

FormaPure RNA

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固定化 (SPRI) 磁性ビーズ技術により、ホルマリン固定パラフィン埋め込み (FFPE) 組織 10 µm 切片 3 枚までのキシレンフリーの RNA 抽出に対応します。本プロトコルでは、FFPE サンプルのパラフィン溶解、脱クロスリンク、組織溶解から、96 ウェルプレートおよびマイクロチューブを用いた RNA の抽出方法を解説します。

適用アプリケーション

次世代シーケンシング (RNA-Seq 解析)、通常のエンドポイント RT-PCR、qRT-PCR

保存方法

Mineral Oil (MO)	室温保存
Lysis LBA	室温保存
Bind BBA	室温保存
Re-Bind RBA	室温保存
Proteinase K	室温保存

本マニュアルの対応製品

C19157 FormaPure RNA 50 preps

C19158 FormaPure RNA 96 preps

Material Supplied by the User

96 ウェル反応プレートを使用する場合

1.2 mL 96 ウェルプレート

例: Thermo Fisher Scientific, AB1127

200 μ L 96 ウェル保存用プレート

プレート用のシール

1.5 mL マイクロチューブ

チューブ用のキャップロック

V&P Scientific 7 Bar Magnet, VP 771MWZM-1ALT

チューブを使用する場合

1.5 mL マイクロチューブ

チューブ用のキャップロック

Beckman Coulter SPRISand 6 Position Tube Magnet, A29182

試薬

80%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)、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

FormaPure RNA 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



1. FFPE 組織切片サンプルを 1.5 mL チューブに入れる。
チューブに Mineral Oil 450 μL を加え、80°C で、5 分間反応。
ボルテックス 5 秒間 2 回で攪拌。
2. チューブに Lysis LBA 200 μL を加え、10,000 $\times g$ 15 秒間で遠心分離。
水層に Proteinase K 20 μL を加え、ピペッティング 10 回により混合し、60°C で 2 時間反応。
3. 10,000 $\times g$ 5 分間で遠心分離し、水層の上清を新しいプレートまたはチューブに移す。
4. 反応プレート・チューブに Bind BBA 300 μL を加え、ピペッティング 10 回により混合。
室温で 5 分間静置後、磁気プレート・スタンド上で 10 分間静置。
磁気プレート・スタンド上に置いたままで、上清を除去。
5. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろす。
80%エタノール 750 μL を加え、ピペッティングで磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合。
磁気プレート・スタンド上で 3 分間静置し、上清を除去、さらに 10 分間風乾。
6. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろす。
ヌクレアーゼフリー水 80 μL 、10 \times DNase I Buffer 10 μL 、DNase I 10 μL を加え、ピペッティング 10 回により混合し、37°C で 20 分間反応。
7. 反応プレート・チューブに Re-Bind RBA 150 μL を加え、ピペッティング 10 回により混合。
室温で 5 分間静置後、磁気プレート・スタンド上で 10 分間静置。
磁気プレート・スタンド上に置いたままで、上清を除去。
8. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろす。
80%エタノール 750 μL を加え、ピペッティングで磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合。
磁気プレート・スタンド上で 3 分間静置し、上清を除去、さらに 10 分間風乾。
9. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろす。
ヌクレアーゼフリー水 40 μL 以上を加え、ピペッティングで磁性ビーズが完全に再懸濁するま

で混合。

反応プレート・チューブに封をして、55°Cで1分間静置。

磁気プレート・スタンド上で1分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離。

溶出 RNA を含む上清を、新しい保存用プレート・チューブに移す。



Purification Procedure

1. サンプル調製

FFPE 組織切片サンプル (10 μm 切片 1~3 枚) を 1.5 mL チューブに入れます。

2. 脱パラフィン

- a. チューブに Mineral Oil 450 μL を加え、サンプルを液中に沈めます。
- b. 80°C で、5 分間反応します。
- c. ボルテックス 5 秒間 2 回で攪拌し、パラフィンを溶かし、サンプルを分散します。

3. 組織消化／脱クロスリンク

- a. チューブに Lysis LBA 200 μL を加えます。
- b. 10,000 $\times g$ 15 秒間で遠心分離し、油層 (上層) と水層 (下層) に分離します。
油層が濁った場合には 80°C で 3 分間以上追加反応し、その後少なくとも 2 分間は室温で冷却してください。
- c. 水層に Proteinase K 20 μL を加え、ピペッティング 10 回により混合します。
このときに、油層を乱さないようにします。
- d. 60°C で、2 時間反応します。

