

SOP 番号 GEN105-4

Ver.2

標準操作手順書

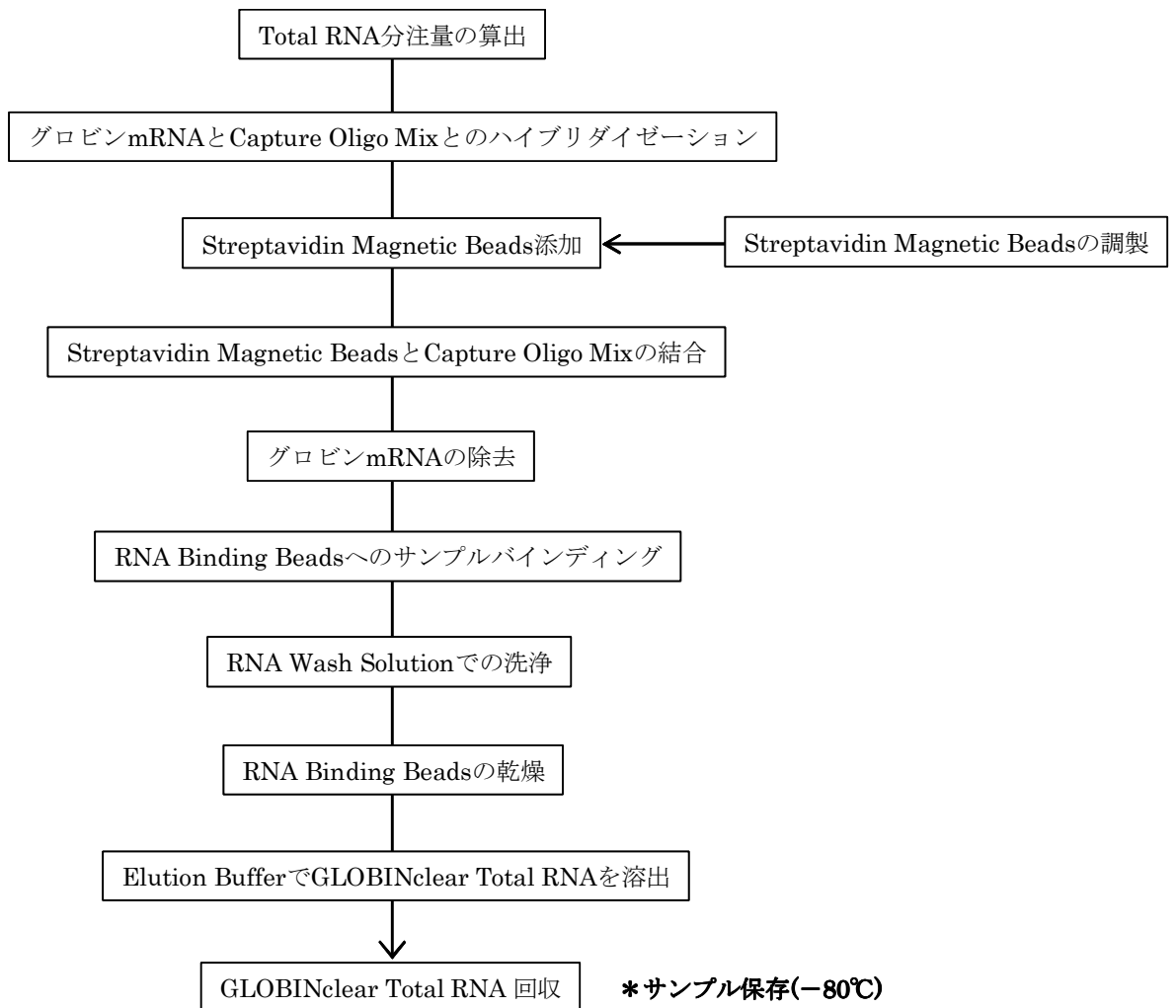
グロビン RNA 除去

承認 _____ 年 月 日

目 次

分類	項目	ページ
GEN105-4 Ver.2	全血からの total RNA 抽出	
	作業手順の流れ図	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	3
	4.グロビン RNA 除去	
	4-1. Streptavidin Magnetic Beads の調製	4
4-2.グロビン RNA 除去	4-7	

