

RNAdvance Cell v2 追加プロトコル 同一サンプルから DNA, RNA を別々に同時抽出



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。

同一の培養細胞サンプルから DNA, RNA を別々に抽出します。

Material Supplied by the User

1.5 mL マイクロチューブ

例: Beckman Coulter, 357448

Beckman Coulter SPRISand 6 Position Tube Magnet, A29182

試薬

Beckman Coulter RNAdvance Cell v2 Lysis LBE, A47942 or A47943

Beckman Coulter RNAdvance Cell v2 Proteinase K, A47942 or A47943

Beckman Coulter FormaPure XL Total Bind BBA, B85603

Beckman Coulter FormaPure XL Total Re-Bind RBA, C16684

Beckman Coulter FormaPure XL Total Wash WBA, B85625

Beckman Coulter FormaPure XL Total RNase A, B85620

80%エタノール (ヌクレアーゼフリー水で用時調製)

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

1× PBS

ヌクレアーゼフリー水

Purification Procedure

1. 細胞溶解

- a. 培養細胞を 1× PBS 10 μ L で再懸濁します。
- b. 1.5 mL マイクロチューブに、細胞懸濁液 10 μ L を加えます。
- c. Lysis LBE 100 μ L を加えます。
- d. Proteinase K 5 μ L を加えます。
- e. ピペッティング 10 回により混合します。
- f. 室温で 30 分間か、37°C で 15 分間反応します。

2. 結合

- a. Bind BBA ボトルの磁性ビーズをボルテックスで十分に再懸濁します。
- b. Bind BBA 55 μ L とヌクレアーゼフリー水 55 μ L を混合し、50% Bind BBA を調製します。
- c. 反応チューブに 50% Bind BBA 110 μ L を加えます。
- d. ピペッティング 10 回により混合します。
- e. 室温で 5 分間静置します。
- f. 反応チューブを磁気スタンド上で 10 分間 (必要に応じてそれ以上) 静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
- g. 上清を別の 1.5 mL マイクロチューブに移します → RNA 抽出サンプルとなります。
磁性ビーズに結合した核酸 → DNA 抽出サンプルとなります。

3. RNA 抽出

a. 結合

1. ステップ 2.g.の上清に、Bind BBA 200 μ L を加えます。
2. ピペッティング 10 回により混合します。
3. 室温で 5 分間静置します。
4. 反応チューブを磁気スタンド上で 10 分間 (必要に応じてそれ以上) 静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
5. 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。
6. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

b. エタノール洗浄

1. 80%エタノール 375 μ L を加えます。

2. ピペッティング 10 回により混合します。
3. 反応チューブを磁気スタンド上で 3 分間 (必要に応じてそれ以上) 静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
4. 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。
5. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

c. DNase I 処理

1. DNase I 溶液 100 μ L (ヌクレアーゼフリー水 80 μ L、DNase I 10 μ L、10 \times DNase I Buffer 10 μ L) を加えます。
2. ピペッティング 10 回により混合します。
3. 37°Cで 20 分間反応します。

d. 再結合

1. Re-Bind RBA 250 μ L を加えます。
2. ピペッティング 10 回により混合します。
3. 室温で 5 分間静置します。
4. 反応チューブを磁気スタンド上で 10 分間 (必要に応じてそれ以上) 静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
5. 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。
6. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

e. エタノール洗浄

1. 80%エタノール 375 μ L を加えます。
2. ピペッティング 10 回により混合します。
3. 反応チューブを磁気スタンド上で 3 分間 (必要に応じてそれ以上) 静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
4. 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。
5. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

f. 溶出

1. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加えます。
2. ピペッティング 10 回により混合します。
3. 60°Cで 2 分間静置します。
4. 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。

