

# Agencourt RNAdvance Cell v2

## 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リバーシブル固定化 (SPRI) 磁性ビーズ技術により、200~50,000 個の真核細胞 (セルラインおよび初代細胞) からの total RNA 抽出に対応します。本プロトコルでは、Proteinase K と Lysis Buffer による細胞の溶解、タンパク質の分解、RNase の不活化から、96 ウェルプレートを用いた total RNA 抽出方法を解説します。

### 保存方法

|                     |                |         |
|---------------------|----------------|---------|
| Lysis LBE           | (Lysis Buffer) | 室温保存    |
| Bind BBC            | (Bind Buffer)  | 4°C保存   |
| Wash WBD            | (Wash Buffer)  | 室温保存    |
| Proteinase K        |                | -20°C保存 |
| Proteinase K Buffer | (PK Buffer)    | 室温保存    |

### 本マニュアルの対応製品

A47942 RNAdvance Cell v2 96 preps

A47943 RNAdvance Cell v2 960 preps

## Material Supplied by the User

### 培養プレート

300  $\mu$ L 平底培養プレート

例: Thermo Fisher Scientific, 07-200-98 (Coster 9017)

### 反応プレート

96 ウェル 1.2 mL ディープウェルプレート

例: Thermo Fisher Scientific, AB-1127

### 磁気プレート

A32782 Agencourt SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate

### 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)

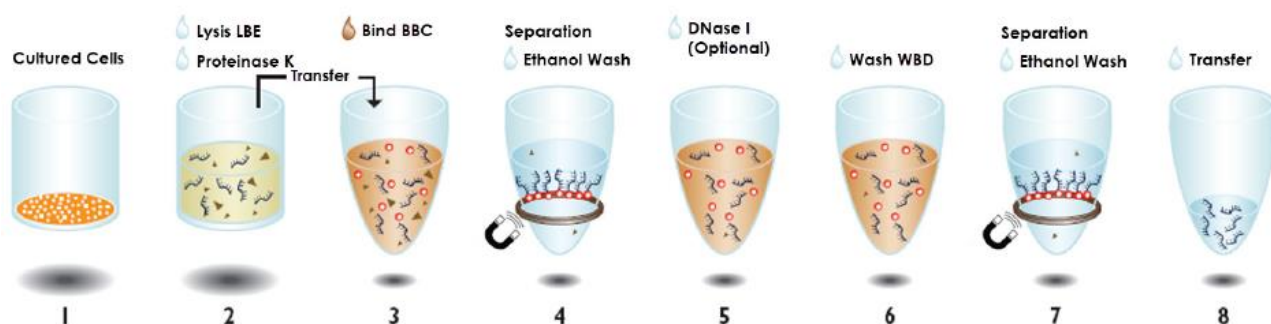
DNase I (RNase フリー; 2 U/ $\mu$ L)、DNase I Buffer

ヌクレアーゼフリー水

### RNase フリー条件での実験について

RNAdvance Cell v2 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 (96 ウェル反応プレートの場合)



1. 培養プレートから培地を除去。
2. 培養プレートに Lysis/PK 溶液 63  $\mu$ L を加え、ピペッティング 20 回により再懸濁。培養プレートを室温で 30 分間反応し、培養プレート内容物を反応プレートに移す。
3. 反応プレートに Bind BBC 溶液 175  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により混合し、室温で 5 分間反応。
4. 反応プレートを磁気プレート上で 5 分間静置し、上清を除去。反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash WBD 溶液 200  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁。反応プレートを磁気プレート上で 5 分間静置し、上清を除去。反応プレートを磁気プレートから下ろし、70%エタノール 200  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁。反応プレートを磁気プレート上で 5 分間静置し、上清を除去。
5. (オプション) 反応プレートを磁気プレートから下ろし、DNase I 溶液 25  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁。反応プレートを室温で 15 分間反応。
6. (オプション) 反応プレートに Wash WBD 溶液 138  $\mu$ L を加えピペッティング 5 回により再懸濁し、室温で 5 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 5 分間静置し、上清を除去。
7. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、70%エタノール 200  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁。反応プレートを磁気プレート上で 5 分間静置し、上清を除去。70%エタノール洗浄を再度繰り返した後、10 分間風乾。
8. 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 40  $\mu$ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁し、室温で 5 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 2 分間静置後、溶出 RNA を含む上清を新しい保存用プレートに移す。

