

PolyAtract® mRNA Isolation System I & II

Cat.# Z5200 & Z5210

<日本語プロトコール>

キット内容

1-5mg までの total RNA からの mRNA 抽出を 3 回行うために十分な試薬が含まれています。

- 35 μ l Biotinylated Oligo(dT) Probe (50pmol/ μ l)
- 3 \times 1.4ml 20 \times SSC Solution
- 3 \times 3ml Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles (SA-PMPs)
- 3 \times 25ml RNase-Free Water
- 3 個 mRNA User Tube
- 1 個 12 \times 75mm チューブ用磁石スタンド(Z5210 には含まれません)

保存条件：PolyAtract® mRNA Isolation System に含まれる試薬は 4 で保存していただければ、購入日から少なくとも 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. 実験者の手と空気中の細菌・カビから RNase の混入が起こり得ます。この混入を防ぐために、キットに添付される試薬を扱うときに、最適な微生物の滅菌手順を行ってください。キットに添付される試薬は何度も繰り返し使います。そのため、フタの開閉時に起こりうるコンタミネーションには十分にご留意ください。ゴム手袋は必ず装着してください。
2. RNA を扱うときには、できるかぎりディスポのプラスチック容器を使ってください。これらの容器は一般的に RNase-Free のため、RNase を不活性化させる処理が不要です。
3. ディスポではないガラスやプラスチックの容器は使用前に RNase-Free にする処理を確実に行ってください。ガラス容器は 200 で一晩乾熱滅菌してください。プラスチック容器は使う前に 0.1N NaOH, 1mM EDTA に浸した後、RNase-Free Water に浸してください。
4. 実験者が準備する溶液には室温で一晩 diethyl pyrocarbonate(DEPC)処理し、残った DEPC を除くために 30 分のオートクレーブを行ったものを使ってください。ガラス容器でも 0.05% DEPC に一晩浸し、オートクレーブで除いたものを使うことができます。

準備するもの

20 \times SSC

65 の恒温水槽またはヒーティングブロック

滅菌した RNase-Free のプラスチックチューブ

滅菌した RNase-Free のピペットとピペットのチップ

スタートの total RNA 量が 1 ~ 5mg の場合

A. プローブとのアニーリング

1~5mg の total RNA を滅菌した RNase-free のチューブへ最終量 2.43ml に RNase-Free Water で調製する

65 °C のヒーティングブロックで 10 分間インキュベートする

10 µl の Biotinylated-Oligo(dT) Probe と 60 µl の 20 × SSC を RNA に加える。穏やかに混ぜ、完全に冷めるまで室温で放置する。これには 30 分間程度必要と考えられる。これを冷ましている間に、0.5 × および 0.1 × SSC の調製を行う。

B. ストック溶液の調製

0.125ml の 20 × SSC に 4.875ml の RNase-Free Water を加えて、5ml の 0.5 × SSC を RNase-Free のチューブで調製する

50 µl の 20 × SSC に 9.95ml の RNase-Free Water を加えて、10ml の 0.1 × SSC を RNase-Free のチューブで調製する

C. Streptavidin Paramagnetic Particles (SA-PMPs) の洗浄

SA-PMPs のチューブの底を指ではじいて、完全に SA-PMPs を再溶解させる。チューブを磁石のスタンドに立てて、SA-PMPs がチューブの壁面に集まるまで SA-PMPs を磁石に回収する(約 30 秒)。注意して上清を除く。Notes: SA-PMPs の遠心は決して行わないでください。

SA-PMPs を 1 回当たり 1.5ml の 0.5 × SSC で 3 回洗浄する。毎回、磁石のスタンドで SA-PMPs を回収し、注意して上清を除く

洗浄した SA-PMPs を 0.5ml の 0.5 × SSC に溶解する

D. Oligo(dT)-mRNA 複合体の回収と洗浄

ステップ A. で調整したアニーリングの反応液の全量をステップ C. で調整した SA-PMPs に混合する

室温で 10 分間インキュベートする。1~2 分ごとに転倒混和を行い、穏やかに混ぜる
インキュベート後の SA-PMPs を磁石のスタンドで回収し、SA-PMPs のペレットを乱さないように注意して上清を除く

Notes: この段階で原理的に mRNA は SA-PMPs との複合体としてペレット側にありますが、結果が確認されるまで、念のため上清は最後まで保管してください

1 回当たり 1.5ml の 0.1 × SSC を加え、軽く指でチューブを弾くことでペレットを再溶解させて洗浄を行う。この洗浄は 4 回行う。最後の洗浄の後、ペレットを乱さないようにできる限り溶液を除去する

