

## RealTime-Glo™ & ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep system multiplex assay

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS G9711, G9712, G9713, Z6010, Z6011 and Z6012

- 細胞培養表面処理済みの 96well 白クリアボトムプレートもしくはソリッドプレートに任意の細胞数で 50µL ずつ播種する。  
また、バックグラウンドとして、細胞を含まない培地だけの well も準備する。
- 翌日、下記の表を参考に RealTime-Glo™ とテスト化合物を含む培地を調製する。

Component	volume	x サンプル数	= 合計
培地, 2x テスト化合物	49.8 µL		
MT Cell Viability Substrate	0.1 µL		
NanoLuc® Enzyme	0.1 µL		
Final volume per sample	50 µL		

- 50µL の RealTime-Glo™ 試薬とテスト化合物を含む培地を細胞に添加する。
- 37°C インキュベーターにて、10 分以上培養する。
- 任意のタイムポイントにて、発光測定する (72 時間まで繰り返し測定可能)。
- RealTime-Glo™ の発光測定終了後、培養プレートを 37°C インキュベーターに戻しておく。
- ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System で使用する 4 種類の試薬、バッファーを準備する：
  - BL+TG Buffer : BL buffer に対して、1/100 量の 1-Thioglycerol (TG) を添加。
  - Column Wash Solution : 95% エタノールを添加。
  - RNA Wash Solution : 95% エタノールを添加。
  - DNaseI : DNaseI 粉末のバイアルに Nuclease-Free Water を添加。
- インキュベーターより、培養プレートを取り出し培地を除く。滅菌済みの冷却した PBS 100µL を各 well に加え、細胞を洗浄する。
- PBS を除き、BL+TG Buffer 100µL を加える。7-10 回ほどピペッティングを行った後に、Cell Lysate を回収し、滅菌済みの遠心チューブに移す。
- 100% イソプロパノール 35µL をサンプルに加え、5 秒間ボルテックス。
- ミニカラムを Collection Tube をセット。サンプルを加えて室温で遠心(12,000 - 14,000 x g、30 秒間)。
- Collection Tube に貯まった液を捨てて、再度ミニカラムをセットし、500µL の RNA Wash Solution をカラムに加えて、室温で遠心 (12,000 - 14,000 x g、30 秒間)。
- 下記の表を参考に、必要な量の DNase Incubation mix を調製する。

Solution	volume	x サンプル数	= 合計
Yellow Core Buffer	24 µL		
0.09M MnCl <sub>2</sub>	3 µL		
DNase I enzyme	3 µL		

- DNase Incubation mix を 30µL、カラムに添加して、室温で 15 分間インキュベーションする。

技術的なお問合せは:

e-mail: [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com) · Tel: 03-3669-7980 · Fax: 03-3669-7982  
www.promega.co.jp

15. DNaseI の反応終了後、そのまま 200 $\mu$ L の Column Wash Solution をミニカラムに加えて遠心 (12,000-14,000 x g、15 秒間)。
16. ミニカラムを新しい Collection Tube に移し替えて、300 $\mu$ L の RNA Wash Solution を加えて、遠心 (12,000-14,000 x g、2 分間)。
17. ミニカラムを溶出用の Elution Tube に移し替える。溶出用の Nuclease-Free Water をミニカラムに加えて、遠心 (12,000-14,000 x g、1 分間)。
18. 溶出された RNA は、-70 $^{\circ}$ Cで保管する。

(その他の情報)

- RealTime-Glo™は細胞の種類により、細胞数の測定範囲が異なります。  
このため、RealTime-Glo™のマニュアルを参考に、あらかじめ予備実験を行い、測定できる細胞数を決定してください。
- ステップ 1 で細胞を 100 $\mu$ L ずつ播種し、ステップ 2 の前に培地を 50 $\mu$ L 除去することも可能です。

この Quick Protocol は TM431、TM370 を基に作成された簡易型のプロトコルです。  
最新、詳細なプロトコルについては [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)をご覧ください。

---

技術的なお問合せは：  
e-mail: [prometec@jp.promega.com](mailto:prometec@jp.promega.com) ・ Tel: 03-3669-7980 ・ Fax: 03-3669-7982  
[www.promega.co.jp](http://www.promega.co.jp)