

RNAdvance Blood 追加プロトコル 培養細胞 5×10^4 以上からの total 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

2.2 mL マイクロチューブ

A29182 Agencourt SPRISand 6 Position Tube Magnet

試薬

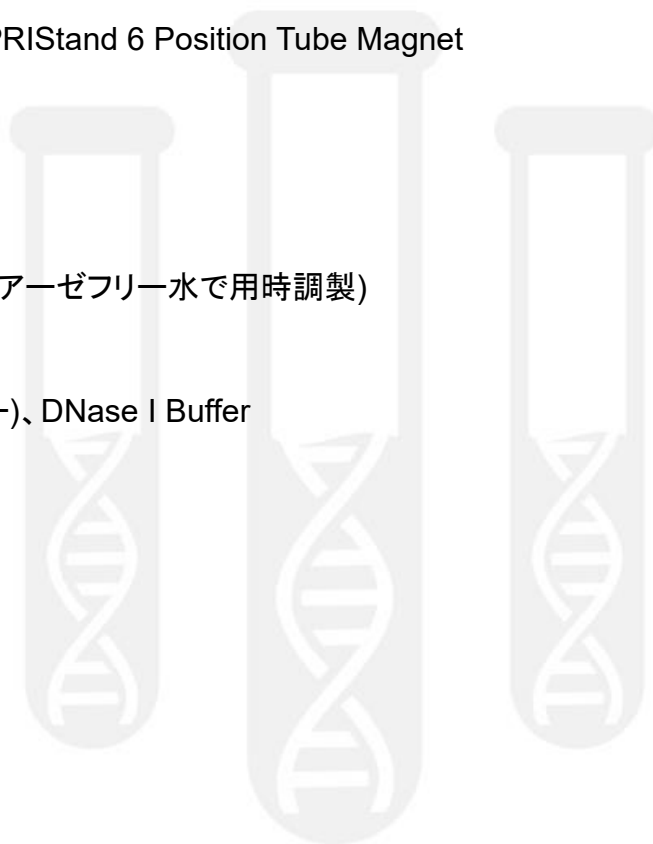
100%イソプロパノール

80%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

PBS (pH 7.4)

DNase I (RNase フリー)、DNase I Buffer

ヌクレアーゼフリー水



Reagent Preparation

1. Proteinase K 50 mg/mL 溶液を調製します。

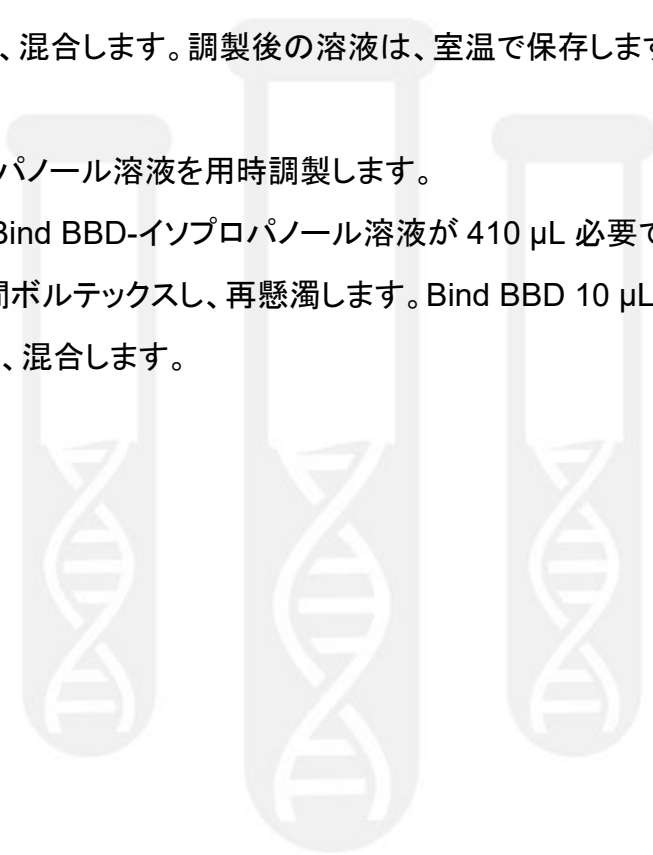
Proteinase K のボトルに Proteinase K Buffer を、ラベルに記載された容量加え、混合します。調製後の溶液は、 -20°C で保存します。

