

PolyAtract® System 1000 (Cat.# Z5400 / Z5420)

Protocol for Cell Cultures

<日本語プロトコール>

キット内容

- 25ml Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles (SA-PMPs)
- 20ml GTC Extraction Buffer
- 50 µl Biotinylated Oligo(dT) Probe (50pmol/µl)
- 40ml Dilution Buffer
- 900µl β-Mercaptoethanol (97.4%)
- 25ml Nuclease-Free Water
- 375ml SSC 0.5 × Solution (3 × 125ml)
- 1 PolyAtract® System 1000 Magnetic Separation Stand
- 1 PolyAtract® System 1000 Magnetic Stand Adapter (15ml tubes 用)
- 40 mRNA User Tubes

保存条件 : PolyAtract® System 1000 に含まれる試薬は 4°C~25°C で保存していただければ、購入日から最低 6 ヶ月は安定です。

Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles は凍結しないでください。

使用上の注意

1. このキットでは最適の結果を得るためにできるだけ新鮮なサンプルを使ってください。または、回収後迅速に液体窒素でサンプルを凍結し、使うまで-70°Cに保存してください。
2. 1 度に 1,000mg 以上のサンプルを用いないでください。サンプルの粘度が高い場合、SA-PMPs を磁石で回収する時に SA-PMPs の凝集を生じ、回収率を下げることになりません。
3. SA-PMPs を再利用することはできません。一度使用した SA-PMPs では Biotinylated Oligo(dT)が結合したままです。このため新たに結合できる Biotinylated Oligo(dT)のキャパシティーが下がっており、回収率が下がります。また、前に単離した核酸が混入します。
4. 遠心機とローターは必ず室温でお使いください。

表 1. サンプル量と使うチューブの大きさ

サンプル量	チューブの大きさ
1×10^6 cells	1.5ml
$1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ cells	50ml または 15ml*

* $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ cells のサンプルの処理には、15ml または 50ml のキャップ付ポリプロピレン製チューブの使用を推奨します。

表 2. 培養細胞に使う試薬の量

試薬	細胞数	
	1×10^6	$1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$
GTC Extraction Buffer	200 μ l	4ml
Dilution Buffer	400 μ l	8ml
Oligo(dT) Probe	30pmol	500pmol
SA-PMPs	500 μ l	6ml
SSC 0.5 \times Solution*	1ml	2ml
Nuclease-Free Water	100 μ l	1ml

*示されている量は mRNA/SA-PMPs 複合体を 1 回洗浄するために使う量です(使う総量ではありません。)

準備するもの

- ホモジナイサー
- 70°Cの恒温水槽
- Beckman Model J2-21 遠心機または同等機
- 1 \times PBS
- 計量天秤

§ サンプル調整

- ① GTC Extraction Buffer、Biotinylated Oligo(dT) Probe、Nuclease-Free Water、SSC 0.5 \times Solution を冷蔵庫から取り出し室温に戻す。
Dilution Buffer を 70°C に温めておく (Dilution Buffer を温める時に以下の点にご注意ください。70°C 以上に温めないでください。70°C に達してから必要以上に温めないでください。温めすぎた場合、ボトルの底が変形することがあります。)
- ② 50ml の滅菌済みキャップ付コニカルチューブに 1ml の GTC Extraction Buffer あたり 20.5 μ l の β -mercaptoethanol (97.4%) を加える。以下、この溶液を Extraction/BME Buffer と呼びます。 β -mercaptoethanol の最終濃度は 2% になります。
RNase の混入を避けるために RNase-Free のピペットを使用し、手袋を着用する。
- ③ $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ の細胞を滅菌済みの 50ml 遠心チューブに回収し、300 \times g、5 分間の遠心を行う。細胞のペレットを滅菌した氷冷の 1 \times PBS で洗浄し、同様の遠心で集める。上清を捨てる。

- ④ Extraction/BME Buffer を細胞に加える。小型ホモジナイザーで 15~30 秒ホモジナイズする。この代りとして完全に細胞が溶解するまでボルテックスをしてもかまいません。

§ mRNA の吸着

- ⑤ 表 2 を参照し、必要な Biotinylated Oligo(dT) Probe、SA-PMPs の使用する量を決定する。温めた Dilution Buffer を滅菌チューブに分注し、1ml の Dilution Buffer あたり 10.25 μ l の β -mercaptoethanol(97.4%)を加えてください。 β -mercaptoethanol の最終濃度は 1%になります。表 2 で決められた量の Dilution Buffer をステップ④のホモジネートに加え、転倒混和により攪拌する。このステップで決定された量の Biotinylated oligo(dT) Probe を加え、振ってよく攪拌する。この混合液を 70°Cで 5 分間インキュベートする。

- ⑥ 溶液をきれいな滅菌済の 15ml COREX チューブまたは同等の遠心チューブに移す。ホモジネートの細胞塊と沈殿したタンパク質を除くために 12,000 \times g、10 分間、室温で遠心する。

SA-PMPs の準備：チューブ内に沈殿している SA-PMPs を、均一になるように溶液全体に完全に再浮遊させる。ステップ⑤で決定した量の SA-PMPs を新しい滅菌済みのチューブに移す。この SA-PMPs の入ったチューブを Magnetic Stand に置く。この Magnetic Stand をゆっくりと水平方向に倒し、SA-PMPs がチューブの壁面に集まるまで放置する。すべての SA-PMPs が壁面に集まったら、Magnetic Stand につけたままの状態、注意してゆっくりとチューブと Magnetic Stand を傾けて溶液のみを捨てる。その際に、溶液は壁面に集まった SA-PMPs の上を通過するように捨てる。

