

# Maxwell<sup>®</sup> 16 LEV simplyRNA Cells and Tissue Kit (カタログ番号 AS1270/AS1280) 簡易マニュアル

注意：キットを受け取りましたら、1-Thioglycerolを取り出し、キット箱は室温で保存してください。

取り出した1-Thioglycerolは2~10℃で保存してください。

## ご用意いただくもの

【細胞・組織の両方の場合で共通】

- ボルテックスミキサー
- ピペットマン (P-20、P-200、P-1000)とそれらのチップ
- アイスブロックまたは氷

【組織の場合のみ】

- ホモジナイザーもしくは組織破碎装置

## 試薬の準備

### 1 – Thioglycerol/Homogenization Solutionの調製

1. 1mlのHomogenization Solutionあたり20μlの1-Thioglycerolを添加する。

RNA抽出の工程において、1サンプルあたり、200μlの1-Thioglycerol/Homogenization Solutionを使用します。

1-Thioglycerolは還元剤であり、2-MEの代わりに利用します。1-thioglycerolは毒物には該当しません。

2. 1-Thioglycerol/Homogenization Solutionは使用するまで氷上にて冷やしておく。

1-Thioglycerol/ Homogenization Solutionは2-10℃で保存してください。30日まで安定です。

### DNase I

1. 凍結乾燥品のDNase Iのバイアルに、275μlのNuclease-Free Waterを添加する。蓋をしてバイアルをおだやかに転倒混和し、内側に付着しているDNase Iもリンスします。ボルテックスはしないでください。
2. 試薬の視認性を上げるため、5μlのBlue Dyeを添加する。
3. 使用後のDNase I溶液は、1回の実験で使用する分量に分注し、-20℃で保存してください。  
凍結融解は3回以上行わないで下さい。 -20℃で6か月は保存できます。

## 培養細胞からのTotal RNA抽出の手順

### 接着細胞のプロトコル

1. プレート(またはウエル)より培地を除き、PBSでの洗浄を行う。
2. トリプシン処理を行い、全量を1.5ml遠心チューブに移す。  
スクレイパーを使って、細胞を掻き集める方法も有効です。
3. 低速遠心(例、300×g、3分間)により細胞を落とし、上清のトリプシン溶液を除く。
4. 以下の『接着細胞と浮遊細胞の共通プロトコル』に進む。

### 浮遊細胞のプロトコル

1. 低速遠心(例、300×g、3分間)により細胞を落とし、上清を除く。
2. 以下の『接着細胞と浮遊細胞の共通プロトコル』に進む。

### 接着細胞と浮遊細胞の共通プロトコル

1. 冷却した200μlの1-Thioglycerol/Homogenization Solutionを細胞ペレットに加える。  
ペレットがなくなり細胞が溶解するまで、十分にボルテックスにより攪拌する。  
ボルテックスの前にピペティングで細胞ペレットを懸濁していただいても構いません。  
すべてのサンプルがそろった後、細胞ライゼートは氷上で保存してください。
2. 200μlのLysis Bufferを添加し、15秒間ボルテックスする。
3. 4ページ目の『LEVカートリッジの準備』に進む。

### 参考：接着細胞での短縮プロトコル (35mmディッシュ、6～48ウエルプレートにて適用可能)

本プロトコルは、公式プロトコルではなく、ユーザー様よりいただいた改変プロトコルです。

参考資料となりますので、予備実験にて、得られたRNAの純度・収量をご確認ください。

1. プレート(またはウエル)より培地を除き、PBSでの洗浄を行う。
2. 冷却した200μlの1-Thioglycerol/Homogenization Solutionを直接ウエル/ディッシュに加え、全面に行き渡らせ、細胞を溶解する。  
35mmディッシュや6ウエルプレートでは、200μlの1-Thioglycerol/Homogenization Solutionにより全面を覆うことができないことがあります。その場合、続けて手順3に進み、合計400μlで十分に全面を覆い、細胞溶解を行ってください。
3. 200μlのLysis Bufferを添加し、ピペティングで数回混ぜる。  
Lysis Bufferには、高濃度の界面活性剤が含まれます。泡立ちには十分にご注意ください。
4. 4ページ目の『LEVカートリッジの準備』に進む。

