FormaPure XL 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 Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI) 磁性ビーズ技術により、Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) 組織 10 µm 切片 7 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 LBD		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

C36000 FormaPure XL RNA 50 preps

C36001 FormaPure XL 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 µL 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

96 ウェル用マグネットプレート

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

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

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

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

80%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

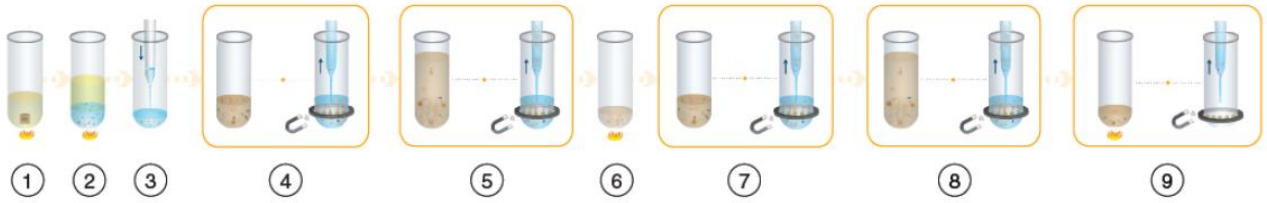
DNase I (RNase フリー)、DNase I Buffer

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℃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 LBD 200 µL を加え、10,000 ×*g* 15 秒間で遠心分離。
   80℃で 5 分間反応し、2 分間は室温で冷却。
   水層に Proteinase K 30 µL を加え、ピペッティング 10 回により混合し、60℃で 2 時間反応
3. 10,000 ×*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 80µL、10× DNase I Buffer 10µL、DNase I 10 µL を加え、ピペッティング 10 回により混合し、37℃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℃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 1~7 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℃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 LBD 200 µL を加えます。

   b. 10,000 ×*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。

   c. 80℃で 5 分間反応します。

   d. 室温で 2 分間冷却します。

   e. 水層に Proteinase K 30 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。

   f. 60℃で、2 時間反応します。

4. 組織溶解物の分離

   a. 10,000 ×*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 のボトルを十分に撹拌し、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 µL を加えます。

c. ピペッティング (P1000 ピペットを 600 µL 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 µL、10× DNase I Buffer 10µL、DNase I 10 µL を 5 回混合し、DNase I 溶液 100 µL を調製します。

c. DNase I 溶液 100 µL を磁性ビーズに加えます。

d. ピペッティング (P200 ピペットを 80 µL 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℃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 µL を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 150 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。

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 µL を加えます。

c. ピペッティング (P1000 ピペットを 600 µL 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 µL 以上を加え、ピペッティング (P200 ピペットを 30 µL 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℃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℃、長期保存する場合は-80℃で保存します。

230714_QMJ_FormaPureXLRNA

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
e-mail bckkcas@beckman.com　URL http://www.beckmancoulter.co.jp