5. 溶出 RNA を含む上清を、新しい保存用チューブに移します

4. DNA 抽出

a. RNase A 処理

1. ステップ 2.g.の磁性ビーズの入った反応チューブを磁気スタンドから下ろします。
2. Wash WBA 300 μ L を加えます。
3. RNase A 2.5 μ L を加えます。
4. ピペッティング 10 回により混合します。
5. 室温で 5 分間静置します。
6. 反応チューブを磁気スタンド上で 10 分間 (必要に応じてそれ以上) 静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
7. 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。
8. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

b. エタノール洗浄

1. 70%エタノール 375 μ L を加えます。
2. ピペッティング 10 回により混合します。
3. 反応チューブを磁気スタンド上で 10 分間 (必要に応じてそれ以上) 静置し、溶液中の磁性ビーズを分離します。
4. 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。
5. 反応チューブを磁気スタンドから下ろします。

c. 溶出

1. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加えます。
2. ピペッティング 10 回により混合します。
3. 60°Cで 2 分間静置します。
4. 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。
5. 溶出 DNA を含む上清を、新しい保存用チューブに移します

Example Data

ヒトTリンパ球細胞株 (Jurkat) 1 万、5 万、10 万、50 万細胞から抽出を行いました。DNA 濃度は Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Thermo Fisher Scientific)、RNA 濃度は Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific) により測定しました。1 万細胞からの平均収量は、DNA 171 ng, RNA 94 ng でした。DNA, RNA の収量は、ともに細胞数に依存して増加しました。

DIN > 9.0, RIN > 9.2 という、分解少ない DNA, RNA が得られました (Agilent DNA or RNA ScreenTape Assay) (Figure 2)。1 万細胞からの抽出では、DIN 6.7, RIN 8.0 と低い数値を示しましたが、これは抽出された核酸量が少なく ScreenTape Assay の定量範囲を下回ったためと考えられます。

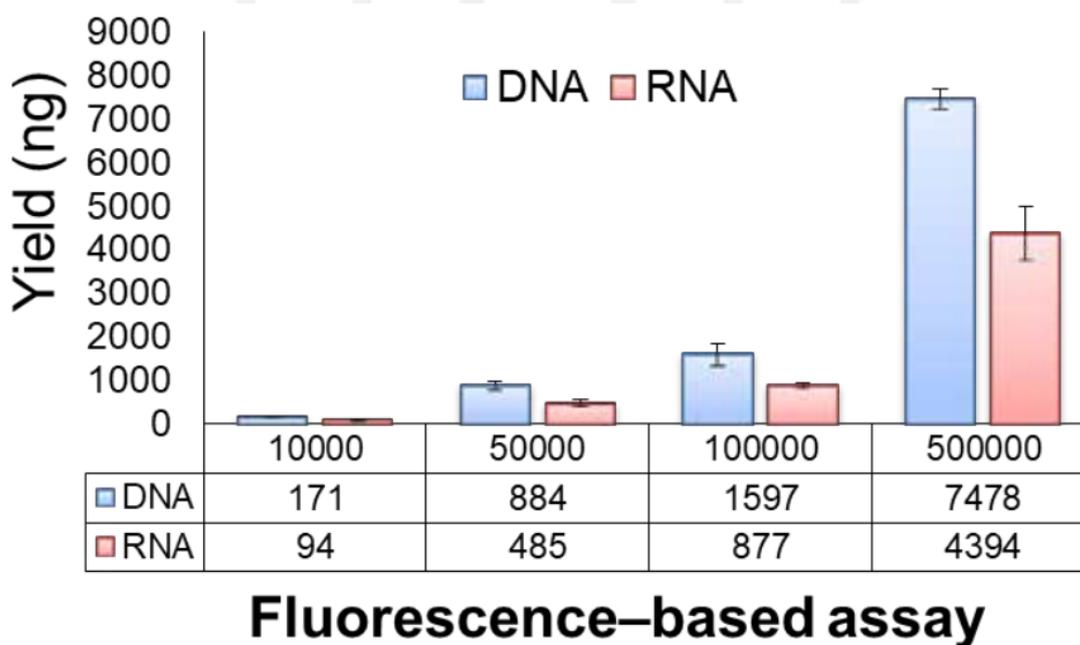


Figure 1. 本追加プロトコルを用いた DNA, RNA 抽出収量。DNA, RNA は、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (Thermo Fisher Scientific) および Quant-iT RiboGreen RNA Assay (Thermo Fisher Scientific) にて定量しました。