## 組織からのTotal RNA抽出の手順

1. 冷却した200 $\mu$ lの1-Thioglycerol/Homogenization Solution中で、組織片が見えなくなるまで、すばやくホモジナイズし、さらに15~30秒のホモジナイズする。

サンプルが泡立ってしまった場合は、サンプルを氷上に静置してください。カートリッジでのホモジネート最大処理量は200 $\mu$ lです。必要であれば、サンプルにhomogenization solutionを加えて最終的なホモジネートの容量を200 $\mu$ lに調製してください。

2. 【オプション】：組織サンプルの量が多い場合には、ホモジネートを70°C、2分間熱処理し、冷却（約1分間）する。

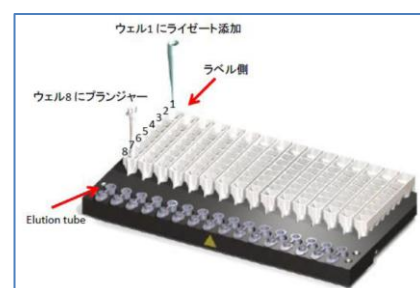
この処理は10mg以上の肝臓サンプルのような、多量のRNAを含む試料を対象に推奨されます。

**注意：**熱処理を行った場合には、抽出したtotal RNAは部分的に変性され、ネイティブゲルでの泳動度が変化する可能性があります。熱処理を行った場合には、変性ゲルでの電気泳動が推奨されます。

3. 200 $\mu$ lのLysis Bufferを添加し、15秒間ボルテックスする。
4. 4ページ目の『LEVカートリッジの準備』に進む。

## LEV カートリッジの準備

1. 検体数分のLEVカートリッジをLEV Cartridge Rackに立て、順にそのアルミシールを剥がす。  
カートリッジの両端がカチッというまで、しっかりとセットする  
注意：サンプル数が16より少ない場合には、Maxwell® 16 LEV Cartridge Rackの中央部分をお使いください。
2. 同数のElution Tubeをセットし、50µlのNuclease-Free Waterを加える。  
Elution Tubeを差し込む穴には、赤色のシリコンリングがありますので、Elution Tubeはグッと強く押し込んでください。  
Nuclease-Free Waterは30～100µlを加えることができます。ただし、30µlの場合、磁性ビーズの持ち込みの割合が高くなることが予想されるため、**標準として50µl Nuclease-Free Waterでの溶出をお勧めします。**  
また、Elution Tubeのフタは絶対に閉めないでください。
3. LEVカートリッジのウェル8に、LEVプランジャーを置く。
4. DNase I 溶液をカートリッジのウェル4(黄色い試薬の入ったウェル)に添加する。  
試料が細胞の場合は5µl、組織の場合は10µlを使用する  
DNase I溶液は、粘性があり、壁面に沿って自然に液中に落下しないので、ウェル4内の液に直接加えてください。
5. 約420µlのライゼート全部をMaxwell® 16LEV Cartridge (MCE)のウェル1に添加する。  
ウェル1は最も大きなウェルです。カートリッジラベルに一番近く、Elution tubeからは最も遠い位置にあります。
6. Maxwell® 16 LEV Cartridge RackをMaxwell® 16 Instrument本体にセットし、精製操作をスタート。



\*\*\*\*\*

## 補足資料

## TRIzol®前処理サンプルからのTotal RNA抽出方法

1. 組織および細胞のサンプルをTRIzol®中で破砕・溶解する。
2. 破砕・溶解したサンプルにクロロフォルム(TRIzol® 1mlあたり0.2ml)を添加する。  
遠心操作し、水相を新しいチューブに分取する。  
TRIzol® 1mlあたり約500µlの水相が回収できます
3. Lysis Buffer (Maxwell 16 LEV simplyRNA Cells/Tissue Kitの構成品)を水相に対して等量添加する。  
simplyRNAカートリッジへ添加できる液量は最大800µlのため、**処理できる水相の量は最大400µlです。**
4. ボルテックスにより、十分に攪拌する。
5. 本ページ上側の『LEVカートリッジの準備』に進む。