

Agencourt RNAdvance Cell v2 追加プロトコル 培養細胞からの 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

培養プレート

300 μ L 平底培養プレート

例: Fisher Scientific product # 07-200-98

反応プレート

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルブロック

例: Thermo Scientific product # AB-1127

300 μ L 平底培養プレート

例: Costar 3797: Fisher Scientific product # 07-200-105

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

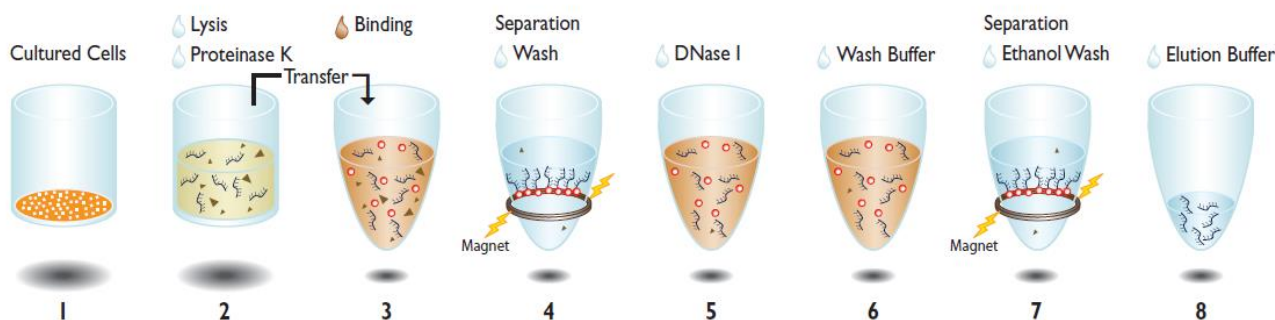
100%イソプロパノール

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

Purification Procedure



RNAdvance v2 は、1 サンプルあたり 200~50,000 個の細胞からの total RNA 抽出に対応します。1 サンプルあたり 50,000~200 万個の細胞を扱う場合には、当社製品 RNAdvance Tissue をご使用下さい。

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. 以下の試薬については、用事調製します。

Wash Buffer 溶液

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 5 秒間攪拌します。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 3.75 : 1 の割合で混合し、ボルテックスで 5 秒間攪拌します。調製後の溶液は、室温で保存します。

85%エタノール

ヌクレアーゼフリー水を使用して調製してください。

Bind Buffer 溶液

Bind Buffer のボトルを攪拌し、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 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。

Lysis/PK 溶液 (使用 30 分前以内に調製)

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。

DNase I 溶液 (オプション)

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。

3. 培養プレートから、ピペッティングにより可能な限り培地を除去します。
4. 培養プレートにステップ 2 で調製した Lysis/PK 溶液 63 μ L を加え、穏やかにピペッティング 20 回により再懸濁します。
5. 培養プレートを室温で 30 分間反応し、細胞を完全に溶解・消化します。
以降のステップをすぐに行わない場合、培養プレートを-80 $^{\circ}$ Cで保存できます。
6. 培養プレートの全ての内容物を、反応プレートに移します。
7. ステップ 2 で調製した Bind Buffer 溶液を十分に攪拌し、磁性ビーズとイソプロパノールを再懸濁します。サンプルに Bind Buffer 溶液 330 μ L を加え、ピペッティング 10 回により混合します。
8. 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。
9. サンプルを磁気上で 5 分間または溶液が透明になるまで静置し、上清を除去します。
10. サンプルを磁気から下ろし、ステップ 2 で調製した Wash Buffer 溶液 300 μ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁します。
11. サンプルを磁気上で 5 分間または溶液が透明になるまで静置し、上清を除去します。

12. 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 回以上により完全に再懸濁します。
13. サンプルを磁気上で 5 分間静置または溶液が透明になるまで静置し、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。
DNase 処理 (オプション) を行わない場合は、ステップ 21 に進みます。
14. サンプルを磁気から下ろし、ステップ 2 で調製した DNase I 溶液 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。
15. サンプルを室温で 15 分間反応し、DNA を消化します。
16. サンプルに Wash Buffer 溶液 165 μ L を加え、ピペッティング 5 回以上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。
17. 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。
18. サンプルを磁気上で 5 分間または溶液が透明になるまで静置し、上清を除去します。
19. 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 回以上により再懸濁します。
20. サンプルを磁気上で 5 分間または溶液が透明になるまで静置し、上清を除去します。
21. ステップ 19~20 の 85%エタノール洗浄を再度繰り返してください。

22. 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 10 分間風乾します。
ウェル/チューブの壁に付いた水滴は完全に除去してください。
23. サンプルを磁気から下ろし、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 5 分間静置により RNA を溶出します。
24. 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_miRNA_13

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>