E. mRNA の溶出

mRNA を溶出するため、最終の SA-PMPs のペレットを 1.0ml の RNase-Free Water に再溶解する。再溶解はチューブを指ではじいて行う

SA-PMPs を磁石のスタンドで回収し、溶出された mRNA を含む水相を 2ml User Tube に移す。SA-PMPs のペレットは捨てないでください

Notes: mRNA の溶出液に SA-PMPs の持ち込みがあった場合、10,000 × g、5~10 分間の 4 の冷却遠心を行って SA-PMPs を落とし、注意しながら mRNA 溶液を新しい滅菌した RNase-Free チューブに移す

トラブルシューティング

問題	原因	コメント
mRNA が溶出されない。	アニーリングの段階で塩が除かれていたため、mRNA が結合していない。	20 × SSC を加えてアニーリングを行う(最終的には 0.5 ×)。
	プローブの捕獲と洗浄の前に行うアニーリング反応の冷却が不十分である。	保存しておいた上清を SA-PMPs に戻し、実験操作を続ける。
	溶出の前に塩が取り除かれていない。	最後の SA-PMPs のペレットを脱イオン滅菌水で再洗浄し、この溶出液の吸光度(A ₂₆₀)を測定する。
	total RNA に RNase が混入している。	ゲル電気泳動で total RNA の品質を確認し、必要ならば RNA の単離をもう一度行う。プロメガの RNAgents® System を用いて高品質な total RNA を単離する。
ゲルで RNA が分解されている	mRNA の単離に RNase が混入している。全体の過程を再度行う。	RNase-Free の環境を整える。
収量が低い	洗浄液の塩濃度が低い。	20 × SSC を加え(最終濃度 1 ×)、アニーリングステップを繰り返し、0.2 × SSC で最後の洗浄を行う。

精製した mRNA の解析と取り扱い

A. mRNA の濃度と精製度の確認

溶出した mRNA の濃度と精製度は分光光度計で確認できます。精製されている mRNA は A_{260}/A_{280} の比が 2.0 以上を示します。mRNA 濃度の確認では、 A_{260} での吸光度 1 あたり 40 $\mu\text{g/ml}$ mRNA を示します。

1mg 以下の total RNA から mRNA を単離した場合、サンプルを希釈しなくても直接吸光度を測定することができます。吸光度を測定後、サンプルを回収できるようにキュベットは RNase-Free にしてください。RNase-Free にするためにキュベットを 50mM NaOH で洗浄し、滅菌水で洗い流してください。

単離された mRNA の品質は変性アガロースゲルで確認できます。しかし、1mg 以下の total RNA から mRNA を単離した場合、全量のサンプルをローディングする必要があるかもしれません。これらのゲルは保存しておけば、ノーザンプロットに使えます。

B. mRNA の沈殿と濃縮

PolyATtract® System で単離された mRNA は分光光度計の解析には十分な濃度ですが、cDNA クローニングや *in vitro* 翻訳のような実験には希薄な濃度です。0.5mg 以上の total RNA から単離された mRNA はアルコール沈殿で濃縮した方が良いかもしれません。:

1. cDNA クローニング: 0.1 容量の 3M sodium acetate と 1.0 容量の isopropanol を溶出した溶液に加え、-20 で一晩おく。
in vitro 翻訳: 0.1 容量の 3M potassium acetate と 1.0 容量の isopropanol を溶出した溶液に加え、-20 で一晩おく
2. $>12,000 \times g$ で 10 分間の遠心を行う。RNA のペレットを 1ml の 75% ethanol に再溶解し、もう一度遠心する。
3. 短期間の保存: 真空乾燥機で 15 分間 RNA ペレットを乾燥させる。0.5-1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように RNase-Free の脱イオン水に再溶解し、-70 に保存する。
長期間の保存: sodium acetate/isopropanol を RNA ペレットに加え、-70 に保存する。

0.5mg 以下の total RNA から mRNA を単離した場合、一般的に予想される収量は低いいため、沈殿しても回収は困難になります。低い収量のサンプルでは、溶出した mRNA を -20 で 10 分間凍結し、Speed-Vac® で約 2.5 時間かけて乾燥させます。そしてサンプルを cDNA クローニングや *in vitro* 翻訳に適した量に再溶解します。プロメガでは cDNA ライブラリーをわずか 100 μg の total RNA から単離した mRNA から作成しています。