

RNAdvance Tissue 追加プロトコル

バイラルトランスポートを含む水分の多いサンプルからの RNA 抽出



本追加プロトコルは簡易版です。使用前には、正式な製品マニュアルと Supplemental Protocol (英文)を必ずご一読ください。

Material Supplied by the User

96 ウェル反応プレートの場合

2.2 mL 96 ウェルプレート

例: Worldwide Life Sciences, 99181000

Beckman Coulter SPRIPlate 96R Ring Super Magnet Plate, A32782

マイクロチューブの場合

1.7 mL マイクロチューブ

Beckman Coulter SPRIStand 6 Position Tube Magnet, A29182

試薬

6 M グアニジンチオシアネート

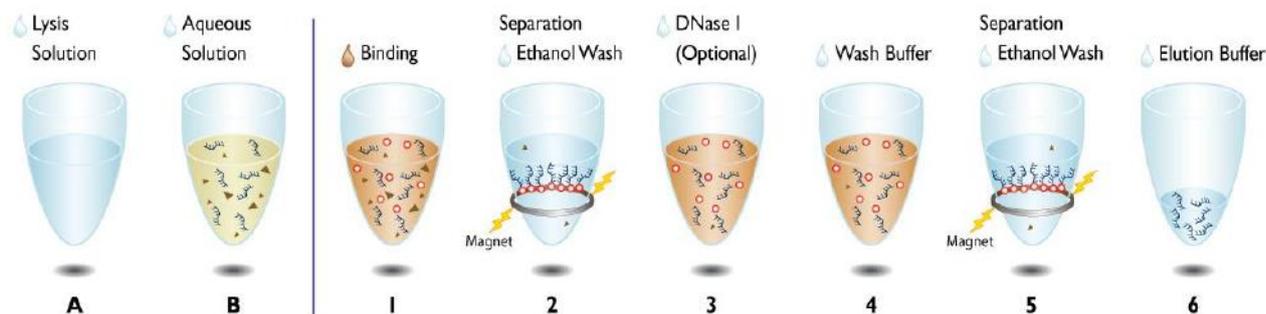
100%イソプロパノール

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/ μ L)、DNase I Buffer

ヌクレアーゼフリー水

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°C で保存します。

2. Wash Buffer 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 μL 、6 M グアニジンチオシアネート 120 μL 、Lysis LBE 200 μL を混合します。

4. Bind BBC 溶液を用時調製します。

1 サンプルあたり、Bind BBC 80 μL と 100%イソプロパノール 400 μL 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 μL が必要です。ヌクレアーゼフリー水 80 μL 、10 \times DNase Buffer 10 μL 、DNase I 10 μL を混合します。

6. バイラルトランスポートを含む、水分の多いサンプル 300 μL にステップ 3 で調製した Lysis LBE 溶液 340 μL を加え、十分に混合し、常温で 15~30 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°Cで保存できます。

7. 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 480 μ 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。
8. 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。
9. 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。
10. 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 μ 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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 μ 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。
14. 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。
15. 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 21 に進んで下さい。

16. (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 μ 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。
17. 磁性ビーズを、ピペッティング 5 回により再懸濁します。
18. 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。
19. 反応プレート・チューブに Wash WBD 溶液 550 μ 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。
20. 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。
21. 反応プレート・チューブに 70%エタノール 600 μ L を加えます。混合する必要はありません。
22. 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。
23. ステップ 21~22 の 70%エタノール洗浄を再度繰り返してください。
24. 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。
25. 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 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。

26. 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。



210217_SP-JP_RNAAdvanceTissue_AqueousSampleRNA

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>

