

SOP 番号 GEN103

Ver.5

標準操作手順書

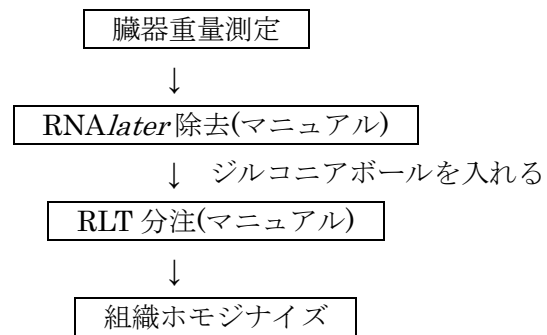
臓器重量測定及び組織ホモジナイズ

承認 _____ 年 月 日

目 次

| 分類 | 項目 | ページ |
|-----------------|------------------|-----|
| GEN103 Ver.5 | 臓器重量測定及び組織ホモジナイズ | |
| | 作業手順 | 1 |
| | 1.序 | 2 |
| | 2.試薬、器具及び機器 | |
| | 2-1.試薬 | 2 |
| | 2-2.器具 | 2 |
| | 2-3.機器 | 2 |
| | 3.試薬の調製 | 2 |
| | 4.臓器重量測定 | 2-5 |
| | 5.RNAlater 除去 | 6 |
| 6.組織ホモジナイズ | 6-7 | |

作業手順



1 序

本 SOP には、臓器重量測定から組織のホモジナイズまでの操作手順を記載する。

2 試薬、器具及び機器

2-1 試薬

- 1) RNeasy®Mini Kit (QIAGEN、cat.# 74106:250 検体用)
Buffer RLT 220 mL
使用期限：購入後 1 年
- 2) 2-Mercapto Ethanol (Sigma、cat.# M-6250、冷蔵保存)
使用期限：購入後 3 年、開封後 1 年

2-2 器具

- 1) ジルコニアボール (アズワン、cat.# YTZ-5)

2-3 機器

- 1) 電子天秤 (島津製作所、AW220)
- 2) アスピレーター (MARKOS MEFAR、SP30)
- 3) ミキサーミル (QIAGEN、MM300)
- 4) テーブルトップ多本架冷却遠心機 (QIAGEN、4K15C)

3 試薬の調製

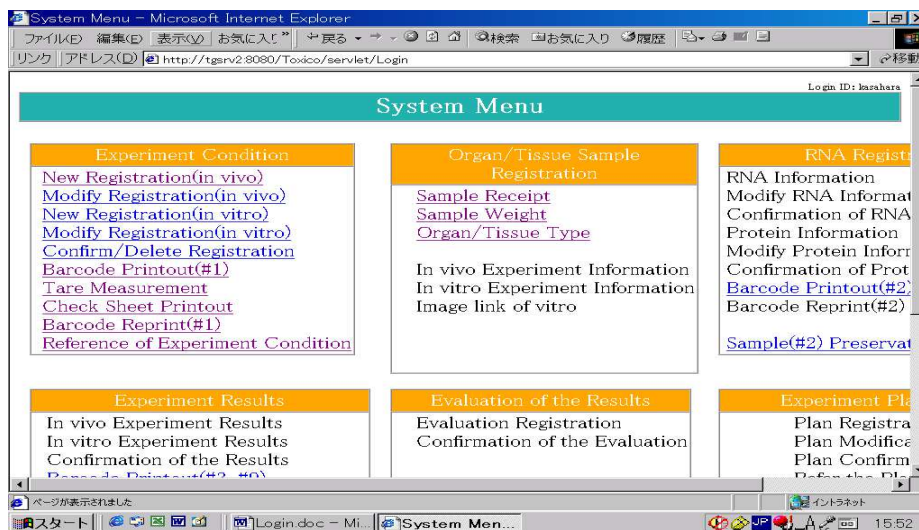
3-1 Buffer RLT

- 1) 1 mL Buffer RLT あたり 10 µL の 2-メルカプトエタノール(2-ME)を添加し使用する。室温保存、調製後 1 ヶ月間安定。
注) 2-ME は毒性があるので手袋、マスクを着用し取り扱うこと。

4 臓器重量測定

- 1) フリーザーから、秤量するサンプルを取り出す。
- 2) サンプルを室温で融解する。融解後、タッピングして *RNAlater* 中に結晶状析出物がないことを確認する。なお、*RNAlater* 中をサンプルが浮いていても室温で融解するためそのまま使用し、結晶状析出物が認められる場合は工程責任者に連絡する。

