

Maxwell[®] RSC miRNA Plasma and Serum Kit (カタログ番号 AS1680) 簡易マニュアル

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
- 37℃に設定したヒートブロックインキュベーター

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. 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。

サンプルの調製手順

A.

A. 血漿および血清

1. 100~500µlの血漿および血清を1.5ml遠心チューブに移す。
血漿および血清の液量が100µl以下の場合、Nuclease-Free Waterを100µl加えてください。
2. 80µl Proteinase K Solutionと230µl Lysis Buffer Cを加え、5秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。
3. 37℃で15分間のインキュベーションを行う。この間に、カートリッジの準備を行う。

B. エクソソームサンプル

1. 200µlまでのWaterまたはPBS以外のバッファーに懸濁したエクソソームサンプルを1.5ml遠心チューブに移す。
※ サンプル量が200µl以下の場合、Waterを加えて、200µlとなるように調製してください。
※ エクソソームがPBSに懸濁されている場合、75µl以上のPBSの持ち込みは収量低下につながります。
2. 80µl Proteinase K Solutionと230µl Lysis Buffer Cを加え、5秒間のボルテックスにより十分に攪拌する。
※エクソソームがLysis Buffer Cに懸濁されている場合、まず、合計で230µl Lysis Buffer Cとなるように、Lysis Buffer Cを加えてください。さらに、200µl Waterと80µl Proteinase K Solutionを加えてください。
例：100µl エクソソームを懸濁したLysis Buffer C + 130µl Lysis Buffer C + 200µl Water + 80µl Proteinase K Solution
3. 37℃で15分間のインキュベーションを行う。この間に、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、50μlのNuclease-Free Waterを加える。

Elution Tubeはグッと強く一番下まで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. カートリッジのウェル8に、ブランジャーを置く。

4. 10μlのDNase I 溶液をカートリッジのウェル4(黄色い試薬の入ったウェル)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、ウェル4内の液に直接加えてください。



5. インキュベーション後、ライセート全量をカートリッジのウェル1に添加する。

ウェル1は最も大きなウェルです。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。

2. カートリッジおよびブランジャーを廃棄する。