



同一 FFPE サンプルからの DNA、RNA 精製

2 種類の ReliaPrep™ Purification kit を使用し、ライセートを 2 つに分けて同一 FFPE サンプルから増幅可能な DNA と RNA を精製するプロトコール

キット: ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Cat. #A2351)
ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System (Cat. #Z1001)

定量: GoTaq® qPCR and RT-qPCR (Cat. #)
QuantiFluor® ONE dsDNA (Cat. #)
QuantiFluor® RNA System (Cat. #)

サンプルタイプ、量: FFPE組織切片1枚

その他必要なもの: 56℃および80℃のヒートブロック、マイクロチューブ

***: This protocol was developed by Promega Applications Scientists and is intended for research use only. The user is responsible for determining its suitability in the user's application. Further information can be found in Technical Manuals #TM352 and #TM353, available at: www.promega.com/protocols or e-mail: prometec@jp.promega.com**

プロトコール

サンプル前処理

1. FFPE切片を1.5mlチューブに入れ、ミネラルオイルを300µl添加する。10秒ボルテックスしてよく混合する。
2. サンプルを80℃、1分間インキュベートする。ボルテックスしてよく混合する。
3. Lysis Bufferを200µl添加する。
4. 室温で10,000 x g、30秒間遠心する。
5. サンプルが2層に分かれるので、下層にProteinase Kを20µl添加し、ピペッティングでよく混合する。
6. サンプルを56℃、1時間インキュベートする。
7. サンプルを80℃、1時間インキュベートする。
8. サンプルをヒートブロックから回収し、室温で15分間インキュベートする。
9. 最大速度で2分間遠心する。
10. 下層（水相）を回収し、2本の1.5mlチューブに分け（約100µl/チューブ）、DNA精製用およびRNA精製用とする。
11. DNA精製またはRNA精製に進む。

DNA精製

1. DNA精製用サンプルにLysis Bufferを添加し、ボリュームを220µlに合わせる。
2. RNase処理
 - i. RNase Aを10µlサンプルに添加する。ピペッティングでよく混合する。
 - ii. 室温で5分間インキュベートする。
3. BL Bufferを220µl添加する。
4. エタノール（95-100%）を240µl添加する。ボルテックスしてよく混合する。
5. Binding ColumnをCollection Tubeにセットし、サンプルを全量アプライする。カラムのキャップを閉める。
6. 室温で10,000 x g、30秒間遠心する。
7. チューブにたまった廃液を捨て、カラムを同じチューブに戻す。
8. 1X Wash Solution（エタノール添加済み）を500µlカラムに添加する。カラムのキャップを閉める。
9. 室温で10,000 x g、30秒間遠心する。
10. チューブにたまった廃液を捨て、カラムを同じチューブに戻す。



11. ステップ8-10をもう一度繰り返す。
12. カラムのキャップを開けたまま室温で16,000 x g、3分間遠心し、カラムを乾燥させる。
12. カラムを新しい1.5mlチューブに移し、Collection Tubeを捨てる。
13. 30-50µlのElution Bufferをカラムに添加し、キャップを閉める。
14. 室温で16,000 x g、1分間遠心する。溶出されたDNAは-30℃~-10℃で保存する。

RNA精製（プロメガ検討済みプロトコール）

1. RNA精製用サンプルにLysis Bufferを添加し、ボリュームを220µlに合わせる。
2. DNase処理
 - i. 13µl MnCl₂、7µl DNase Buffer、10µl DNase 1を混合しDNaseカクテルを調製する。
 - ii. iのカクテルを30µlサンプルに添加する。ピペティングでよく混合する。
 - iii. 室温で15分間インキュベートする。
3. BL Bufferを650µl添加する。
4. 100%イソプロパノール400µl添加する。ボルテックスして混合する。
5. Binding ColumnをCollection Tubeにセットし、サンプルを半分アプライする。カラムのキャップを閉める。
6. 室温で10,000 x g、30秒間遠心する。
7. チューブにたまった廃液を捨て、カラムを同じチューブに戻す。
8. サンプルの残り半分をアプライする。カラムのキャップを閉める。
9. 室温で10,000 x g、30秒間遠心する。
10. チューブにたまった廃液を捨て、カラムを同じチューブに戻す。
11. 1X Wash Solution（エタノール添加済み）を500µlカラムに添加する。カラムのキャップを閉める。
12. 室温で10,000 x g、30秒間遠心する。
13. チューブにたまった廃液を捨て、カラムを同じチューブに戻す。
14. ステップ8-10をもう一度繰り返す。
15. カラムのキャップを閉めて室温で16,000 x g、3分間遠心し、カラムを乾燥させる。
16. カラムを新しい1.5mlチューブに移す。
17. 30-50µlのNuclease-Free Waterをカラムに添加し、キャップを閉める。
18. 室温で16,000 x g、1分間遠心する。溶出されたRNAは-30℃~-10℃もしくは-65℃以下で保存する。

RNA精製2（プロメガでは検討していないが、おそらく問題なく精製できると考えられるプロトコール）

1. RNA精製用サンプル（約100µl）をDNase処理する。
 - i. 13µl MnCl₂、7µl DNase Buffer、10µl DNase 1を混合しDNaseカクテルを調製する。
 - ii. iのカクテルを30µlサンプルに添加する。ピペティングでよく混合する。
 - iii. 室温で15分間インキュベートする。
2. BL Bufferを325µl添加する。
3. 100%イソプロパノール200µl添加する。ボルテックスして混合する。
4. Binding ColumnをCollection Tubeにセットし、サンプルを全量アプライする。カラムのキャップを閉める。
5. 室温で10,000 x g、30秒間遠心する。
6. チューブにたまった廃液を捨て、カラムを同じチューブに戻す。
7. 1X Wash Solution（エタノール添加済み）を500µlカラムに添加する。カラムのキャップを閉める。
8. 室温で10,000 x g、30秒間遠心する。
9. チューブにたまった廃液を捨て、カラムを同じチューブに戻す。
10. ステップ8-10をもう一度繰り返す。
11. カラムのキャップを閉めて室温で16,000 x g、3分間遠心し、カラムを乾燥させる。
12. カラムを新しい1.5mlチューブに移す。
13. 30-50µlのNuclease-Free Waterをカラムに添加し、キャップを閉める。
14. 室温で16,000 x g、1分間遠心する。溶出されたRNAは-30℃~-10℃もしくは-65℃以下で保存する。