4. 組織溶解物の分離

- a. 10,000 $\times g$ 5 分間で遠心分離します。
- b. 水層の上清 (沈殿を除く) を、可能な限り反応プレートまたはチューブに移します。
このときに油層と沈殿を乱さないようにし、以降の反応系に持ち込まないようにします。
ピペットチップが詰まってしまう場合には追加で遠心分離をしてください。
微量の油層の持ち込みは、下流のアプリケーションに大きな影響を及ぼしません。

5. 結合

- a. Bind BBA のボトルを十分に攪拌し、磁性ビーズを完全に再懸濁します。
- b. 反応プレート・チューブに Bind BBA 300 μL を加え、ピペッティング (P1000 ピペットを 350 μL に設定) 10 回により、泡立てないように優しく混合します。
- c. 室温で、5 分間静置します。
- d. 反応プレート・チューブを磁気プレート・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。
- e. 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。

6. エタノール洗浄

- a. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろします。
- b. 80%エタノール 750 μ L を加えます。
- c. ピペッティング (P1000 ピペットを 600 μ L に設定) 20 回または磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合します。
- d. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 3 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- e. 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。
- f. マグネット上で 10 分間風乾します。

7. DNase I 処理

- a. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろします。
- b. ヌクレアーゼフリー水 80 μ L を加えます。
- c. 10 \times DNase I Buffer 10 μ L と DNase I 10 μ L を加えます。
- d. ピペッティング (P200 ピペットを 80 μ L に設定) 5 回により、泡立てないように優しく混合します。
- e. 反応プレートはシールを、反応チューブはキャップをして、37 $^{\circ}$ C で 20 分間反応します。

8. 再結合

- a. 反応プレート・チューブに Re-Bind RBA 150 μ L を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 150 μ L に設定) 10 回により、泡立てないように優しく混合します。
- b. 室温で、5 分間静置します。
- c. 反応プレート・チューブを磁気プレート・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。
- d. 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。

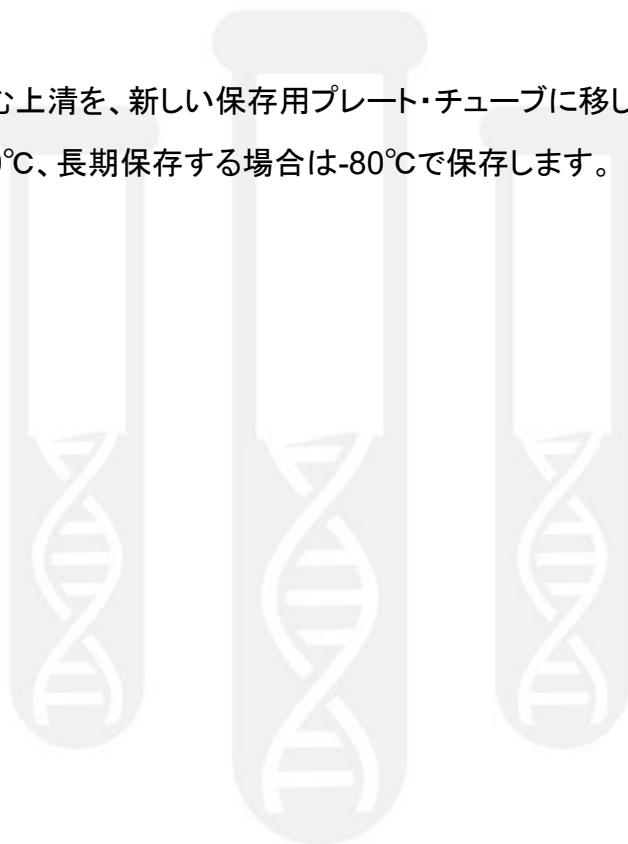
9. エタノール洗浄

- a. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろします。
- b. 80%エタノール 750 μ L を加えます。
- c. ピペッティング (P1000 ピペットを 600 μ L に設定) 20 回または磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合します。
- d. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 3 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。

- e. 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。
- f. マグネット上で 10 分間風乾します。

10. 溶出

- a. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上から下ろします。
- b. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L 以上を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 30 μ L に設定) 10 回または磁性ビーズが完全に再懸濁するまで混合します。
- c. 反応プレートはシールを、反応チューブはキャップをして、60°C で 1 分間静置します。
- d. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 1 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- e. 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。
- f. 精製 RNA は -20°C、長期保存する場合は -80°C で保存します。



210217_QMJ_FormaPureRNA

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>

