

PolyAtract[®] mRNA Isolation System III & IV

Cat.# Z5300 & Z5310

キット内容

1mg までの total RNA からの mRNA 抽出を 15 回行うために十分な試薬が含まれています。

- 50µl Biotinylated Oligo(dT) Probe (50pmol/µl)
- 2 × 1.4ml 20 × SSC Solution
- 15 × 0.6ml Streptavidin MagneSphere[®] Paramagnetic Particles (SA-PMPs)
- 2 × 25ml RNase-Free Water
- 1 個 1.5ml チューブ用磁石スタンド(Z5310 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 × 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 1.5ml 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 1mg までの場合

A. プローブとのアニーリング

0.1~1.0mg の total RNA を最終量 500 μ l に RNase-Free Water で調製する

Notes: 50 μ g 以下の total RNA をスタートにした場合、分光光度計では検出できないかもしれません

65 のヒーティングブロックで 10 分間インキュベートする

3 μ l の Biotinylated-Oligo(dT) Probe と 13 μ l の 20 \times 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 10 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 \times および 0.1 \times SSC の調製を行う

B. ストック溶液の調製

30 μ l の 20 \times SSC に 1.170ml の RNase-Free Water を加えて、1.2ml の 0.5 \times SSC を RNase-Free のチューブで調製する

7 μ l の 20 \times SSC に 1.393ml の RNase-Free Water を加えて、1.4ml の 0.1 \times 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 0.3ml の 0.5 \times 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 0.1ml の 0.5 \times 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 分ごとに転倒混和して、穏やかに混ぜる。

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 0.3ml の 0.1 \times 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 0.1ml 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 を含む水相を滅菌した RNase-Free のチューブに移す。SA-PMPs のペレットは捨てないでください

SA-PMPs のペレットに 0.15ml の RNase-Free Water を加え、再溶解させてもう一度溶出を行う。SA-PMPs の回収を行い、E. で得られた mRNA 溶液と併せて合計 0.25ml となる

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、mRAN 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 の品質を評価し、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 を加えて(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 μ 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、ノーザンブロットに使えます。

B. mRNA の沈殿と濃縮

PolyAtract[®] 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 μ g/ μ 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 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 μ g の total RNA から単離した mRNA から作成しています。