

RNAAdvance Viral

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、だ液、鼻咽頭スワブ、口腔咽頭スワブサンプルからの RNA 抽出に対応します。本プロトコルでは、だ液、またはウイルス輸送液 200 μ L をサンプルとして、タンパク質分解を含む溶解工程から始まる、96 ウェルプレートまたは 1.5 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	常温保存
Bind BBD	常温保存
Wash WBE	常温保存
Proteinase K	-20°C 保存
PK Buffer	常温保存

本マニュアルの対応製品

C63510 RNAAdvance Viral 768 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

1.5 mL チューブの場合

1.5 mL マイクロチューブ

例: Eppendorf, 022431021

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)

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 Viral 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. サンプル 200 μL 、Lysis LBF 150 μL 、Proteinase K 溶液 10 μL を加え、ピペッティング 10 回で混合。
2. 室温で 20 分間反応。
3. Bind BBD/イソプロパノール溶液 205 μL を加え、ピペッティング 10 回またはボルテックスにより混合し、室温で 5 分間静置。
4. 磁気上で 5 分間静置後、上清を除去。磁気から下ろし、Wash WBE 溶液 400 μL を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁したのち磁気上で 5 分間静置し、上清を除去。
5. 磁気上で、70%エタノール 400 μL を加え、磁気プレート上で 2 分間静置後に上清を除去。この 70%エタノール洗浄を再度繰り返す。室温で 1 分間磁性ビーズを風乾。
6. 磁気から下ろし、ヌクレアーゼフリー水 40 μL を加え、ピペッティング 10 回で再懸濁し、室温で 5 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。

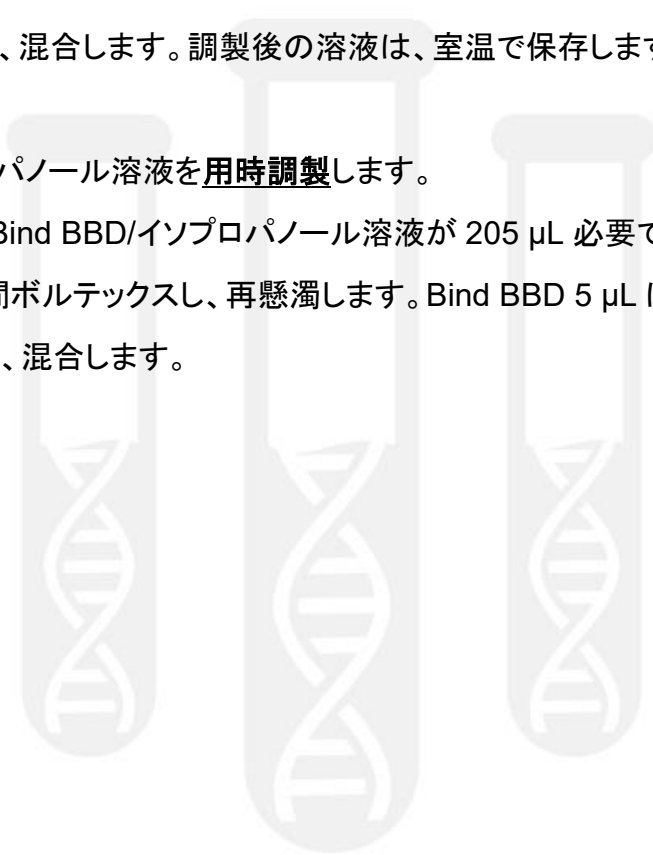
Proteinase K のボトルに PK Buffer を、ラベルに記載された容量加え、混合します。調製後の溶液は、-20°Cで保存します。

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 205 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 5 μ L に 100%イソプロパノールを 200 μ L を加え、混合します。



Purification Procedure

スワブサンプルは、そのキットメーカーの指示に従って保存してください。スワブキットにトランスポート溶液が含まれている場合は、キットメーカーの指示に従って混合し、トランスポート溶液を RNA 抽出に使用してください。スワブにトランスポート溶液が含まれていない場合は、市販のトランスポート溶液またはユーザーで調製されたトランスポート溶液を使用することができます。トランスポート溶液の代わりに PBS を使用することもできます。

だ液サンプルは、保存キットメーカーの指示に従って保存してください。凍結保存した場合は、本製品による RNA 抽出を行う前に解凍してください。サンプル中の微粒子状の物質を、RNA 抽出実験に持ち込まないようにして下さい。

RNA 抽出前には、サンプルを十分に混合する必要があります。下流アプリケーションのために RNA の収量と純度をチェックすることをお勧めします。また、下流解析の検証するために、コントロール RNA を用いてサンプルをスパイクすることをお勧めします。

96 ウェル 1.2 mL 反応プレートでの実験手順

1. サンプルのうち 200 μ L を 1.2 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 10 μ L と Lysis LBF (Lysis Buffer) 150 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で封をして、室温で 20 分間反応します。
4. Bind BBD/イソプロパノール溶液 205 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、上清を十分に除去します。
7. 反応プレートを磁気プレートから下ろし、Wash WBE 溶液 400 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. 反応プレートを磁気プレート上で 5 分間静置し、溶液中のビーズを分離します。
9. 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ます。
10. 反応プレートを磁気プレート上に置いたままで、70%エタノール 400 μ L を加え、2 分間静置します。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。
11. ステップ 10 の 70%エタノール洗浄を再度繰り返し、合計 2 回の 70%エタノール洗浄を行って下さい。
12. 室温で 1 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。
13. 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 μ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁し、室温で 5 分間静置により RNA を溶出します。
14. 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。
RNA サンプルは、すぐ使用する場合には氷上で、長期保存する場合には -20~-80°C 保存してください。

1.5 mL 反応チューブでの実験手順

1. サンプルのうち 200 μ L を 1.2 mL ウェルサイズの反応チューブに入れます。
2. Proteinase K (50 mg/mL) 溶液 10 μ L と Lysis LBF (Lysis Buffer) 150 μ L を加え、ピペッティング 10 回により混合します。
3. 反応チューブのキャップを閉め、室温で 20 分間反応します。
4. Bind BBD/イソプロパノール溶液 205 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. 反応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. 反応チューブを磁気スタンド上に置いたままで、上清を十分に除去します。
7. 反応チューブを磁気スタンドから下ろし、Wash WBE 溶液 400 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. 反応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。
9. 反応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ます。
10. 反応チューブを磁気スタンド上に置いたままで、70%エタノール 400 μ L を加え、2 分間静置します。反応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. ステップ 10 の 70%エタノール洗浄を再度繰り返し、合計 2 回の 70%エタノール洗浄を行ってください。
12. 室温で 1 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。

13. 反応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 40 μ L を加え、ピペッティング 10 回により再懸濁し、室温で 5 分間静置により RNA を溶出します。

14. 反応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、新しい保存用チューブに移します。

RNA サンプルは、すぐ使用する場合には氷上で、長期保存する場合には -20~-80°C 保存してください。



230714_QMJ_RNAdvanceViral

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>

