

RNAdvance Tissue 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。

同一の組織サンプルから DNA, RNA を別々に抽出します。

Material Supplied by the User

1.2 mL 96 ウェルプレート

例: ThermoFisher Scientific, AB1127

V&P Scientific 7 Bar Magnet for 96-Well Plate, 771MWZM-1ALT

試薬

Beckman Coulter RNAdvance Tissue Lysis LBE, A32645, A32646 or A32649

Beckman Coulter RNAdvance Tissue Proteinase K, A32645, A32646 or A32649

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

ヌクレアーゼフリー水

Purification Procedure

1. ホモジナイゼーション／溶解

- a. 組織 10 mg を、1.2 mL 96 ウェルプレートまたは 1.5 mL マイクロチューブに加えます。
- b. Lysis LBE 380 μ L と Proteinase K 20 μ L を加えます。
- c. 組織のホモジナイズ: ティッシュライザー (スチールボール) またはハンドホモジナイザーを使用してください。ホモジナイズ後、ティッシュライザーを使用している場合はスチールボールを取り除きます。
- d. 37°C で 25 分間反応します。
- e. 12,000 rpm で 1 分間、遠心分離します。
- f. 上清を新しい 96 ウェルプレートに移します。元の反応プレート/チューブは廃棄します。

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 150 μ L を加えます。
- c. ピペティング 10 回により混合します。
- d. 室温で 5 分間静置します。
- e. 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。
- f. 上清 550 μ L を別の 1.2 mL 96 ウェルプレートに移します → 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.f. の上清に、Bind BBA 550 μ L を加えます。
2. ピペティング 10 回により混合します。
3. 室温で 5 分間静置します。
4. 反応プレート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。
6. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

b. エタノール洗浄

1. 80%エタノール 800 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. 反応プレートが磁気プレート上で 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。
5. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

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 $^{\circ}$ Cで 20 分間反応します。

d. 再結合

1. Re-Bind RBA 150 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. 反応プレートを磁気プレート上で 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。
6. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

e. エタノール洗浄

1. 80%エタノール 800 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. 反応プレートを磁気プレート上で 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。
5. 反応プレートを磁気プレートから下ろします。

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. 300 rpm で振盪しながら、60°Cで 2 分間静置します。
4. 反応プレートに磁性ビーズの入った反応プレートに 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、新しい保存用プレートに移します

4. DNA 抽出

a. RNase A 処理

1. ステップ 2.f.の磁性ビーズの入った反応プレートに磁性プレートから下ろします。
2. Wash WBA 225 μ L と RNase A 5 μ L を加えます。
3. ピペティング 10 回により混合します。
4. 室温で 5 分間静置します。
5. 反応プレートに磁性プレート上で 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。
6. 反応プレートに磁性プレート上に置いたままで、上清を除去します。
7. 反応プレートに磁性プレートから下ろします。

b. エタノール洗浄

1. 70%エタノール 800 μ L を加えます。
2. ピペティング 10 回により混合します。
3. 反応プレートに磁性プレート上で 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. 反応プレートに磁性プレート上に置いたままで、上清を除去します。
5. 反応プレートに磁性プレートから下ろします。

c. 溶出

1. ヌクレアーゼフリー水 40 μ L を加えます。
2. ピペティング 10 回により混合します。
3. 300 rpm で振盪しながら、60°Cで 2 分間静置します。
4. 反応プレートに磁性プレート上で 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、新しい保存用プレートに移します

Example Data

凍結マウス肝組織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。組織 10 mg からの収量は、DNA 32 µg, RNA 66 µg でした (Figure 1)。

DIN 9.2, RIN 7.4 という、分解少ない DNA, RNA が得られました (Agilent TapeScreen Assay) (Figure 2)。

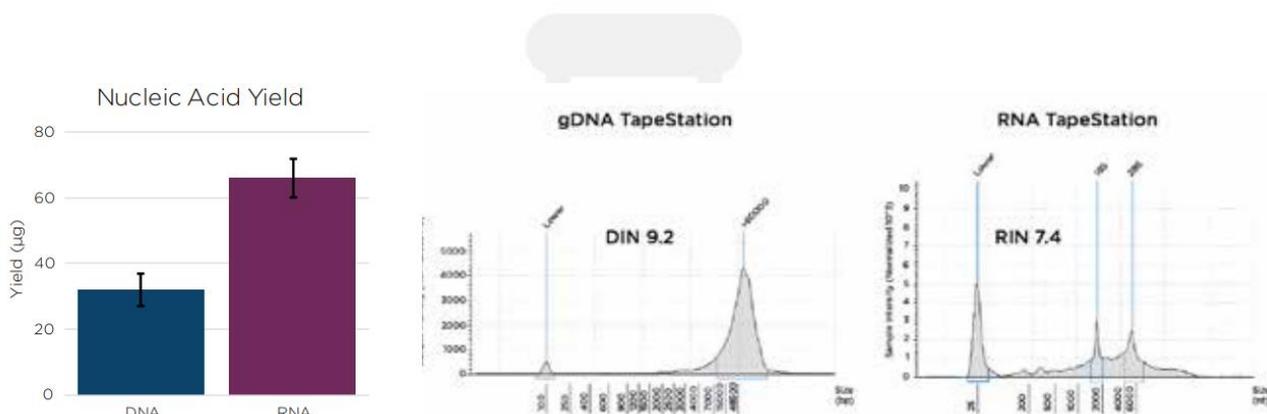


Figure 1. (Left) 本追加プロトコルを用いた DNA, RNA 抽出収量。DNA, RNA は、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay および Quant-iT RiboGreen RNA Assay にて定量しました。

Figure 2. (Right) 本追加プロトコルを用いて抽出された DNA, RNA の分解程度は低いものでした。

210216_SP-JP_RNAAdvanceTissue_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>