- 3) 天秤のスイッチを入れ、PC を起動する。
- 4) User ID:TGP、ログオン先:TGP を選択して、パスワードを入力し、Windows2000 を起動する。Internet Explorer をクリックし、「Login ID」及び「パスワード」を入力する。
- 5) 「System Menu」の「Organ/Tissue Sample Registration」から「Sample Weight」を選択しクリックする。



- 6) 「List of Gross Weight」から、秤量を行う試験を選択(EXP ID にチェックを入れる)し、「OK」をクリックする。



- 7) Factor(mg)に「-30」を入力する(30 mg : 割付シールの重量)。

Input of Gross Weight

Person : Atsushi Ono
 Experiment No. : 0045
 Experiment Division : Vivo
 Experiment Name : Acetaminophen_repeat_12wk(FDSC)
 Experiment Plan Date : 2002/12/13
 Experiment Protocol : 本試験(反復投与)
 Chemical : AAP
 Species : Rat
 Count/Total : 02 /1200
 Factor[mg] : -30
 Barcode :
 Gross Weight[ug] :

SAVE

| No. | Sample Barcode | Tare Weight[mg] | Gross Weight[mg] | Factor[mg] | Material Weight[ug] |
|-----|----------------|-----------------|------------------|------------|---------------------|
| 1 | 00430111PA1- | | | | |
| 2 | 00430111PB1- | | | | |
| 3 | 00430111PC1- | | | | |
| 4 | 00430111RA1- | 1737.60 | | | |
| 5 | 00430111RB1- | 1746 | | | |
| 6 | 00430111RC1- | 1730.60 | | | |
| 7 | 00430111PA1- | | | | |

- 8) Barcode カラムにカーソルを移動させ、チューブのバーコードをスキャナーでスキャンする。(マニュアルによる入力も可能)。

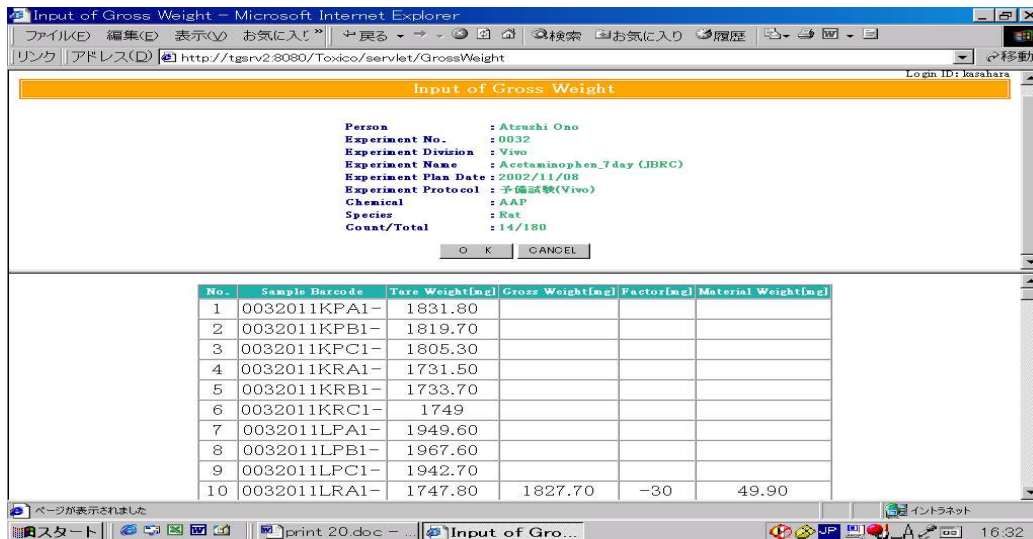
- 9) チューブを電子天秤に載せる、重量が自動的に入力される。

秤量前に天秤の重量表示が 0 mg でないと、チューブサンプル重量が自動入力されない。チューブを天秤に載せる前に天秤の「TARE」を押し、0 mg にする。

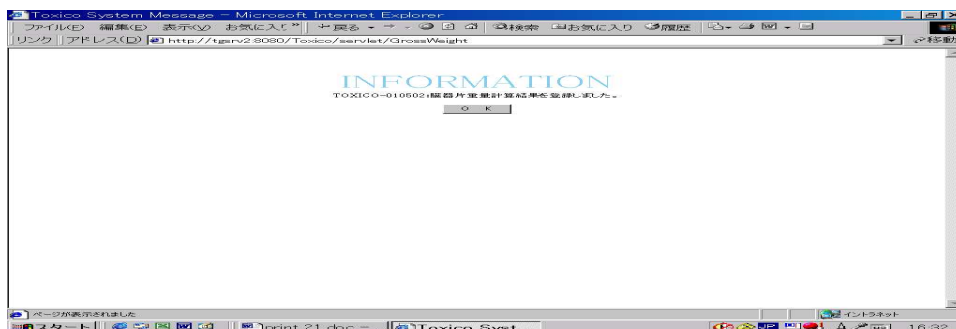
注) 各個体の組織重量が 32 mg 以下のサンプルがある場合は (A、B、C 全ての切片が 32 mg 以下の場合も) 工程責任者に連絡する。また、イレギュラー切片を使用した場合はいかなる理由でどの切片を使用したかを実験書に記入。A、B、C 全ての切片が 32 mg 以下の場合は、重量の軽い 2 サンプルを合わせて使用し、サンプル ID には順番の早い方のアルファベットを使用する。

