

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、600μl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。

植物からのRNA抽出の手順

標準プロトコール

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20-100mgを1.5mlチューブへ入れる。
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400ulのライセートを新しい1.5mlチューブへ移す。
*ライセートを保存する場合は、この時点で、-70℃保存する。
5. 200μlのLysis Bufferを加え、15秒間ボルテックスする。
6. 室温 10分間 インキュベーションする。
7. 遠心 (14,000g 2分) する。

注意1) ステップ4で先切チップがない場合は、先に遠心 (14,000g 2分) したのち、400ulのライセートを新しい1.5mlチューブへ移してもよい。

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を差し込む穴には、赤色のシリコンリングがありますので、Elution Tubeはグッと強く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、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. カートリッジのウェル8に、ブランジャーを置く。

4. 5µl 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。

サンプル量が多い場合は、10µl添加する。



5. 約600µlのライゼ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。

得られたRNAは、長期保存では-70℃に保存してください。24時間以内に使用するときには-20℃保存できます。

2. カートリッジおよびブランジャーを廃棄する。