

Maxwell[®] RSC simplyRNA Blood Kit (カタログ番号 AS1380) 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

- 15mlコニカルチューブ
- 遠心機（15mlコニカルチューブ対応のスイングバケットローター）
- 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
- ディスポの10mlピペットおよびピペッター
- アイスブロックまたは氷

試薬の準備

1 – Thioglycerol/Homogenization Solutionの調製

1. 5mlのHomogenization Solutionあたり100μl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(1検体あたり10μl×検体数)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。

RNA抽出の手順

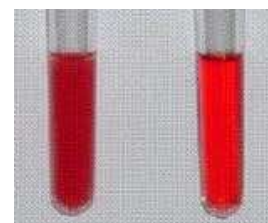
本製品には“Lysis”を製品名に含むボトルが2種類(*Cell Lysis Solution* と *Lysis Buffer*)入っています。取り換えには十分にご注意ください。

赤血球の溶血

- 1) 2.5mlの末梢血を十分に攪拌後、15mlコニカルチューブに移す。
- 2) 7.5mlのCell Lysis Solutionを加え、5~6回の転倒混和により十分に混ぜる。
- 3) 室温にて10分間のインキュベーションを行う。この10分間に転倒混和を2回行う。

末梢血は完全に溶血すると右図のように、透き通ったルビー色になります。

Cell Lysis Solutionは低張液です。プロメガでは、10分の溶血時間を推奨しています。溶血方法は、ご研究室の従来の手法に従い、変更していただいても問題ありません。



溶血前

溶血後

溶血した赤血球の除去 および 白血球ペレットの調製

4) 3,000×g、10分間の遠心を行う

プロメガでは、10分間の遠心時間を推奨しています。

遠心の条件は、ご研究室の従来の手法に従い、変更していただいても問題ありません。

低速(たとえば、2,000×g)や短時間(たとえば、5分程度)を常法としているユーザー様もいらっしゃいます。

5) チューブの底に白血球(白色の沈殿)があります。それを崩さないように、上澄みを取り除く。取り除く方法は、デカントでも、吸引でも結構ですが、白血球の沈殿を落とさないように、十分にご注意ください。

6) 壁面に付着した液を落とすために、もう一度軽く遠心(1分程度)し、今度はピペットを用いて、できるだけ上澄みを取り除く。

赤血球成分である赤色の沈殿が、若干ならば混じっていても全く問題ありません。

白血球の溶解

7) 冷却した200μlの1-Thioglycerol/Homogenization Solutionを細胞のペレットに加え、ペレットがなくなり細胞が溶解するまでボルテックスする。

ボルテックスの前にピペッティングで細胞ペレットを懸濁していただいても構いません。すべてのサンプルがそろうまで、細胞ライゼートは氷上で保存してください。

このステップにおいて、白血球の塊を完全に懸濁しておくことは、次のLysis BufferおよびProteinase Kを作用させるために、大変重要です。30秒以上の激しいボルテックスにより完全に白血球ペレットを懸濁してください。この懸濁が不十分な場合、収量の低下の原因となります。

8) 200μlのLysis Bufferおよび25μlのProteinase Kを加え、20秒間ボルテックスする。

9) 室温にて10分間のインキュベーションを行う。

カートリッジの準備

10) 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。

11) 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。

12) 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。

13) カートリッジのウエル8に、プランジャーを置く。

14) 10μl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、壁面に添加しても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。

15) 約420μlのライゼ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にあります。

16) 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。

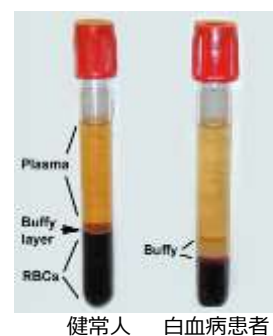


補足資料

バフィーコートからのRNA抽出

1. 採血管を遠心し、Buffy Coatを調製する。
2. 最大約400μlまでのBuffy Coatを1.5ml遠心チューブに移す

バフィーコートを移す際に、赤血球成分が若干含まれても、以降の抽出操作において著しい影響はありません。



3. 冷却した200μlの1-Thioglycerol/Homogenization Solutionを細胞のペレットに加え、ペレットがなくなり細胞が溶解するまでボルテックスする。
ボルテックスの前にピペティングで細胞ペレットを懸濁していただいても構いません。すべてのサンプルがそろうまで、細胞ライゼートは氷上で保存してください。

このステップにおいて、白血球の塊を完全に懸濁しておくことは、次のLysis BufferおよびProteinase Kを作用させるために、大変重要です。30秒以上の激しいボルテックスにより完全に白血球ペレットを懸濁してください。この懸濁が不十分な場合、収量の低下の原因となります。

4. 以下、前述の標準プロトコール(2ページ目のステップ8から再開)に従う。

PAXgene® TubeからのRNA抽出

Application Notes : Isolating RNA from Whole Blood Collected in PAXgene® Tubes

上記の Application Notes は、弊社ホームページより“simplyRNA”をキーワードにして検索してください。simplyRNAのサイトの“製品資料”より『PAXgene® チューブに採取した全血からの RNA 精製』をご覧ください。

溶血した赤血球の除去 および 白血球ペレットの調製

1. 室温、3,000×g、10分間の遠心を行う。
2. デカントで上澄みを取り除き、廃棄する。
3. 管内に残った若干量の液を使って、細胞をボルテックスで再懸濁する。
4. 5mlのNuclease-Free Waterを加え、ボルテックスで良く攪拌する。
5. 室温、3,000×g、10分間の遠心を行う。
6. デカントで上澄みを取り除き、廃棄する。
7. 壁面に付着した液を落とすために、もう一度軽く遠心(1分程度)し、今度はピペットを用いて、できるだけ上澄みを取り除く。

白血球の溶解

8. 冷却した200μlの1-Thioglycerol/Homogenization Solutionを細胞のペレットに加え、ペレットがなくなり細胞が溶解するまでボルテックスする。
ボルテックスの前にピペティングで細胞ペレットを懸濁していただいても構いません。すべてのサンプルがそろうまで、細胞ライゼートは氷上で保存してください。

このステップにおいて、白血球の塊を完全に懸濁しておくことは、次のLysis BufferおよびProteinase Kを作用させるために、大変重要です。30秒以上の激しいボルテックスにより完全に白血球ペレットを懸濁してください。この懸濁が不十分な場合、収量の低下の原因となります。

9. 以下、前述の標準プロトコール(2ページ目のステップ8から再開)に従う。