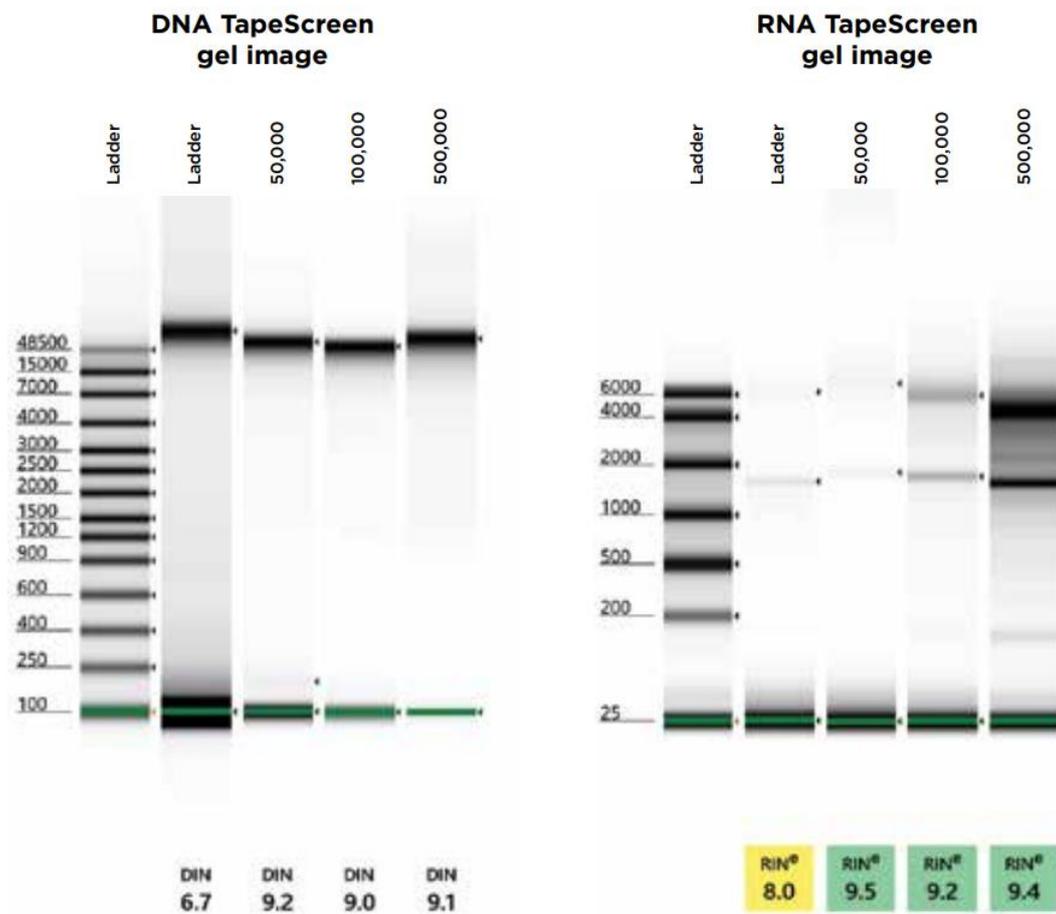


Figure 2. 本追加プロトコルを用いて抽出された DNA, RNA の分解程度。DIN, RIN は、Agilent DNA or RNA ScreenTape Assay にて測定しました。

210216_SP-JP_RNAAdvanceCellv2_TNA

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>

