

Maxwell[®] RSC Plant RNA Kit (カタログ番号 AS1500) 簡易マニュアル

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3回以上行わないで下さい。-20℃で6か月は保存できます。

植物組織からのTotal RNA抽出の手順

1. 植物組織を液体窒素中で、粉末状になるまで十分に破碎する。
2. 粉末状にしたサンプルを、20~100mgを1.5ml遠心チューブに移す。
3. 600μlの氷冷した1-thioglycerol/Homogenization Solutionを加え、十分にボルテックスする。
4. 先切りしたチップを用いて、400μlのライセートを新しい1.5ml遠心チューブに移す。
※ ライセートを保存する場合には、この時点で-70℃保存する。
5. 200μlのLysis Bufferを添加し、15秒間ボルテックスする。
6. 室温で10分間のインキュベーションを行う。
7. 14,000×g、2分間の遠心を行う。

Note: ステップ4において、先切りしたチップがない場合には、先に遠心(14,000×g、2分間)を行った後に、400μlのライセートを新しい1.5ml遠心チューブに移してもよい。

カートリッジの準備

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、50µlのNuclease-Free Waterを加える。
Nuclease-Free Waterは30~100µlを加えることができます。ただし、30µ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50µl 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. 5µl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600µlのライセート全部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です。
6. Maxwell RSC Instrumentを起動し、Startに続いて、『Plant RNA/AS1500』を選択する。
7. Maxwell® RSC/CSC Deck Trayを、Maxwell® RSC本体にセットし、精製操作をスタートする。

製終了後の操作

1. Maxwell RSC® Instrumentのドアを開け、Elution Tubeのフタを閉める。
2. Maxwell® RSC/CSC Deck Trayを取り出し、Elution Tubeを適切に保管する。
3. Maxwell RSC® Instrumentのドアを閉める。カートリッジとプランジャーを廃棄する。