

Agencourt RNAdvance Tissue

クイックマニュアル



本クイックマニュアルは簡易版です。使用前には、正式なマニュアル(英文)を必ずご一読ください。

Introduction

ベックマン・コールターのスリッドフェーズリバーシブル固定化 (SPRI) 磁性ビーズ技術により、組織からの total RNA 抽出に対応します。本プロトコルでは、96 ウェルプレートまたは 2 mL チューブを用いた組織のホモジネーション・溶解からの total RNA 抽出方法を解説します。

保存方法

Lysis Buffer	室温保存
Bind Buffer	4°C保存
Wash Buffer	室温保存
PK Buffer	室温保存
Proteinase K	-20°C保存

本マニュアルの対応製品

- A32645 RNAdvance Tissue 50 preps
- A32649 RNAdvance Tissue 96 preps
- A32646 RNAdvance Tissue 384 preps

Material Supplied by the User

96 ウェル反応プレートの場合

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルブロック

上のプレート用のシールキャップ

A32782 Agencourt SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate

マイクロチューブの場合

1.5 mL または 1.7 mL マイクロチューブ

A29182 Agencourt SPRIStand 6 Position Tube Magnet

サンプル溶解用チューブ

15 mL または 50 mL コニカルチューブ

試薬

100%イソプロパノール

70%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

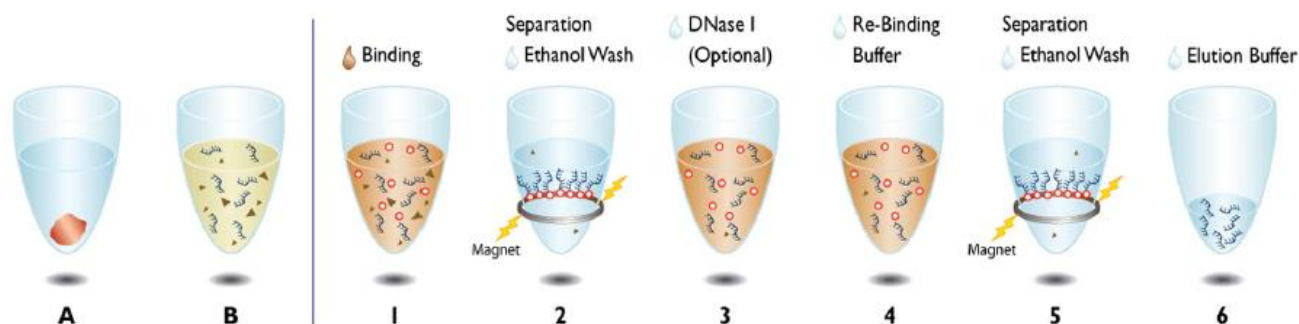
DNase I (RNase フリー; 2 U/ μ L)、DNase I Buffer

ヌクレアーゼフリー水

RNase フリー条件での実験について

RNAdvance Tissue は RNase フリーにて製造されており、試薬製品にヌクレアーゼの混入がないことを確認しています。本試薬のご使用時は、サンプルへの RNase 混入を防ぐ対策を十分に取った上で、実験を行うことをお勧めします。

Quick Reference (96 ウェル反応プレートの場合)



- A. 組織サンプル 10 mg に Lysis Buffer 溶液 400 μ L を加え、十分にホモジナイズ。
- B. 反応プレートにホモジナイズしたサンプルを入れ、37°Cで 25 分間反応。
1. 反応プレートに Bind Buffer 溶液 400 μ L を加え、ピペッティング 5 回により混合し、室温で 5 分間静置。
2. 反応プレートを磁気プレート上で 6 分間静置し、上清を除去。反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash Buffer 溶液 700 μ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁。反応プレートを磁気プレート上で 5 分間静置し、上清を除去。反応プレートを磁気プレートから下ろし 70%エタノール 800 μ L を加え、ピペッティング 4 回により穏やかに混合。反応プレートを磁気プレート上で 5 分間静置し、上清を除去。
3. (DNase 処理を行う場合のみ) 反応プレートを磁気プレートから下ろし、DNase I 溶液 100 μ L を加え室温で 1 分間静置。ピペッティング 5 回により再懸濁した後、37°Cで 15 分間反応。
4. (DNase 処理を行う場合のみ) 反応プレートに Wash Buffer 溶液 550 μ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁し、室温で 4 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 7 分間静置し、上清を除去。
5. (DNase 処理を行わなかった場合は、ここから) 反応プレートに 70%エタノール 600 μ L を加え 2 分間静置し、上清を除去。再度 70%エタノール洗浄を繰り返し、反応プレートを 10 分間風乾。
6. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁し、室温で 2 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置後、溶出 RNA を含む上清を新しい保存用プレートに移す。