作業手順の流れ図



1 序

本プロトコールでは、末梢血から PAXgene Blood RNA Kit で RNA を抽出した後の、グロビン RNA 除去法について記載する。

2 試薬、器具及び機器

2-1 試薬

- 1) GLOBINclear™ (Ambion, cat.# 1981)
 - ・ Capture Oligo Mix -20℃保存
 - ・ 2X Hybridization Buffer 室温保存
 - ・ Streptavidin Bead Buffer 室温保存
 - ・ Nuclease-free Water
 - ・ RNA Wash Solution Concentrate 室温または冷蔵保存
 - ・ Elution Buffer 室温または冷蔵保存
 - ・ RNA Bead Buffer 室温保存
 - ・ RNA Binding Buffer Concentrate 室温保存
- 2) 2-プロパノール (ナカライテスク, cat.# 29113-95 等、特級：99.5%以上)
室温保存 使用期限：購入日から 3 年
- 3) エタノール(和光純薬工業, cat.# 057-00456 等、特級、規格：99.5%以上)
室温保存 使用期限：購入日から 3 年

2-2 器具

- 1) GLOBINclear™ (Ambion, cat.# 1981)
 - ・ Streptavidin Magnetic Beads 冷蔵保存 (凍結してはいけない)
 - ・ RNA Binding Beads 冷蔵保存 (凍結してはいけない)
- 2) 1.5 mL Non-stick Tubes
- 3) マグネティック・スタンド (Ambion, cat.# AM10055)

2-3 機器

- 1) スイングローター型遠心機
- 2) ヒートブロック (エッペンドルフ；サーモミキサーコンフォート、タイテック；
DryThermoUnit DTU-N)
- 3) 微量高速冷却遠心機(トミー工業株, MX-300)

3 試薬の調製

1) RNA Binding Buffer 使用期限：調製後1ヶ月、室温保存

RNA Binding Buffer Concentrate に 2 mL の 100%イソプロパノールを添加し、よく攪拌する。ボトルに、添加したことをチェックする。室温保存。

2) RNA Wash Solution 使用期限：調製後1ヶ月、室温保存

RNA Wash Solution Concentrate に 4 mL の 100%エタノールを添加し、よく攪拌する。ボトルに、添加したことをチェックする。室温保存。

3) Bead Resuspension Mix

下表に従い、mix を調製する。1.5 mL チューブに RNA Binding Beads および RNA Bead Buffer を添加し、軽くタッピングで攪拌する。100%イソプロパノールを加え、ボルテックスにて攪拌する。室温保存。

	1 本	11 本	25 本
RNA Binding Beads	10 μ L	110 μ L	250 μ L
RNA Bead Buffer	4 μ L	44 μ L	100 μ L
100%イソプロパノール	6 μ L	66 μ L	150 μ L

4) 2X Hybridization Buffer

50°Cのインキュベーターを用意する。2X Hybridization Buffer を 50°C で 15 分以上、インキュベートする。

5) Streptavidin Bead Buffer

50°Cのインキュベーターを用意する。Streptavidin Bead Buffer を 50°C で 15 分以上、インキュベートする。

6) 80%(v/v) エタノール

使用期限：調製後1ヶ月、室温保存。

50mL 容ディスポーザブルチューブ等に、100%エタノールと DEPC 処理水を 4 : 1 の比で混合する。エタ沈で使用前に 4°C で冷やしておく。

例) 100%エタノール : DEPC 処理水 = 40mL : 10mL

4 グロビン RNA 除去

以下、Ambion GLOBINclear Kit のプロトコールに準ずる。

GLOBINclear Kit は 1-10 µg の RNA を最大液量 14 µL まで処理できる。

つまり、上記条件に適した RNA 溶液を調整する必要がある。

4-1 Streptavidin Magnetic Beads の調製

※ ビーズをスピンドアウンする際は、1,000 x g 以下で行うこと

- 1) Streptavidin Magnetic Beads をボルテックスでよく攪拌して 1,000 G 以下でスピンドアウンする。下表の通り 1.5 ml Non-stick Tube に用意する。

注) 1 本のチューブで 20 サンプル分まで調整可能。

	1 本	11 本	21 本
Streptavidin Magnetic Beads	30 µL	330 µL	630 µL

- 2) チューブを Magnetic Stand に置いて、透明になるまで、3-5 分間静置する。
- 3) ピペットで上清を注意深く吸い取り、チューブを Magnetic Stand からはずす。
- 4) 上記 Streptavidin Magnetic Beads の液量と同量の Streptavidin Bead Buffer を加える。
- 5) ビーズが再懸濁するまで、ボルテックスにて激しく攪拌する。
- 6) Streptavidin Magnetic Beads を 15 分間以上 50°C でインキュベートする。

4-2 グロビン RNA 除去

※ ビーズをスピンドアウンする際は、1,000 x g 以下で行うこと

- 1) [SOP-GEN107]に従って 10 µg/14 µL になるように RNA 溶液と RNase-free Water の液量を算出する。
- 2) -80°C で保存してある RNA 溶液サンプルを取り出し、融解後タッピングしてスピンドアウンする。
- 3) 1.5 mL 容マイクロチューブ（蓋に識別番号を記載）に、1)で算出した液量の RNase-free Water と RNA 溶液を分注する。

