

定量用コントロールの作成

1. プラスミド希釈

* プラスミド

- 1) TFF3: TFF3W TFF3 cDNA ほぼ全長を pGEM-Easy Vector(Promega)につなげたもの
- 2) LGAL3: G3W LGALS3 cDNA ほぼ全長を pGEM-Easy Vector につなげたもの
- 3) Thyroglobulin: TG TG cDNA の TaqMan PCR 定量時の PCR 増幅部位を pGEM-Easy Vector(Promega)につなげたもの
- 4) CD45: CD45 CD45 cDNA の TaqMan PCR 定量時の PCR 増幅部位を pGEM-Easy Vector につなげたもの

X = インサートの bp 数として

$$1\text{pg} = \frac{951}{3003 + X} \times 10^6 \quad (\text{copy}) \text{ で計算}$$

$$\text{G3W(G)} \quad X=941 \quad 4.15\text{pg} = 1.0 \times 10^6 \text{ copy} \quad \text{TFF3W(T)} \quad X=480 \quad 3.64\text{pg} = 1.0 \times 10^6 \text{ copy}$$

$$\text{TG(R)} \quad X=141 \quad 3.31\text{pg} = 1.0 \times 10^6 \text{ copy} \quad \text{CD45(D)} \quad X=143 \quad 3.31\text{pg} = 1.0 \times 10^6 \text{ copy}$$

1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ プラスミドサンプル 1 μl を 10ml の TE に懸濁 (100pg/ μl)

2 ml チューブ 5 本に分注して -20C で保存しておく (GV, TV, RV, DV)

GV: 4.2 μl に TE995.8 μl 加える (G0: 10 $\times 10^4$ copy/ μl)

TV: 3.6 μl に TE996.4 μl 加える (T0: 10 $\times 10^4$ copy/ μl)

RV: 33.1 μl に TE966.9 μl 加える (R0: 100 $\times 10^4$ copy/ μl)

DV: 3.3 μl に TE996.7 μl 加える (D0: 10 $\times 10^4$ copy/ μl)

LGALS3

コントロール	G0	TE
G6 (500 copy/3 μl)	2.5 μl	1497.5 μl
G5 (1 $\times 10^3$ copy/3 μl)	5 μl	1495 μl
G4 (2 $\times 10^3$ copy/3 μl)	10 μl	1490 μl
G3 (6 $\times 10^3$ copy/3 μl)	30 μl	1470 μl
G2 (2 $\times 10^4$ copy/3 μl)	100 μl	1400 μl
G1 (5 $\times 10^4$ copy/3 μl)	250 μl	1250 μl

TFF3

コントロール	T0	TE
T6 (200 copy/3 μl)	1 μl	1499 μl

T5 (600 copy/3 μ l)	3 μ l	1497 μ l
T4 (2000 copy/3 μ l)	10 μ l	1490 μ l
T3 (8000 copy/3 μ l)	40 μ l	1460 μ l
T2 (3×10^4 copy/3 μ l)	150 μ l	1350 μ l
T1 (12×10^4 copy/3 μ l)	600 μ l	900 μ l

TG

コントロール	T0	TE
R6 (3×10^3 copy/1.5 μ l)	3 μ l	1497 μ l
R5 (1×10^4 copy/1.5 μ l)	10 μ l	1490 μ l
R4 (2.5×10^4 copy/1.5 μ l)	25 μ l	1475 μ l
R3 (5×10^4 copy/1.5 μ l)	50 μ l	1450 μ l
R2 (10×10^4 copy/1.5 μ l)	100 μ l	1400 μ l
R1 (30×10^4 copy/1.5 μ l)	300 μ l	1200 μ l

CD45

コントロール	G0	TE
D6 (300 copy/1.5 μ l)	3 μ l	1497 μ l
D5 (1000 copy/1.5 μ l)	10 μ l	1490 μ l
D4 (2500 copy/1.5 μ l)	25 μ l	1475 μ l
D3 (5000 copy/1.5 μ l)	50 μ l	1450 μ l
D2 (1×10^4 copy/1.5 μ l)	100 μ l	1400 μ l
D1 (3×10^4 copy/1.5 μ l)	300 μ l	1200 μ l

2 . H 液作成 950 μ l

* 0.5ml チューブに下記を加える。

DW	38
x5 First Strand Buffer	190
dNTP (2.5mM)	190
0.1M DTT	95
Random Hexamer (200 μ M) (Takara)	23.75
RNase Inhibitor(130U/ μ l) (Takara)	9.5
MMLV-RTase (200U/ μ l) (Invitrogen)	23.75

