

Agencourt RNAdvance Blood

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可逆的固定化 (SPRI) 磁性ビーズ技術により、PAXgene で保存された血液からの total RNA 抽出に対応します。本プロトコルでは PAXgene 保存の血液 400 μ L をサンプルとして、96 ウェルプレートまたは 2 mL チューブを用いた抽出方法を解説します。

保存方法

| | |
|--------------|----------|
| Lysis Buffer | 室温保存 |
| Bind 1 | 室温保存 |
| Bind 2 | 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

A35603 RNAdvance Blood 50 preps

A35604 RNAdvance Blood 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

96 ウェル 2.2 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

2mL チューブの場合

2.2 mL マイクロチューブ

A29182 Agencourt SPRISand 6 Position Tube Magnet

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)

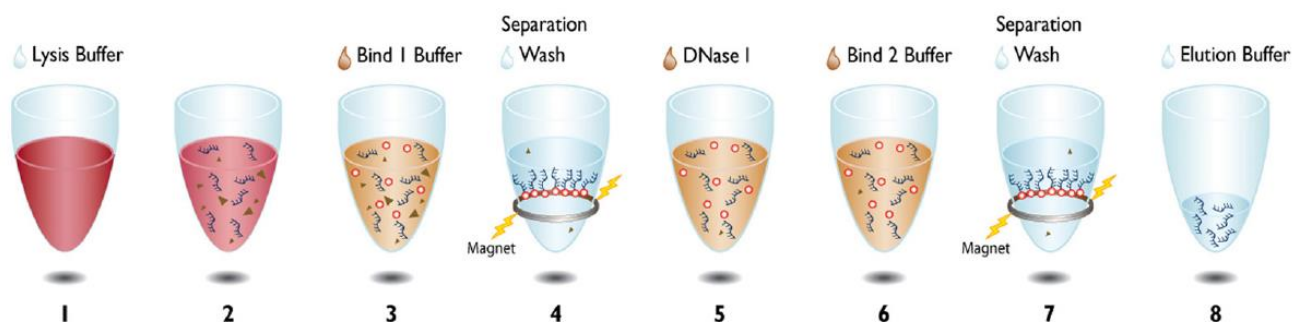
DNase I (RNase フリー; 2 U/ μ L)、DNase I Buffer

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 Blood 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)



1. PAXgene 血液 400 μL 、Proteinase K 溶液 20 μL 、Lysis Buffer 300 μL をピペッティング 10 回により混合。
2. 55°C で 15 分間反応し、その後室温で 2 分間静置。
3. Bind 1-イソプロパノール溶液 410 μL を加え、ピペッティング 10 回により混合し、室温で 5 分間静置。
4. 磁気プレート上で 10 分間静置後、上清を除去。磁気プレートから下ろし、Wash Buffer 溶液 800 μL を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁したのち溶液を新しい反応プレートに移す。磁気プレート上で 7 分間静置し、上清を除去。磁気プレートから下ろし、70%エタノール 800 μL を加え、ピペッティング 5 回により磁性ビーズを再懸濁。磁気プレート上で 3 分間静置後に上清を除去し、室温で 5 分間磁性ビーズを風乾。
5. 磁気プレートから下ろし、DNase I 溶液 100 μL を加え、ピペッティング 5 回で再懸濁後、37°C で 15 分間反応。
6. Bind 2 200 μL を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁し、室温で 5 分間反応。
7. 磁気プレート上で 5 分間静置し、上清を除去。70%エタノール 800 μL を加え、1 分間静置後、上清を除去。この 70%エタノール洗浄を再度繰り返す。室温で 10 分間磁性ビーズを風乾。
8. 磁気プレートから下ろし、ヌクレアーゼフリー水 20 μL を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁し、室温で 2 分間静置により RNA を溶出。磁気プレート上で 2 分間静置し、溶出 RNA を保存用プレートに移す。

Reagent Preparation

1. Proteinase K 50 mg/mL 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、384 preps の場合は 10 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 30 ml、384 preps の場合は 225 mL 加え、混合します。調製後の溶液は、室温で保存します。

3. Bind 1-イソプロパノール溶液を用時調製します。

1 サンプルあたり、Bind 1-イソプロパノール溶液が 410 μ L が必要です。Bind 1 のボトルを少なくとも 30 秒間ボルテックスし、再懸濁します。Bind 1 10 μ L に 100%イソプロパノールを 400 μ L を加え、混合します。

4. 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 85 μ L、10 \times DNase Buffer 10 μ L、DNase I 5 μ L を混合します。