《注意》溶液の塩や界面活性剤の沈殿を防ぐために、遠心機やそのローターは室温で使ってください。

- ⑦ ステップ⑤で決められた SA-PMPs の量と同量の SSC 0.5 \times を用いてステップ⑥の SA-PMPs を再溶解する。Magnetic Stand を使って SA-PMPs を吸着する。ステップ⑥と同様の方法で SSC 0.5 \times を捨てる。この作業をさらに 2 回行う(合計で 3 回)。最後にステップ⑤で決められた SA-PMPs の量の SSC 0.5 \times を用いて SA-PMPs を再溶解する。

《禁止》SA-PMPs は遠心しないでください。

- ⑧ ホモジネートの細胞分画を沈殿させるためのステップ⑥の遠心の完了後、沈殿したタンパク質のペレットに触らないように、注意深くホモジネートの上清を滅菌したピペットで吸い取る。ホモジネートは茶の半透明色を呈している。このクリアーなホモジネートをステップ⑥~⑦で調製した SA-PMPs を含むチューブに移す。**Magnetic Stand から SA-PMPs が入ったチューブをはずし、ホモジネートと SA-PMPs を転倒混和し、確実に混合する。**

《禁止》ホモジネートを移す時に、細胞分画のペレットが壊れると、収量が低下します。ペレットが壊れた場合、もう一度遠心して下さい。

- ⑨ ホモジネート/SA-PMPs 混合液を室温で 2 分間インキュベーションする。Magnetic Stand に置き、ホモジネートが透明になるまで Magnetic Stand を水平方向に傾け、SA-PMPs

を吸着させる。ステップ⑥と同様に上清を捨てる。原理的にこの上清に mRNA は含まれません、念のため RNase-Free チューブに移し、氷上で保存してください。mRNA の回収が確認されたならば廃棄してください。

§ 洗浄

- ⑩ **Magnetic Stand からチューブをはずして**、表 2 で決められた量の SSC 0.5× Solution にホモジネート/SA-PMPs を再溶解する。チューブを指で穏やかに弾いて攪拌する。この混合液を 2ml mRNA User Tube に移す。チューブを Magnetic Stand に立てて SA-PMPs を吸着させる。Magnetic Stand につけたまま SSC 0.5× Solution をピペットで注意して除く。SSC 0.5× Solution での再溶解と SSC 0.5× Solution の除去をさらに 2 回繰り返す(合計 3 回)。最後(3 回目)の SSC 0.5× Solution の除去をした後、SA-PMPs のペレットを崩さないようにできるだけ SSC 0.5× Solution を除去する。
- 《注意》洗いのステップは Magnetic Stand から十分に離れた位置で行ってください。

§ mRNA の溶出

- ⑪ mRNA を溶出するために、表 2 で決められた量の Nuclease-Free Water を SA-PMPs のペレットに加える。チューブを穏やかに指で弾いて SA-PMPs を再溶解する。
- ⑫ ステップ⑥と同じように Magnetic Stand を水平方向に傾けて磁石に SA-PMPs を吸着させる。溶出された mRNA を含む液体を滅菌済みの 1.5ml 遠心チューブに移す。原理的に現時点では SA-PMPs から mRNA は外れ、Nuclease-Free Water に溶解して 1.5ml 遠心チューブに移っていますが、念のため、Nuclease-Free Water に SA-PMPs を再溶解し、mRNA の収量と純度を確認するまで氷上で保存する。
- 《注意》まれに、溶出液へ SA-PMPs の持ち越しが見られます。この場合、この溶出液を 12,000×g、1 分間遠心して、SA-PMPs を沈殿させ、その上清だけを使います。それでも残る SA-PMPs は RNA の実験に用いられるほとんどの酵素反応を阻害しません。

トラブルシューティング

症状	原因	コメント
mRNA が溶出されていない。	溶出段階で塩が除かれていない。	最後の SA-PMPs ペレットを Nuclease-Free Water で洗浄し、この溶出液の A_{260} を測定する。
	mRNA 精製の過程に RNase が混入している。	RNase-Free の環境を整え、実験全体をやり直す。
A_{260}/A_{280} の値が低い	タンパク質が混入している。	mRNA から混入しているタンパク質を除去するために数種類の方法が使われている。精製した RNA のフェノール：クロロホルム抽出が最も使われている。この手順でより高い A_{260}/A_{280} の比が得られますが、40% 以下の RNA を失うことがある。
A_{260}/A_{280} の比率が低い	guanidine thiocyanate か β -Mercaptoethanol が混入している。	mRNA をアルコール沈殿する。
RNA の収量が低い	サンプル量が少ない。	μ g の RNA が必要ならばより大量のサンプルから RNA を再単離する。
	サンプルが完全な状態ではない。	<i>in vivo</i> での RNA 分解を最低限にするための手順を確認する。摘出した組織を液体窒素で迅速に凍結し、使うまで -70°C で保存する。
	細胞に含まれる mRNA の量が少ない。	ある種の組織に含まれる mRNA 量は低いので、大量のサンプルから再単離する。
	一部の mRNA が分解されている	RNase-Free の環境を整える。また、前述の『サンプルが完全な状態ではない』を参照する。