計 570 μ l

t RNA 液 380 μ l 加える。軽く懸濁

25C 10 min 37C 50 min 70C 15 min 4C スピンドウンする -20C 保存

* tRNA 液 (20ng/ μ l)

DEPC-DW 2ml に tRNA 原液 (シグマ、50mg/ml) 0.8 μ l を加える。2ml チューブで -20C 保存

3 . コントロール作成 (25 回分)

T,G は H 液 50 μ l プラスミド液 150 μ l 混ぜる

R,D は H 液 25 μ l プラスミド液 75 μ l 混ぜる

ボルテックス、スピンドウン、-20C 保存 使用するときにはスピンドウンしてから

細胞からの RNA 抽出

1 . 細胞の採取

180 μ l の 0.2%NaCl-EDTA を入れたチューブ (チューブ 1) と 900 μ l の RNAlater (Ambion) を入れたチューブ (チューブ 2) を用意。使用時には on ice にしておく。

できるだけ末梢血を吸引しないように腫瘍細胞を穿刺吸引する。

細胞診用のスライドグラスを作成した後、直ちに針をチューブ 1 につけて液を 2 回吸引・排出する。全量注射器に吸引してチューブ 2 に排出する。4C で保存 (2 週間まで)

*0.2%NaCl-EDTA

250mM EDTA (pH8.0) 4ml

NaCl 200mg

DW で 100ml に、AC 後常温保存

2 . 細胞選別 (RNAlater、遠心器を 4C に冷却しておく)

検体の処理には 1ml のピペットを使用する。遠心器を冷却しておく。

540 μ l の検体をセルストレイナー (BD Falcon, No. 352235 35 μ メッシュ) に移す。

500rpm/4C/1min (液が落ちない時はピペットで懸濁してもう一度遠心)

残りの検体をセルストレイナーに移す。500rpm/4C/1min

下のチューブを新しいものに入れかえる。400 μ l D sol を加える

3000rpm/4C/1min ろ過されたものを 1.5ml チューブに移す。

*D sol

Guanidine Thiocyanate(GT) 47.3g

Sodium-N-Dodecanoylsalcosinate(Sarcocyl) 500mg

1M Sodium Citrate (pH7.0) 2.5ml

GT と Sarcocyl に DEPC-DW を加えおよそ 95ml にする。65C に温めながら溶かす。

1M Sodium Citrate (pH7.0) を加える

DW で 100ml とする。乾熱したピンに入れる。使用時に 1ml あたり 7 μ l の 2-mercaptoethanol を加える。

3 . RNA 抽出

*ヒートブロックを 60C に暖めておく

40 μ l 2M sodium acetate(pH4.0) を加える, 転倒混和

400 μ l 水飽和フェノールを加える, vortex 5 sec, 室温 3 分

160 μ l クロロフォルム-IAA(RNA 用) vortex 5 sec, 室温 3 分

14000rpm/3min 室温, 上清を 400 μ l 取る

2 μ l glycogen(20mg/ml) 400 μ l isopropanol を加える, vortex

30 分 4C 14000rpm/15 min/4C 転倒で上清を捨てる

沈澱に 900 μ l の 70%エタノールを加える, 軽く vortex, 14000rpm/1min/4C

転倒で上清を捨てる スピンドウン ピペットで上清を完全に除く

60C きっちり 1min 4.5 μ l の tRNA 液を加える トントンと下に落として vortex 3 秒

スピンドウン、60C 5min 4C 急冷, vortex 3 秒 スピンドウン

組織からの RNA はサンプル 100ng (0.5 μ l) に DW3.5 μ l を加える。

* tRNA 液 (20ng/ μ l)

DEPC-DW 2ml に tRNA 原液 (シグマ 50mg/ml) 0.8 μ l を加える。2ml チューブで-20C 保存

4. 逆転写

(1 本あたり)

DW	0.4
x5 First Strand Buffer	2
dNTP (2.5mM)	2
0.1M DTT	1
Random Hexamer (200 μ M) (Takara)	0.25
RNase Inhibitor(130U/ μ l) (Takara)	0.1
MMLV-RTase (200U/ μ l) (Invitrogen)	0.25
	<hr/>
	計 6 μ l

