced Relative Quantification
Subset	遺伝子アッセイのサブセットまたは All Samples
Program	Amplification
Name	任意 (入力しなくても問題ありません)

- ③  をクリックします。
- ④ 相対定量解析の条件を選択します。

Abs Quant Type	Abs Quant / <sup>2nd</sup> Derivative Max
Subordinate Abs Quant Analysis	Create by Target Name
Reference Analysis	Create In-Run
Pairing Rule	All To Mean
Default Standard Curve Settings	Always use efficiency

- ⑤ Calculate をクリックします。
- ⑥ Ratios (Targets/Ref) が計算されます。
  - 増幅を確認したいときはSample Viewタブをクリックします。
  - 各遺伝子の定量解析を変更したいときは、Target Nameタブから各ターゲットを選択してダブルクリックします。(相対定量結果表示へ戻るときは、Back to Rel Quantをクリックします)
 Ratio (Targets/Ref)の値を測定対象サンプル同士で比較し、Reference遺伝子でノーマライズされた発現の相対定量を行うことができます。

<補足：Excel等へのインポート方法>

- ① 表示されたResults上で右クリックし、Export Tableを選択します。
- ② 名前をつけて保存します。  
保存したファイルはタブ区切りのテキストファイル(.txt)となり、Excel等の表計算ソフトで開くことができる形式になります。

## オーダー情報

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
High Pure RNA Isolation Kit	1 828 665	1キット(50回精製)	¥32,700
High Pure RNA Tissue Kit	2 033 674	1キット(50回精製)	¥32,700
High pure FFPE RNA Micro Kit	4 823 125	1キット(50回精製)	¥38,000
LightCycler® RNA Pre-Amplification Kit	5 190 894	1キット(32回反応)	¥160,000
LightCycler® 480 Probes Master	4 707 494	5 x 1 ml	¥50,000
	4 887 301	10 x 5 ml	¥400,000
	4 902 343	1 x 50 ml	¥400,000
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	4 379 012	1キット(50回反応)	¥43,000
	4 896 866	1キット(100回反応)	¥64,500
	4 897 030	1キット(200回反応)	¥110,000
RealTime ready Human Reference Gene Panel	5 339 545	2x 96ウェルプレート	¥79,000
RealTime ready Human Nuclear Receptor Panel	5 467 675	2x 384ウェルプレート	¥89,000
RealTime ready Human ABC Transporter Panel	5 339 332	2x 96ウェルプレート	¥79,000
RealTime ready Human GPCR Panel	5 467 691	2x 384ウェルプレート	¥98,000
RealTime ready Human Apoptosis Panel	5 339 324	2x 96ウェルプレート	¥79,000
RealTime ready Human ABC Transporter Panel	5 467 713	2x 384ウェルプレート	¥98,000
RealTime ready Human GPCR Panel	5 353 068	2x 96ウェルプレート	¥79,000
RealTime ready Human Apoptosis Panel	5 467 705	2x 384ウェルプレート	¥98,000
RealTime ready Human Apoptosis Panel	5 392 063	2x 96ウェルプレート	¥79,000
RealTime ready Human Apoptosis Panel	5 339 316	2x 384ウェルプレート	¥98,000

お問い合わせやご質問は・・・

 **ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社**  
AS 事業部(研究用機器・試薬)  
リサーチビジネス部  
Tel : 03-5443-5287 / Fax : 03-5443-7098  
Mail : [tokyo.biochemicals@roche.com](mailto:tokyo.biochemicals@roche.com)  
Web : <http://www.roche-biochem.io>

