

Agencourt RNAdvance Cell v2 追加プロトコル 精製エクソソームからの miRNA と total RNA 抽出



本追加プロトコルは簡易版です。使用前には、正式な製品マニュアルと Supplemental Protocol (英文)を必ずご一読ください。

Material Supplied by the User

反応プレート/チューブ

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルプレート

例: ABGene #1127

1.7 ml マイクロチューブ

例: Fisher Scientific, NC9448938

磁気プレート/スタンド

A32782 SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate

A29182 Agencourt SPRIstand 6 Position Tube Magnet

試薬

100%イソプロパノール

85%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

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 96 preps の場合は 400 μ L、960 preps の場合は 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。

miRNA と total RNA を精製する場合：

Wash Buffer と 100%イソプロパノールを 1 : 2 の割合で混合し、ボルテックスで 10 秒間撹拌します。調製後の溶液は、室温で保存します。

Total RNA のみを精製する場合：

Wash Buffer と 100%イソプロパノールを 3 : 2 の割合で混合し、ボルテックスで 10 秒間撹拌します。調製後の溶液は、室温で保存します。

3. 85%エタノールを用時調製します。

ヌクレアーゼフリー水を使用して調製してください。

4. Bind Buffer 溶液を用時調製します。

Bind Buffer のボトルをボルテックスで少なくとも 30 秒間撹拌し、磁性ビーズを再懸濁します。1 サンプルあたり、Bind Buffer 溶液 330 μ L が必要です。Bind Buffer 80 μ L と 100%イソプロパノール 250 μ L を十分に混合します。

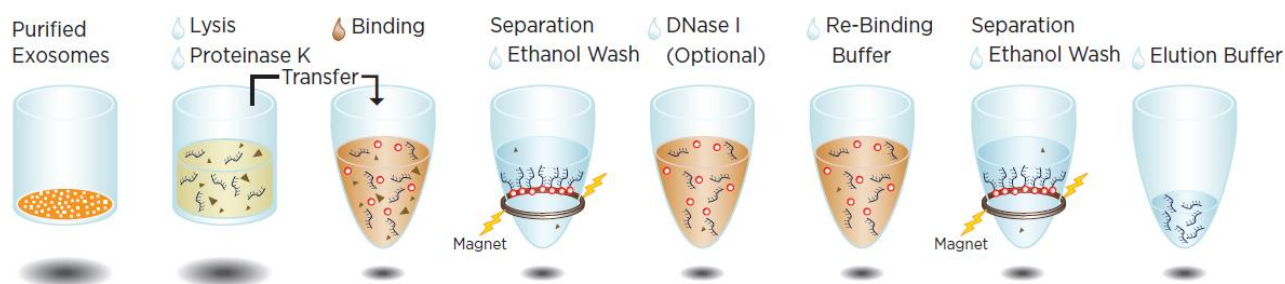
5. (オプション) DNase I 溶液を用時調製します。

1 サンプルあたり、1 \times DNase 溶液 25 μ L が必要です。ヌクレアーゼフリー水 20 μ L、10 \times DNase Buffer 2.5 μ L、DNase I 2.5 μ L を混合します。

6. Lysis/PK 溶液を、使用 30 分前以内に調製します。

1 サンプルあたり、Lysis/PK 溶液 63 μ L が必要です。Proteinase K (50 mg/ml) 3 μ L と Lysis Buffer 60 μ L を泡立てないように混合します。

Purification Procedure



1. 精製エクソソームサンプル 10~50 μL に Lysis/PK 溶液 63 μL (Reagent Preparation ステップ 6) を加え、穏やかにピペッティング 10 回により再懸濁します。
2. サンプルを室温で 30 分間反応し、エクソソームを完全に溶解・消化します。
3. Bind Buffer 溶液 (Reagent Preparation ステップ 4) を攪拌し、磁性ビーズを再懸濁します。サンプルに Bind Buffer 溶液 330 μL を加え、ピペッティング 10 回により混合します。
4. サンプルを室温で 5 分間反応し、核酸を磁性ビーズに結合します。
5. サンプルを磁気上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。サンプルを磁気上に置いたままで、上清を除去します。
6. サンプルを磁気から下ろし、Wash Buffer 溶液 300 μL (Reagent Preparation ステップ 2) を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁します。
7. サンプルを磁気上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。サンプルを磁気上に置いたままで、上清を除去します。
8. サンプルを磁気から下ろし、85%エタノール 300 μL を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁します。

9. サンプルを磁気上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。サンプルを磁気上に置いたままで、上清を除去します。このとき、エタノールは可能な限り除去するようにします。エタノールが残っている場合、次のステップの DNase 消化反応を阻害する可能性があります。
10. DNase 処理 (オプション) を行わない場合は、ステップ 19 に進みます。
11. サンプルを磁気から下ろし、DNase I 溶液 (Reagent Preparation ステップ 5) 25 μ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁します。
磁性ビーズから核酸が溶出します。
12. サンプルを室温で 15 分間反応し、DNA を消化します。
13. サンプルに Wash Buffer 溶液 138 μ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁します。
Wash Buffer 溶液により、磁性ビーズに RNA が再結合します。
14. サンプルを室温で 5 分間反応し、RNA を磁性ビーズに結合します。
15. サンプルを磁気上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。サンプルを磁気上に置いたままで、上清を除去します。
16. サンプルを磁気から下ろし、85%エタノール 300 μ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁します。
17. サンプルを磁気上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。サンプルを磁気上に置いたままで、上清を除去します。
18. ステップ 16~17 の 85%エタノール洗浄を再度繰り返してください。
19. エタノールを可能な限り除去し、磁気上で反応プレートを 3~5 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。

20. サンプルを磁気から下ろし、ヌクレアーゼフリー水 25~40 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 5 分間静置により RNA を溶出します。

21. サンプルを磁気上で 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またはチューブに移します。



180713_SUP-JP_RNAdvanceCellv2_Exosome-miRNA_15

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 URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>