- 10) 約1時間毎に、「Save」をクリックしデータを保存する。「Save」をクリックし以下の画面が表示される。「OK」をクリックする。

注) 「OK」をクリックするまでデータは保存されない。



- 11) 以下の画面が表示され、「OK」をクリックするとデータの保存が完了する。



- 12) Logout 後、電子天秤と PC の電源を切る。

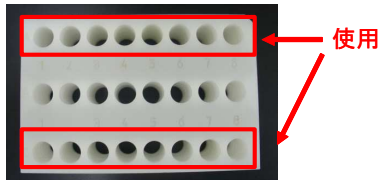
注) 作業終了時に Logout を怠ると、Login 状態が維持される。その為、次回作業時に、前回と同じ「Login ID」及び「パスワード」を入力しなければ Login が出来なくなる。

5 RNAlaterの除去及びRLTの分注

- 1) アスピレーターを用いて RNAlater を吸引除去する。
実験記録書に従い、サンプルチューブのフタに通し番号を記入する。アスピレーターのチューブの先にピペットチップを装着し、RNAlater の吸引を行う。チップは群毎に交換する。

注) この時、組織を吸引しない様に注意すること。また、結晶がある場合は RNAlater で完全に溶解させて結晶を取り込まないようにすること。

- 2) ミキサーミルアダプターにサンプルチューブをセットする。
サンプルチューブは、アダプターの外側の列にセットする。中央の列を使用しないこと。



- 3) ピンセット（先端火炎滅菌後使用）で、各サンプルチューブにジルコニアボールを1個ずつ入れる。なお、作業手順は 1) →3) →4) →2) の順で行う。

- 4) 下表に従って調製した Buffer RLT(1% 2-ME 含有)を 400 μL ずつ分注する。

注) 分注器は使用しないこと。後に測定する DNA 量に関係してくる為、確実に 400 μL 分注すること。

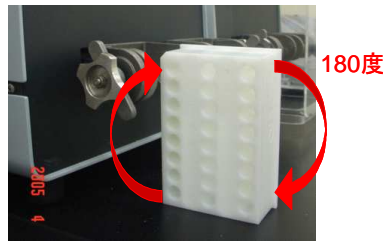
使用期限 ; 2-ME 添加後 1 ヶ月以内

| | | | |
|------------------------|---------|---------|----------|
| Buffer RLT(1% 2-ME 含有) | 1 本分 | 25 本分 | 49 本分 |
| Buffer RLT | 0.66 mL | 16.5 mL | 32.34 mL |
| 2-Mercapto Ethanol | 6.6 μL | 165 μL | 323.4 μL |

6 組織ホモジナイズ

- 1) サンプルチューブの入ったアダプターにフタをし、ミキサーミルにセットする。
左右のサンプルの位置が対称となるようにセットし、二段のねじを確実に締める。
- 2) 本体後部のミキサーミルのスイッチを入れる。
- 3) 設定値を確認する(室温、25(1/2) Hz、3分)。「start」キーを押し、組織をホモジナイズする。

- 4) 終了後、チューブの破損や液漏れがないことを確認後、ミキサーミルアダプターの向きを180度回転させ（左右が逆になるよう）再度、同条件でホモジナイズする。



- 5) 組織が完全にホモジナイズされていることを確認する(組織片が残っている場合は工程責任者へ連絡)。また、この時にチューブの破損や液漏れがないことも確認する。異常がある場合は、工程責任者に連絡する。
- 6) チューブ内の泡を落とす為に、テーブルトップ多本架冷却遠心機を用いて、室温、300 G で1分間遠心する。
- 7) DNA 量測定用サンプルの分取を行う([SOP/GEN106]参照)。
分取直前にボルテックスミキサーにより攪拌すること。
- 8) 残りの組織ホモジナイズ液の入ったチューブは、必要事項 (EXP ID, Working ID、日付) を記載した Box に入れ-80°Cで保存し、冷蔵庫備え付けの保存管理表へ記入する。

以下余白