Purification Procedure

96 ウェル反応プレートでの実験手順

PAXgene チューブを室温で解凍します。キャップをしっかり閉め、転倒混和かボルテックスで十分に攪拌します。

1. PAXgene で保存された血液 400 μ L を、2.2 mL ウェルサイズの反応プレートに入れます。
2. Proteinase K (50 mg/mL) 溶液 20 μ L と Lysis Buffer 300 μ L を加え、ピペッティング 10 回により混合します。
3. 反応プレートをシールキャップで封をして、55°C で 15 分間反応し、その後室温で 2 分間静置します。
4. Bind 1-イソプロパノール溶液 410 μ L を加え、ピペッティング 10 回により混合し、室温で 5 分間静置します。
Bind 1-イソプロパノール溶液は、使用直前に十分に混和してください。
5. 反応プレートを磁気プレート上で 10 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
6. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
上清が透明でない場合には、ウェル端に沿って 200~250 μ L 残すように上清を慎重に除去します。次にウェル底の中心部にチップを差し入れて、リング状の磁性ビーズが見えるまで、残りの上清を除去します。
7. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash Buffer 溶液 800 μ L を加えます。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ます。
8. 磁性ビーズを含むウェル溶液を全て、1.2 mL ウェルサイズの新しい反応プレートに移します。

9. 反応プレート[®]を磁気プレート[®]上で 7 分間静置し、溶液中のビーズを分離します。
10. 反応プレート[®]を磁気プレート[®]上に置いたままで、上清を除去します。
11. 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 を加えます。ピペッティング 5 回により磁性ビーズを再懸濁します。
12. 反応プレート[®]を磁気プレート[®]上で 3 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
13. 反応プレート[®]を磁気プレート[®]上に置いたままで、上清を完全に除去し、室温で 5 分間磁性ビーズを風乾します。
70%エタノールが 5 μ L 以上残留した場合には、下記の DNase I 反応を阻害する場合があります。
14. 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 を加えます。ピペッティング 5 回により磁性ビーズを泡立てないように再懸濁します。
15. 反応プレート[®]をシールキャップ[®]で封をして、37°C で 15 分間反応します。
16. Bind 2 200 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 5 分間反応します。
17. 反応プレート[®]を磁気プレート[®]上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
18. 反応プレート[®]を磁気プレート[®]上に置いたままで、上清を除去します。70%エタノール 800 μ L を加え、ピペッティングによる再懸濁を行わずに 1 分間静置し、上清を除去します。
19. ステップ 18 の 70%エタノール洗浄を再度繰り返してください。
20. 室温で 10 分間磁性ビーズを風乾します。

磁性ビーズを完全に乾燥させる必要はありませんが、ウェル壁に付いた水滴は乾燥させてください。

21. 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 20 μL を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁し、室温で 2 分間静置により RNA を溶出します。溶出量 20 μL で、平均 20~50 ng/ μL 濃度の RNA が得られます。

22. 反応プレートを磁気プレート上で 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に移します。



2 mL チューブでの実験手順

PAXgene チューブを室温で解凍します。キャップをしっかりと閉め、転倒混和かボルテックスで十分に攪拌します。

1. PAXgene で保存された血液 400 μ L を、2 mL マイクロチューブに入れます。
2. Proteinase K (50 mg/mL) 溶液 20 μ L と Lysis Buffer 300 μ L を加え、ピペッティング 10 回により混合します。
3. チューブのキャップを閉めて、55°C で 15 分間反応し、その後室温で 2 分間静置します。
4. Bind 1-イソプロパノール溶液 410 μ L を加え、ボルテックスにより混合し、室温で 5 分間静置します。
Bind 1-イソプロパノール溶液は、使用直前に十分に混和してください。
5. チューブを磁気スタンド上で 10 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
6. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。
上清が透明でない場合には、磁性ビーズと反対側にチップを差し入れて、上清を慎重に除去します。
7. チューブを磁気スタンドから下ろし、Wash Buffer 溶液 800 μ L を加えます。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ます。
8. 磁性ビーズを含むウェル溶液を全て、新しい 2 mL チューブに移します。
9. チューブを磁気スタンド上で 5 分間静置し、溶液中のビーズを分離します。
10. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を除去します。

11. チューブを磁気スタンドから下ろし、70%エタノール 800 μ L を加え、1 分間静置します。チューブを磁気スタンドに戻し、磁性ビーズを分離後に上清を除去します。
12. チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を完全に除去し、室温で 5 分間磁性ビーズを風乾します。
70%エタノールが 5 μ L 以上残留した場合には、下記の DNase I 反応を阻害する場合があります。
13. チューブを磁気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 5 回により磁性ビーズを泡立てないように再懸濁します。
14. チューブのキャップを閉め、37°C で 15 分間反応します。
15. Bind 2 200 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 5 分間反応します。
16. 反応プレート[®]を磁気プレート[®]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[®]を磁気プレート[®]上に置いたままで、上清を除去します。70%エタノール 800 μ L を加え、ピペッティングによる再懸濁を行わずに 1 分間静置し、上清を除去します。
18. ステップ 18 の 70%エタノール洗浄を再度繰り返してください。
19. 室温で 10 分間磁性ビーズを風乾します。
磁性ビーズを完全に乾燥させる必要はありませんが、ウェル壁に付いた水滴は乾燥させてください。
20. チューブを磁気スタンドから下ろし、ヌクレアーゼフリー水 20 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。溶出量 20 μ L で、平均 20~50 ng/ μ L 濃度の RNA が得られます。

21. チューブを磁気スタンド上で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、新しいチューブに移します。



10-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
✉ bckkas@beckman.com 🌐 <http://www.beckmancoulter.co.jp>

