

# RNAAdvance Tissue

## 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、組織からの total RNA 抽出に対応します。本プロトコルでは、96 ウェルプレートまたは 2 mL チューブを用いた組織のホモジネーション・溶解からの total RNA 抽出方法を解説します。

### 保存方法

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

### 本マニュアルの対応製品

A32645 RNAAdvance Tissue 50 preps

A32649 RNAAdvance Tissue 96 preps

A32646 RNAAdvance Tissue 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

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

### マイクロチューブの場合

1.5 mL または 1.7 mL マイクロチューブ

例: Thermo Fisher Scientific, 05-408-129

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

### サンプル溶解用チューブ

15 mL または 50 mL コニカルチューブ

### 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)

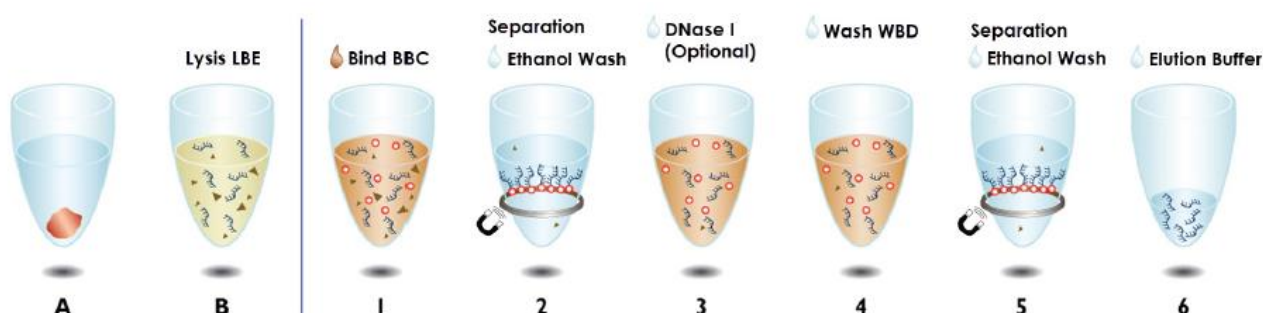
DNase I (RNase フリー; 2 U/μL)、DNase I Buffer

ヌクレアーゼフリー水

### RNase フリー条件での実験について

RNAdvance Tissue 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)

- A. 組織サンプル 10 mg に Lysis LBE 溶液 400  $\mu$ L を加え、十分にホモジナイズ。
- B. 反応プレートにホモジナイズしたサンプルを入れ、37°Cで 25 分間反応。
1. 反応プレートに Bind BBC 溶液 400  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により混合し、室温で 5 分間静置。
2. 反応プレートを磁気プレート上で 6 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 700  $\mu$ 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 800  $\mu$ L を加え、ピペッティング 4 回により穏やかに混合。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。
3. (DNase 処理を行う場合のみ) 反応プレートを磁気プレートから下ろし、DNase I 溶液 100  $\mu$ L を加え室温で 1 分間静置。ピペッティング 5 回により再懸濁した後、37°Cで 15 分間反応。
4. (DNase 処理を行う場合のみ) 反応プレートに Wash WBD 溶液 550  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁し、室温で 4 分間静置。反応プレートを磁気プレート上で 7 分間静置し、上清を除去。
5. (DNase 処理を行わなかった場合は、ここから) 反応プレートに 70%エタノール 600  $\mu$ L を加え 2 分間静置し、上清を除去。再度 70%エタノール洗浄を繰り返し、反応プレートを 10 分間風乾。
6. 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 2 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

**1. Proteinase K 溶液を調製します。**

Proteinase K のボトルに Proteinase K 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、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存します。

**2. Wash WBD 溶液を調製します。**

Wash WBD のボトルに 100%イソプロパノールを、Wash WBD : 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. Lysis LBE 溶液を用時調製 (使用 10 分前以内) します。**

1 サンプルあたり、Proteinase K 溶液 20  $\mu\text{L}$  と Lysis LBE 400  $\mu\text{L}$  を混合します。合計 420  $\mu\text{L}$  になりますが、1 サンプルあたりの使用量は 400  $\mu\text{L}$  です。

**4. Bind BBC 溶液を用時調製します。**

1 サンプルあたり、Bind BBC 80  $\mu\text{L}$  と 100%イソプロパノール 320  $\mu\text{L}$  を混合します。

**5. (オプション) DNase I 溶液を用時調製します。**

1 サンプルあたり、1 $\times$  DNase 溶液 100  $\mu\text{L}$  が必要です。ヌクレアーゼフリー水 80  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$  DNase Buffer 10  $\mu\text{L}$ 、DNase I 10  $\mu\text{L}$  を混合します。

**6. 組織サンプル 10 mg にステップ 3 で調製した Lysis LBE 溶液 400  $\mu\text{L}$  を加え、十分にホモジナイズします。**

**7. 反応プレートにホモジナイズしたサンプルを入れ、シールキャップで封をします。1.7 mL マイクロチューブの場合には、サンプルをチューブに入れてキャップを閉めます。**

**8. 反応プレート・チューブを、 $37^{\circ}\text{C}$ で 25 分間反応します。**

以降のステップをすぐに行わない場合、反応プレート・チューブを $-80^{\circ}\text{C}$ で保存できます。

9. ステップ 4 で調製した Bind BBC 溶液を十分に攪拌してから、反応プレート・チューブに Bind BBC 400  $\mu$ L を加え、泡立てないようにゆっくりとピペティング 5 回により混合します。その後、室温で 5 分間静置します。
10. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 6 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
11. 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。
12. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンドから下ろし、ステップ 2 で調製した Wash WBD 溶液 700  $\mu$ L を加え、泡立てないようにピペティング 10 回により再懸濁します。
13. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
14. 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。
15. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンドから下ろし 70%エタノール 800  $\mu$ L を加え、ピペティング 4 回により穏やかに混合します。  
本ステップでは、磁性ビーズを完全に再懸濁する必要はありません。
16. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 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・チューブを磁気プレート・スタンド上に置いたままで、可能な限り上清を除去します。  
エタノールが残っている場合、次のステップの DNase I 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には、ステップ 23 に進んで下さい。

18. (オプション) 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンドから下ろし、DNase I 溶液 100  $\mu$ L を加えます。ピペッティングを行わず、室温で 1 分間静置します。  
磁性ビーズから核酸が溶出します。
19. 磁性ビーズを、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・チューブに封をして、37°C で 15 分間反応します。
21. 反応プレート・チューブに Wash WBD 溶液 550  $\mu$ L を加え、ピペッティング 5 回により再懸濁し、室温で 4 分間静置します。  
Wash WBD 溶液により、磁性ビーズに RNA が再結合します。
22. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 7 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・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。
23. 反応プレート・チューブに 70%エタノール 600  $\mu$ L を加えます。混合する必要はありません。
24. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンド上で 2 分間静置し、上清を除去します。
25. ステップ 23~24 の 70%エタノール洗浄を再度繰り返してください。
26. エタノールを可能な限り除去し、反応プレート・チューブを 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・チューブの壁に付いた水滴は乾燥させてください。
27. 反応プレート・チューブを磁気プレート・スタンドから下ろし、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 2 分間静置により RNA を溶出します。

28. 反応プレート・チューブを磁気プレート・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、新しい保存用プレート・チューブに移します。



230714\_QMJ\_RNAdvanceTissue

## 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 🌐 <http://www.beckmancoulter.co.jp>