

Maxwell[®] RSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit (カタログ番号 AS1570) 簡易マニュアル

“DNA→RNAの連続精製プロトコール”

ご用意いただくもの

- 1.5mlまたは2mlサンプルチューブ
- 90℃設定のヒートブロック
- 56℃設定のヒートブロック
- 微量高速遠心機 (10,000 xgが可能なもの)
- ピペットマン(P-20、P-200、P-1000)
- イソプロパノール
- オプション：清潔なカミソリ

DNase Iの準備

1. 凍結乾燥品のDNase Iのバイアルに、275μlのNuclease-Free Waterと15μlのBlue Dyeを加える。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もリンスする。
 - ※ 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、一度の実験で使用する分に小分け分注し、-20℃で保存する。
 - ※ 凍結融解は10回以上行わないで下さい。

FFPE切片の準備

1. FFPE切片をサンプルチューブに移す。
 - ※ FFPE切片は、1切片あたり厚さ20μmまで、計80μm分まで処理することができます。組織占有率やパラフィン量に応じて変動するため、適宜調整が必要です。
 - ※ スライドガラスに貼り付けられた切片を利用する場合には、スライドガラスから清潔なカミソリでそぎ落としてください。FFPE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。
 - ※ 20μmよりも厚みのあるFFPE切片では、Proteinase Kでの消化効率が低下します。

FFPE切片の前処理

1. 500 μ l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。
2. 90 $^{\circ}$ Cで5分間のインキュベーションを行う。その後、室温に戻す。この間に、手順3で使用するmaster mixを下表のように調製する。

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

3. 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。
4. 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。水層と油層が混ざらないように注意してください。
5. 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。
6. サンプルチューブを90 $^{\circ}$ 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。
 - ※ インキュベーションの間に、カートリッジの準備を行ってください。

カートリッジの準備

1. 検体数分のカートリッジを用意する。Maxwell[®] RSC/CSC Deck Tray にカートリッジの両端がカチツというまでしっかりとセットし、順にそのアルミシールを剥がす。
2. カートリッジと同数のElution Tubeをセットし、30~100 μ lのNuclease-Free Waterを加える。
 - ※ Elution Tubeは一番下までグッと強く押し込んでください。
 - ※ Elution Tubeの蓋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、プランジャーをセットする。

DNA抽出の工程

1. 90 $^{\circ}$ Cのインキュベーションが終了したサンプルチューブの水層(青色)をカートリッジのウエル1に移す。
 - ※ インキュベーション後に不溶性の物質を確認した場合、10,000 \times g、20秒間の遠心によりペレットダウンしてください。このペレットはカートリッジに移さないでください。
 - ※ 90 $^{\circ}$ Cのインキュベーション後、30分以内にDNA抽出の工程に進んでください。
2. Maxwell[®] RSCより、『XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential』のメソッドを選択する。
3. 操作画面にしたがい、Maxwell[®] RSC/CSC Deck Trayを、Maxwell[®] RSC本体にセットし、精製操作をスタートする。

DNA抽出終了後の操作

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を回収し、適切に保管する。
 ※ DNA抽出工程の完了後、2時間以内にRNA抽出の工程に進んでください。

RNA抽出の工程

1. 新しいElution Tubeをセットし、30~100µlのNuclease-Free Waterを加える。
 ※ Elution Tubeは一番下までグッと強く押し込んでください。
2. 以下の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	17 µl	n + 2	17 x (n + 2) µl
DNase I (Blue Dye含む)	10 µl	n + 2	10 x (n + 2) µl

3. 27µlのDNaseカクテルをウエル7に加える。
4. 500µlの100%イソプロパノールをウエル1に加える。
 ※ 小分子量RNAを精製する場合には、ウエル#1に1,200µl、ウエル7に375µlのイソプロパノールを加えてください。
5. Maxwell[®] RSC/CSC Deck Trayを、Maxwell[®] RSC本体に戻す。
6. 操作画面にしたがって、精製操作をスタートする。

RNA抽出終了後の操作

7. Maxwell RSC[®] Instrumentのドアを開け、Elution Tubeのフタを閉める。
8. Maxwell[®] RSC/CSC Deck Trayを取り出し、Elution Tubeを適切に保管する。
9. Maxwell RSC[®] Instrumentのドアを閉める。カートリッジとプランジャーを施設のガイドラインにしたがって廃棄する。

技術的なお問合せは：

e-mail: prometec@jp.promega.com · Tel: 03-3669-7980 · Fax: 03-3669-7982