

試薬の調製

事前調製

- Wash Solution (3ml/30ml) に 95-100%エタノール(12ml/120ml)を加えます。→室温で保存します。
- 凍結乾燥されている DNaseI 1vial に、Nuclease-Free Water を加えて溶解します。ボルテックス禁止。
→分注して 凍結保存 (-20℃) します。
- Lysis Buffer (LBA) (1ml/30ml)に Blue Dye (10μl/30μl)を加えます。→室温で保存します。

用時調製

- DNase 反応液 (1 サンプルあたり) : DNase 10μl + DNase Buffer 7μl + MnCl₂ 13μl = 30μl

その他準備するもの

- 100% Isopropanol
- 80℃ ヒートブロック
- 56℃ ヒートブロック
- 1.5ml 遠心チューブ / 遠心機 (室温で遠心します)

プロトコール (キシレンを使わない方法)

- ① パラフィン切片(10-100μm 分)を遠心チューブに移して、ミネラルオイルを加えます。
 - 切片の合計:50 μm以下の場合には、300μlのミネラルオイルを加えます。
 - 切片の合計:50 μm以上の場合には、500μlのミネラルオイルを加えます。
- ② 80℃ 1 分間インキュベートします。
- ③ ボルテックスします。
- ④ 100μl の Lysis Buffer を加えて混合後、10,000×g, 15 秒間 遠心します。
- ⑤ 二層に分離した下層 (水層) に 10μl の Proteinase K を加えて、ピペティングして混ぜます。
- ⑥ 56℃ 15 分 → 80℃ 1 時間 → on ice 1 分 → 室温 2 分 とインキュベートします。
- ⑦ 下層に用事調製した DNase 溶液を 30μl 加えて、ピペティングして混ぜます。
- ⑧ 室温 (20-25℃) で 15 分間インキュベートします。
- ⑨ 325μl の BL Buffer、200μl の 100% Isopropanol を加えて ボルテックスします。
- ⑩ 10,000×g, 15 秒間 遠心します。
- ⑪ ReliaPrep™ FFPE Binding Column (カラム) を Collection Tube にセットします。
- ⑫ 下層 (水層、青色の着色のある層) をカラムに移して、10,000×g, 30 秒間 遠心します。
(少量の上層 (油層) の持ち込みは、精製に影響しません)
- ⑬ Collection Tube に貯まったフロースルーを捨て、カラムを再度 Collection Tube にセットします。
- ⑭ 500μl の Wash Solution をカラムに加えて、10,000×g, 30 秒間 遠心します。
- ⑮ フロースルーを捨て、再度 500μl の Wash Solution をカラムに加えて、10,000×g, 30 秒間 遠心します。
- ⑯ フロースルーを捨て、カラムの蓋を閉じて 16,000×g, 3 分間 遠心して、カラムを乾燥させます。
- ⑰ カラムをキットに添付 Elution Tube にセットして、30-50μl の Nuclease-Free Water を加えます。
- ⑱ 16,000×g, 1 分間 遠心して、RNA を溶出します。溶出した RNA は、-20℃もしくは-70℃で保存します。



プロトコール (キシレンを使う方法)

- ① パラフィン切片(10-100 μ m 分)を遠心チューブに移します。
- ② 1ml の 100%キシレンを加えて、ボルテックスしたのち、最高速で 2 分間遠心します。
- ③ ペレットを崩さないようにキシレンを除きます。
- ④ 1ml の 95-100%エタノールを加えてボルテックスしたのち、最高速で 2 分間遠心します。
- ⑤ ペレットを崩さないようにエタノールを除き、再度最高速で 30 秒間遠心し、残存するエタノールを除きます。
- ⑥ ペレットを 37℃、5-15 分間乾燥させます。



- ⑦ 100 μ l の Lysis Buffer を加えて混合します。
- ⑧ 10 μ l の ProteinaseK を加えて、ピペッティングして混ぜます。
- ⑨ 56℃ 15 分 → 80℃ 1 時間 → on ice 1 分 → 室温 2 分 とインキュベートします。
- ⑩ 用事調製した DNase 反応液を 30 μ l 加えて、ピペッティングして混ぜます。
- ⑪ 室温 (20-25℃) で 15 分間インキュベートします。
- ⑫ 325 μ l の BL Buffer、200 μ l の 100% Isopropanol を加えて ボルテックスします。
- ⑬ 10,000 $\times g$, 15 秒間 遠心します。
- ⑭ ReliaPrep™ FFPE Binding Column (カラム) を Collection Tube にセットします。
- ⑮ ⑬の上清を⑭で準備したカラムに移し替えて、10,000 $\times g$, 30 秒間 遠心します。
- ⑯ Collection Tube に貯まったフロースルーを捨て、カラムを再度 Collection Tube にセットします。
- ⑰ 500 μ l の Wash Solution をカラムに加えて、10,000 $\times g$, 30 秒間 遠心します。
- ⑱ フロースルーを捨て、再度 500 μ l の Wash Solution をカラムに加えて、10,000 $\times g$, 30 秒間 遠心します。
- ⑲ フロースルーを捨て、カラムの蓋を閉じて 16,000 $\times g$, 3 分間 遠心します。
- ⑳ カラムをキットに添付されている Elution Tube にセットして、30-50 μ l の Nuclease-Free Water を加えます。
- ㉑ 16,000 $\times g$, 1 分間 遠心して、RNA を溶出します。溶出した RNA は、-20℃もしくは-70℃で保存します。