Purification Procedure

1. Proteinase K 溶液を調製します。

Proteinase K のボトルに、PK Buffer を 50 preps の場合は 1.2 mL、96 preps の場合は 2.3 mL、384 preps の場合は 8.4 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、-20°Cで保存します。

2. Wash Buffer 溶液を調製します。

Wash Buffer のボトルに、100%イソプロパノールを 50 preps の場合は 40 ml、96 preps の場合は 62 ml、384 preps の場合は 250 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、室温で保存します。

3. Lysis Buffer 溶液を用時調製 (使用 10 分前以内) します。

1 サンプルあたり、Proteinase K 溶液 20 μ L と Lysis Buffer 400 μ L を混合します。
合計 420 μ L になりますが、1 サンプルあたりの使用量は 400 μ L です。

4. Bind Buffer 溶液を用時調製します。

1 サンプルあたり、Bind Buffer 80 μ L と 100%イソプロパノール 320 μ L を混合します。

5. (オプション) DNase I 溶液を用時調製します。

1 サンプルあたり、1 \times DNase 溶液 100 μ L が必要です。ヌクレアーゼフリー水 80 μ L、10 \times DNase Buffer 10 μ L、DNase I 10 μ L を混合します。

6. 組織サンプル 10 mg にステップ 3 で調製した Lysis Buffer 溶液 400 μ L を加え、十分にホモジナイズします。

7. 反応プレートにホモジナイズしたサンプルを入れ、シールキャップで封をします。1.7 mL マイクロチューブの場合には、サンプルをチューブに入れてキャップを閉めます。

8. 反応プレート・チューブを、37°Cで 25 分間反応します。

以降のステップをすぐに行わない場合、反応プレート・チューブを-80°Cで保存できます。

9. ステップ 4 で調製した Bind Buffer 溶液を十分に攪拌してから、反応プレート・チューブに Bind Buffer 400 μ L を加え、泡立てないようにゆっくりとピペティング 5 回により混合します。その後、室温で 5 分間静置します。
10. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 6 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
11. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
12. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンドから下ろし、ステップ 2 で調製した Wash Buffer 溶液 700 μ L を加え、泡立てないようにピペティング 10 回により再懸濁します。
13. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
14. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
15. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンドから下ろし 70%エタノール 800 μ L を加え、ピペティング 4 回により穏やかに混合します。
本ステップでは、磁性ビーズを完全に再懸濁する必要はありません。
16. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
17. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上に置いたままで、可能な限り上清を除去します。
エタノールが残っている場合、次のステップの DNase I 消化反応を阻害する可能性があります。
DNase 処理を行わない場合には、ステップ 23 に進んで下さい。

18. (オプション) 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンドから下ろし、DNase I 溶液 100 μ L を加えます。ピペッティングを行わず、室温で 1 分間静置します。
磁性ビーズから核酸が溶出します。
19. 磁性ビーズを、ピペッティング 5 回により再懸濁します。
20. 反応プレート・チューブに封をして、37°C で 15 分間反応します。
21. 反応プレート・チューブに Wash Buffer 溶液 550 μ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁し、室温で 4 分間静置します。
Wash Buffer 溶液により、磁性ビーズに RNA が再結合します。
22. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 7 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
23. 反応プレート・チューブに 70%エタノール 600 μ L を加えます。混合する必要はありません。
24. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 2 分間静置し、上清を除去します。
25. ステップ 23~24 の 70%エタノール洗浄を再度繰り返してください。
26. エタノールを可能な限り除去し、反応プレート・チューブを 10 分間風乾します。
磁性ビーズを完全に乾燥させる必要はありませんが、ウェル・チューブの壁に付いた水滴は乾燥させてください。
27. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンドから下ろし、ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加え、ピペッティング 10 回により磁性ビーズを十分に再懸濁し、室温で 2 分間静置により RNA を溶出します。

28. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で2分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。溶出 RNA を含む上清を、新しい保存用プレート・チューブに移します。



09-QMJ-161011

ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 ☎ 03-5530-2460
✉ bckkcas@beckman.com URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>

