

RNAAdvance 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 Solid Phase Reversible Immobilization (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 LBF	室温保存
Bind BBD	常温保存
Re-Bind RBB	4°C 保存
Wash WBE	室温保存
Proteinase K	-20°C 保存
PK Buffer	室温保存

本マニュアルの対応製品

A35603 RNAAdvance Blood 50 preps

A35604 RNAAdvance Blood 384 preps

Material Supplied by the User

96 ウェル反応プレートの場合

1.2 mL 96 ウェルプレート

例: Thermo Fisher Scientific, AB-1127

2.2 mL 96 ウェルプレート

例: Thermo Fisher Scientific, AB-0661

プレート用のシール

例: Thermo Fisher Scientific, 0580

96 ウェル用マグネットプレート

例: Beckman Coulter SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate, A32782

例: ALPAQUA Magnum FLX™ Enhanced Universal Magnet Plate, A000400

2 mL チューブの場合

2.2 mL マイクロチューブ

例: Corning, MCT-200-L-C

マイクロチューブ用マグネットスタンド

例: Beckman Coulter SPRIStand 6 Position Tube Magnet, A29182

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)

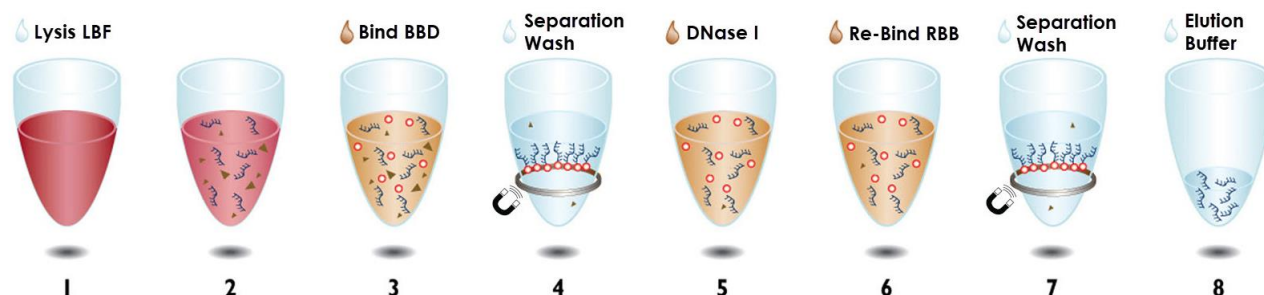
DNase I (RNase フリー; 2 U/μL)、DNase I Buffer

ヌクレアーゼフリー水

RNase フリー条件での実験について

RNAAdvance 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行った上で、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 μ L、Proteinase K 溶液 20 μ L、Lysis LBF 300 μ L 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 BBD-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。
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 WBE 溶液 800 μ L 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 μ L 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 μ L 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. Re-Bind RBB 200 μ L 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 μ L 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 μ L 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、ラベルに記載された容量加え、混合します。調製後の溶液は、-20°Cで保存します。

2. Wash WBE 溶液を調製します。

Wash WBE のボトルに 100%イソプロパノールを、Wash WBE : 100%イソプロパノール = 3 : 2 の割合で加え、混合します。調製後の溶液は、室温で保存します。

3. Bind BBD-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 BBD-イソプロパノール溶液が 410 μ L が必要です。Bind BBD 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 BBD 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× 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× 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 LBF 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 BBD-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 BBD-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 WBE 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. Re-Bind RBB 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 LBF 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 BBD-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 BBD-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 WBE 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. Re-Bind RBB 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. 反応プレートに磁気プレート上で 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。



230714_QMJ_RNAAdvanceBlood

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 FAX 03-5530-2460
✉ bckkcas@beckman.com URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>