## 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、Proteinase K Buffer (PK Buffer) を 96 preps の場合は 400  $\mu$ 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。

Wash WBD (Wash Buffer) 溶液を調製します。

Wash WBD (Wash Buffer) のボトルに、100%イソプロパノールを 96 preps の場合は 16 ml、960 preps の場合は 160 ml 加え、混合します (Wash WBD (Wash Buffer) と 100%イソプロパノールを、3 : 2 の割合で混合)。調製後の溶液は、室温で保存します。

### 2. 以下の試薬については、用時調製します。

70%エタノール

Bind BBC (Bind Buffer) 溶液: Bind BBC (Bind Buffer) のボトルを十分に攪拌し、磁性ビーズを再懸濁します。1 サンプルあたり、Bind BBC (Bind Buffer) 溶液 175  $\mu$ L が必要です。Bind BBC (Bind Buffer) 80  $\mu$ L と 100%イソプロパノール 95  $\mu$ L を混合します。

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  $\mu$ L が必要です。Proteinase K (50 mg/ml) 3  $\mu$ L と Lysis LBE (Lysis Buffer) 60  $\mu$ 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× DNase 溶液 25  $\mu$ L が必要です。ヌクレアーゼフリー水 20  $\mu$ L、10× DNase Buffer 2.5  $\mu$ L、DNase I 2.5  $\mu$ 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 $\mu$ 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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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 BBC (Bind Buffer) 溶液を攪拌し、磁性ビーズを再懸濁します。  
反応プレートに Bind BBC (Bind Buffer) 溶液 175  $\mu\text{L}$  を加え、ピペッティング 10 回により混合します。
8. 反応プレートを室温で 5 分間反応し、核酸を磁性ビーズに結合します。
9. 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。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。
10. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash WBD (Wash Buffer) 溶液 200  $\mu\text{L}$  を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁します。
11. 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。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。
12. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、70%エタノール 200  $\mu\text{L}$  を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁します。
13. 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。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。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 処理を行わない場合は、ステップ 19 に進みます。

14. (オプション) 反応プレート<sup>1</sup>を磁気プレートから下ろし、ステップ 2 で調製した DNase I 溶液 25  $\mu$ 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. 反応プレート<sup>1</sup>を室温で 15 分間反応し、DNA を消化します。
16. 反応プレート<sup>1</sup>・チューブに Wash WBD (Wash Buffer) 溶液 138  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁します。  
Wash WBD (Wash Buffer) 溶液により、磁性ビーズに RNA が再結合します。
17. 反応プレート<sup>1</sup>を室温で 5 分間反応し、RNA を磁性ビーズに結合します。
18. 反応プレート<sup>1</sup>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。反応プレート<sup>1</sup>を磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
19. 反応プレート<sup>1</sup>を磁気プレートから下ろし、70%エタノール 200  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁します。
20. 反応プレート<sup>1</sup>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。反応プレート<sup>1</sup>を磁気プレート上に置いたままで、上清を除去します。
21. ステップ 19~20 の 70%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、反応プレート<sup>1</sup>を 10 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、ウェルの壁に付いた水滴は乾燥させてください。
23. 反応プレート<sup>1</sup>を磁気プレートから下ろし、ヌクレアーゼフリー水 40  $\mu$ 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. 反応プレートが磁気プレート上で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またはチューブに移します。



190805\_QMJ\_RNAdvanceCellv2

## 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>

