

Maxwell[®] RSC RNA FFPE Kit (カタログ番号 AS1440)

簡易マニュアル

ご用意いただくもの

- サンプルチューブ (1.5ml遠心チューブ)
- 80℃設定のヒートブロック
- 56℃設定のヒートブロック
- ボルテックスミキサー
- ピペットマン(P-20、P-200、P-1000)とそれらのピペットチップ

試薬の準備

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. 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。

FFPE切片の準備

1. FFPE切片をサンプルチューブに移す。
 - スライドガラスに貼り付けている切片を利用する場合には、スライドガラスから清浄なカミソリでそぎ落としてください。切片は、タッピングや遠心によりサンプルチューブの底に落としてください。
 - 組織切片は、トータルで2mm³まで(5~10μm厚で、20~200mm²のサイズ)を使うことができます。
2. 300μlのミネラルオイルを加え、10秒間のボルテックスで十分に攪拌する。
3. 80℃で2分間のインキュベーションする。その後、室温に戻す。この間に、手順4のmaster mixを調製する。
4. Lysis Buffer、Proteinase K、Blue Dyeを下表のように調製し、master mixを作製する。
※ master mixは調製後1時間以内にお使いください。置き置きはしないでください。

試薬	1サンプル	サンプル数	合計
Lysis Buffer	224 μl	n + 2	224 x (n + 2) μl
Proteinase K	25 μl	n + 2	25 x (n + 2) μl
Blue Dye	1 μl	n + 2	1 x (n + 2) μl

5. 室温に戻したサンプルに、250 μ lのmaster mixを加え、5秒間のボルテックスで十分に攪拌する。
6. 層の分離のため、10,000 $\times$ g、20秒間の遠心を行う。
 - 水層(青色の下層部分)にペレットが確認できる場合、ペレットを懸濁するために、水層をピペットでおだやかに攪拌してください。
7. サンプルチューブを56 $^{\circ}$ Cのヒーティングブロックに移し、15分間のインキュベーションを行う。
8. サンプルチューブを80 $^{\circ}$ Cのヒーティングブロックに移し、1時間のインキュベーションを行う。
9. サンプルをヒーティングブロックから取り出し、室温で15分間放置し、十分に冷ます。
10. 下表のように、DNaseカクテルを調製する。

試薬	1サンプル	サンプル数	合計
MnCl ₂ , 0.09M	26 μ l	n + 2	26 x (n + 2) μ l
DNase Buffer	14 μ l	n + 2	14 x (n + 2) μ l
DNase I	10 μ l	n + 2	10 x (n + 2) μ l

11. 水層(青色)の部分に、50 μ lのDNaseカクテルを加え、10回のピペッティングでよく攪拌する。
12. 室温(15~30 $^{\circ}$ C)で15分間のインキュベーションを行う。
13. 最高スピードで2分間の遠心を行う。
14. 水層(青色)の部分迅速に、Maxwell RSCのカートリッジのウエル #1に移す。
 - RNA抽出が困難なサンプル(例：皮膚など)では、サンプルをカートリッジのウエル#1に入れた後、そのまま5分間のインキュベーションにより収量が増加することがあります。

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
 - カートリッジの側部に鋭利な箇所がありますので、取扱いには十分ご注意ください。
 - サンプル数が16以下の場合、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、50 μ lのNuclease-Free Waterを加える。
 - Elution Tubeを差し込む穴は、固定するため、挿入には少し押さえる必要があります。Elution Tubeは一番下までグッと強く押し込んでください。

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. (前章の手順14) 水層(青色)の部分迅速に、Maxwell RSCのカートリッジのウエル #1に移す。

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。
5. 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。