0.2 ml tube に分注 RNA 液 4 μ l 加える スピンドウン

25C 10 min 42 C 50 min 70C 15 min 4C スピンドウンする

TE30 μ l 加える cDNA は-20C 保存

T/G 比 測 定

* TFF3、LGALS3 : 1 検体あたり

プラチナ定量 PCR ミックス (Invitrogen)	5 μ l
Primer F (50 μ M)	0.1 μ l (final 0.5 μ M)
Primer R (50 μ M)	0.1 μ l (final 0.5 μ M)
Taq Man Probe(7 μ M)	0.2 μ l (final 140nM)
DW	0.6 μ l
	6 μ l

cDNA 液またはコントロール 4 μ l 加え 2 重解析する。

* thyrogobulin、CD45 : 1 検体あたり

プラチナ定量 PCR ミックス (Invitrogen)	2.5 μ l
Primer F (50 μ M)	0.05 μ l (final 0.5 μ M)
Primer R (50 μ M)	0.05 μ l (final 0.5 μ M)
Taq Man Probe(7 μ M)	0.1 μ l (final 140nM)
DW	0.3 μ l
	3 μ l

cDNA 液またはコントロール 2 μ l 加え 2 重解析する。

50C 2min 95C 2min

95C 15sec 60C 1min 40 cycles

定量用プライマー & プローブ

プライマーはカラム精製で 50 μ M、プローブは HPLC 精製で 7 μ M に調整

TFF3 (GenBank NM003226),

TFF3F1: 5'-ATCCCTGGAGTGCCTTGGT -3' (base 409 - 427)

TFF3R1: 5'-ACAGTGCCTGGCAGCAATC -3' (base 544 - 526)

TFF3B: 5'-FAM-TGAGGCACCTCCAGCTGCCC-TAMRA-3' (base 463-482)

TFF3F1

401 actccaggat ccctggagtg ccttgggtggt tcaagcccct gcaggaagca gaatgcacct

TFF3B→

461 tctgaggcac ctcacagtgc ccctggcccgg gggatgcgag gctcggagca cccttgcccg

TFF3R1

521 gctgtgattg ctgccaggca ctgttcacct

LGALS3 (GenBank NM002306)

G3F: 5'-CTTATAACCTGCCTTTGCCTGG -3' (base 368-389)

G3R: 5'-GCAACATCATTCCCTCTTTGGA -3' (base 464-485)

G3-TM: 5'-FAM-AGTGGTGCCTCGCATGCTGATAACAA-TAMRA-3'(base 393-418)

G3F

G3→

361 attgtgcctt ataacctgcc ttgcctggg gtagtggtgc ctgcctgct gataacaatt

G3R

421 ctgggcacgg tgaagcccaa tgcaaacaga attgctttag attccaaag agggaatgat

481 gttgcttcc acttaacct acgctcaat gagaacaaca ggagagtcat tgtttgcaat

thyroglobulin (TG, GenBank NM003235)

TGF: 5'-CTGCTGGCTCCACCTTGTTT-3' (base 2071-2090)

TGR: 5'-CAGGGCGTGGGGCATTCTT-3' (base 2230-2211)

TG-TM: 5'-FAM-CACTTCGAGTTCCAGGAATGGCCTGACCCT -TAMRA-3' (2196-2167)

TGF

2041 ctgcatgca aagcctcatg ggcagccagc ctgctggctc caccttgttt gtcctgctt

2101 gtactagtga gggacatttc ctgcctgtcc agtgcttcaa ctgagatgc tactgtgtg

←TG-TM TGR

2161 atgctgaggg tcaggccatt cctggaactc gaagtgcaat agggaagccc aagaaatgcc

2221 ccacgccctgtcaattacag tctgagcaag ctttctcag gacggtgcag gcctgtctt

CD45 (PTPRC, GenBank Y00062)

CD45F: 5'-ATCATAAACTGTGTGCAGACTCAA-3' (base 3997-4020)

CD45R: 5'-CACACATAACCTTTATGTA CTACTATCTC-3' (base 4139-4112)

CD45-TM: 5'-FAM-TGACCTCAAGATGTCCTCCTTGTTCTA CTCA -TAMRA-3'

CD45F

3961 aagtgttaac ttagcttgaa ggatctgttt ttaaaaatca taaactgtgt gcagactcaa

CD45→

4021 taaaatcatg tacatttctg aatgacctc aagatgtcct ccttgttcta ctcatatata

CD45R

4081 tctatcttat atacttacta ttttacttct agagatagta cataaagggtg gtatgtgtgt