注) 分注は 1) RNase-free Water → 2) サンプルの順番で添加する。

- 4) 1 μ L の *Capture Oligo Mix (mouse or rat RNA)* を加え、タッピングで混合した後、スピンドウンする。
- 5) 15 μ L の 50°C で pre incubate した 2X Hybridization Buffer をサンプルに加え、ボルテックスし、スピンドウンする。
- 6) 50°C で 15 分間インキュベートして、ハイブリダイゼーションを行う。
- 7) 4-2 で準備した Streptavidin Magnetic Beads を穏やかにボルテックスし、懸濁する。
- 8) 1,000 x g 以下で 1 秒間スピンドウンする。
- 9) 30 μ L の Streptavidin Magnetic Beads を 6) でインキュベートしたサンプルに加える。
- 10) ボルテックスし、1,000 x g 以下で 1 秒間スピンドウンする。
- 11) 液がはねないように、タッピングで静かに懸濁させる。
- 12) 50°C で 30 分間インキュベートする。
注) この間に Bead Resuspension Mix を調製する。
- 13) 軽くボルテックスし、1,000 x g 以下で 1 秒間スピンドウンする。
- 14) Magnetic Stand にチューブをたて、透明になるまで 3-5 分間静置する。
- 15) ピペットで上清を注意深く採取し、新しい 1.5 mL Non-stick Tube に移す。
- 16) チューブを氷上に置く。
- 17) Elution Buffer を 58°C で pre incubate する。
- 18) 100 μ L の RNA Binding Buffer をサンプルに加える。

- 19) **Bead Resuspension Mix** をボルテックスし、すぐに、サンプルに **20 μ L** ずつ加える。
注) よく懸濁された **Bead Resuspension Mix** をサンプルに加える。
- 20) サンプルを 10 秒間激しくボルテックスする。
- 21) **1,000 x g** 以下で 1 秒間スピンドウンする。
- 22) **Magnetic Stand** にチューブをたて、透明になるまで **3-5 分間** 静置する。
- 23) 上清を注意深く吸引除去する。
注)このステップでできるだけ、上清を除去する。
- 24) **200 μ L** の **RNA Wash Solution** をサンプルに加え、最大 **10 秒間**ボルテックスする。
注) **RNA Binding Beads** は完全に分散しないが、**wash** に影響しない。
- 25) **1,000 x g** 以下で 1 秒間スピンドウンする。
- 26) **Magnetic Stand** にチューブをたて、透明になるまで **3-5 分間** 静置する。
- 27) 上清を注意深く吸引除去する。
- 28) **1,000 x g** 以下で 1 秒間スピンドウンする。
- 29) **Magnetic Stand** にチューブをたてる。
- 30) ピペットでできるだけ液体を除去する。
- 31) **Magnetic Stand** からチューブを取り外し、キャップを開けたまま、**5 分間** 静置する。
注)この過程は **5 分以内**
- 32) 17)で **58°C**で **pre incubate** した **Elution Buffer** を **30 μ L** ずつサンプルに加える。
- 33) **RNA Binding Beads** が再懸濁するまで、最大 **10 秒間**激しくボルテックスする。

- 34) 58℃で5分間インキュベートする。
- 35) RNA Binding Beads が再懸濁するまで、最大10秒間激しくボルテックスする。
- 36) 1,000 x g 以下で1秒間スピンドウンする。
- 37) Magnetic Stand にチューブをたて、透明になるまで3-5分間静置する。
注) このステップでは、特に RNA Binding Beads の混入を避ける
- 38) 新しい1.5 mL Non-stick Tube(キアゲン純正品またはキット付属品)に上清を移す。
- 39) RNA Binding Beads の混入が見られたら、遠心(10,500 rpm, 1 min, 室温)して、新しいチューブへ上清を再度移す。
- 40) 冷却遠心濃縮機で30分間遠心濃縮する。
注) 遠心濃縮機のスイッチを使用の1時間半以上前に on にしておくこと
- 41) Multiskan Spectrum による RNA 濃度の測定を行う。(GEN107 参照)
- 42) OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比、濃度のばらつき、975 nm の値、900 nm の値を確認する。
(最低、500 ng/μL 以上の濃度が必要)
異常があった場合は、Gene Quant による再測定を行う。
- 43) 工程責任者の確認。
- 44) RNA 電気泳動を行う。(GEN108 参照)
total RNA の場合は、28 S 及び 18 S ribosomal RNA のバンドを確認する。RNA が分解している場合は、工程責任者に連絡する。
- 45) 工程責任者の確認。
- 46) -80 度で保存する。

以下余白