

Maxwell[®] RSC simplyRNA Tissue Kit (カタログ番号 AS1340) 簡易マニュアル 3次元培養ヒト皮膚モデルからのRNA精製

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またはチューブミキサー
- マイクロピペット（～20μl、～200μl、～1000μl）とそれらのチップ
- アイスブロックまたは氷箱

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精製の工程において、**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粉体もリンスする。
DNaseは物理衝撃に弱いため、ボルテックスは避けてください。
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℃で保存する。
10回までの凍結融解において、活性を維持できます。

サンプルの前処理

1. 必要本数分の1.5mLチューブに1-Thioglycerol/Homogenization Solutionを200μlずつ分注し、氷上で冷却しておく。

RNaseの酵素活性を抑えるため、良く冷やしておきます。

2. ヒト皮膚モデルをピンセットで剥がし、1のチューブに入れ、氷上で冷却を維持する。

1プレート分を目安に、本作業を行います。

3. 皮膚モデルが破砕（断片化）されるまで、5～10分間ボルテックスする。

長めのミキシングのため、ボルテックスアダプターやチューブミキサーの利用が便利です。

この段階では、完全に見えなくなるまでは破砕されませんが、モデルが破れてしっかり断片化すれば十分です。

* その日に精製を行わない場合は、ここで冷凍保存(-80℃を推奨)が可能です。

冷凍した場合は、氷上(2-10℃)で融解してから次のステップに進みます。

4. 200μlのLysis Bufferを添加し、皮膚モデル断片が見えなくなるまで1～2分間ボルテックスする。

このステップでしっかり混合することで、断片が見えなくなり、クリアなLysateになります。

効率的な精製、残存断片によるチップ詰まり防止のため、完全に溶解したことを確認してください。

Lysis Bufferを加えた後は、析出を避けるため、冷やさないでください。

5. 3ページ目の『カートリッジの準備』に進む。

* 本プロトコルは、株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリング(J-TEC)製 LabCyte EPI-MODEL24に最適化しています。それ以外のメーカーの皮膚モデルでは、ボルテックス条件等が変わる可能性がありますので、予備検討を行うことをお勧めいたします。

カートリッジの準備

1. サンプル数分のカートリッジをMaxwell® RSC/CSC Deck Trayにセットし、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、しっかりとはめ込む。

サンプル数が少ない場合には、できるだけMaxwell® RSC/CSC Deck Trayの中央付近をお使いください。

2. 同数のElution Tubeをセットし、50µlのNuclease-Free Waterを入れる。

Nuclease-Free Waterは30～100µlの範囲で入れることができます。ただし、30µlにした場合、溶出液中に磁性ビーズが残存しやすくなるため、**標準として50µl Nuclease-Free Waterでの溶出をお勧めします。**

注意：Elution Tubeのフタは絶対に閉めないでください。

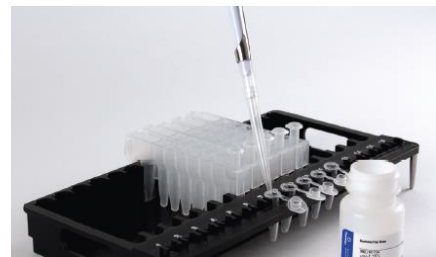
3. カートリッジのウェル8に、プランジャーを置く。

ウェル8は一番手前の形状が異なるウェルです。

4. 10µl のDNase I 溶液をカートリッジのウェル4に添加する。

ウェル4は、黄色い試薬の入ったウェルです。

DNase I溶液は、粘性があり壁面から自然落下しないため、ウェル4内の液に直接加えてください。



5. 全量のライセート (約400µl)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 Instrumentを起動し、Startから、『simplyRNA Tissue/AS1340』を選択する。

7. Maxwell® RSC/CSC Deck Trayを、Maxwell® RSC本体にセットにする。

8. セッティングの最終確認後、精製操作をスタートする。

- ☐ プランジャーがセットされている
- ☐ Elution Tubeが浮かずにセットされている
- ☐ Elution TubeにNuclease Free Waterが入っている

精製終了後の操作

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。

磁性体ビーズの混入がみられた場合、14,000xgで2分間の遠心操作により除くことができます。

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。