

Maxwell[®] RSC miRNA Tissue Kit (カタログ番号 AS1460) 簡易マニュアル

2019年11月1日 改定

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

- 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
- 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10回まで活性を維持できます。-20℃で6か月は保存できます。

組織からのmiRNA抽出の手順

1. 冷却した200μl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200μl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200μlに調製してください。
2. 200μlのLysis Buffer、200μlのLytic Enhancerおよび30μlのProteinase K Solutionを添加し、20秒間ボルテックスする。
3. 室温で10分間のインキュベーションを行う。この間に、次頁にしたいがい、カートリッジの準備を行う。

カートリッジの準備と精製工程

1. 検体数分のカートリッジをMaxwell® RSC/CSC Deck Tray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® RSC/CSC Deck Trayの中央部分をお使いください。

2. 同数のElution Tubeをセットし、60μl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60μl 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. カートリッジのウエル8に、プランジャーを置く。

4. 10μl のDNase I 溶液をカートリッジのウエル4(黄色い試薬の入ったウエル)に添加する。

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、ウエル4内の液に直接加えてください。



5. 約630μlのライゼート全量をカートリッジのウエル1に添加する。

ウエル1は最も大きなウエルです。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® RSC/CSC Deck TrayをMaxwell® RSC Instrument本体にセットし、精製操作をスタートする。

精製終了後

1. Maxwell® RSC/CSC Deck Trayを取り出す。Elution Tubeのキャップを閉め、適切に保管する。

磁性体ビーズの混入がみられた場合、10,000×gで2分間の遠心操作により除くことができます。

得られたRNAは、長期保存では-70℃に保存してください。24時間以内に使用するときには-20℃保存できます。

2. カートリッジおよびプランジャーを廃棄する。