2. Wash Buffer 溶液を調製します。

Wash 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 $410\ \mu\text{L}$ 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 $10\ \mu\text{L}$ に 100%イソプロパノールを $400\ \mu\text{L}$ を加え、混合します。



Purification Procedure

1. サンプル調製

- a. 細胞培養培地を完全に除き、細胞を PBS で 1 回洗浄します。
- b. PBS 400 μ L で細胞を再懸濁します。

2. 細胞消化

- a. Lysis LBF 300 μ L と Proteinase K (50 mg/mL; Reagent Preparation ステップ 1) 溶液 20 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 37°C で 15 分間反応します。

3. 結合

- a. Bind BBD-イソプロパノール溶液 (Reagent Preparation ステップ 3) 410 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 室温で 5 分間静置します。
- d. 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。
- e. 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。
- f. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

4. 洗浄

- a. Wash WBE 溶液 (Reagent Preparation ステップ 2) 800 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 反応チューブを磁気スタンド上で 3 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- d. 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。
- e. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

5. エタノール洗浄

- a. 80%エタノール 800 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 反応チューブを磁気スタンド上で 3 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- d. 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。
- e. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

6. DNase I 処理

- a. ヌクレアーゼフリー水 80 μ L、10 \times DNase I Buffer 10 μ L、DNase I 10 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 37 $^{\circ}$ Cで 20 分間反応します。

7. 再結合

- a. Re-Bind RBB 溶液 200 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 室温で 5 分間静置します。
- d. 反応チューブを磁気スタンド上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- f. 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。
- g. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

8. エタノール洗浄

- a. 80%エタノール 800 μ L を加えます。
- b. ピペティング 10 回により混合します。
- c. 反応チューブを磁気スタンド上で 3 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- d. 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。
- e. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

9. 溶出

- a. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加えます。
- b. 60 $^{\circ}$ C、300 rpm で 2 分間攪拌混合します。
- c. 反応チューブを磁気スタンド上で 5 分間静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- d. 溶出 RNA を含む上清を、新しい保存用チューブに移します

Example Data

結腸直腸がん由来細胞株 HCT116 から、 $5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ の細胞数で RNA を抽出しました。RNA は、Quant-iT™ RiboGreen® RNA (Thermo Fisher Scientific) で定量しました (Figure 1)。細胞数が増えると RNA 収量も高くなり、 3×10^6 細胞から RNA 約 60 μg が得られました。

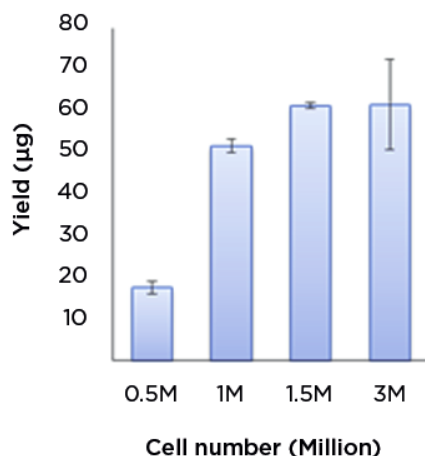


Figure 1. 細胞数 $5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ からの RNA 収量。HCT116 培養細胞を使用。

RNA の品質は、RNA ScreenTape Assay (Agilent Technologies) により確認しました。すべての細胞数で高い RIN (RNA Integrity Number) を示しました (Figure 2)。

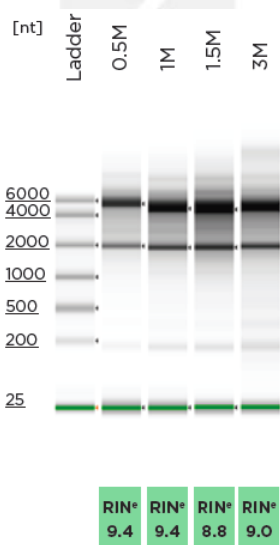


Figure 2. RNAAdvance Blood 追加プロトコルで抽出された高品質 RNA。



210217_SP-JP_RNAAdvanceBlood_CellRNA

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>

