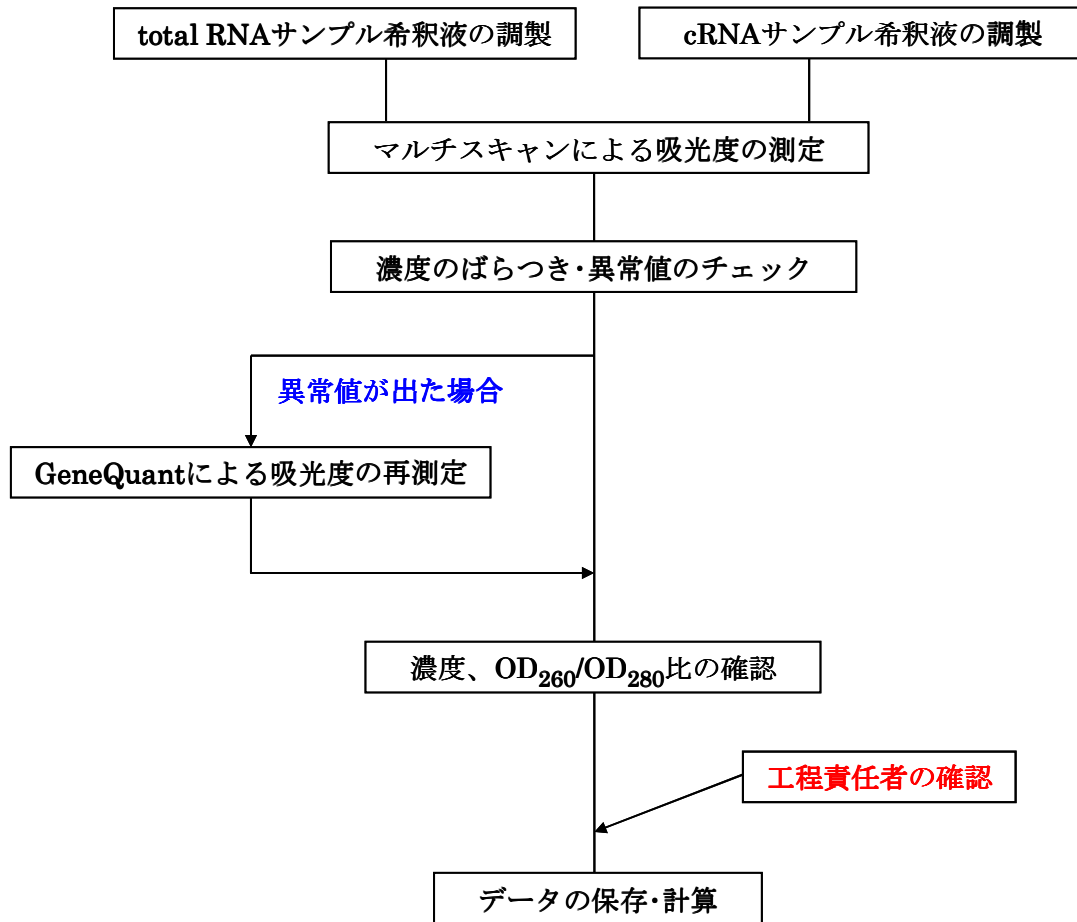


目 次

分類	項目	ページ
GEN107	作業手順の流れ図	1
Ver.5	1. 序	2
	2. 試薬・器具	2
	3. 使用機器	2
	4. RNA サンプル希釈液の調製	2
	5. Multiskan による RNA 濃度の測定	2-4
	6. Gene Quant による RNA 濃度の再測定	5

作業手順の流れ図



1 序

本 SOP は、Multiskan spectrum(Thermo Labsystems)による total RNA および cRNA の吸光度測定法、並びに Gene Quant pro (Amersham Pharmacia Biotech)による吸光度の再測定法について記載する。

2 試薬・器具

- 1) 96 well UV 透過マイクロプレート (FALCON cat.# 353261)
- 2) TE Buffer(Invitrogen P/N.12090-015 等)
使用期限：購入日から1年以内、開封後：3ヶ月以内
使用状況により、開封時に DNase/RNase フリーコンカルチューブ (50 mL: TPP(BM), cat.# 91051, 100 mL: IWAKI, cat.# 2355-100 または同等品) に分注する。使用期限は、分注したコンカルチューブ初回使用時より3ヶ月とする。
- 3) マイクロピペッター、チップ、0.5 mL 容マイクロチューブ、ラック

3 使用機器

- 1) Multiskan Spectrum(Thermo Labsystems)
- 2) Gene Quant pro(Amersham Pharmacia Biotech)

4 サンプル希釈液の調製


- 4-1 total RNA(in vivo)サンプル希釈液の調製
0.5 mL 容マイクロチューブに TE を 198 μ L 分注後、total RNA 溶液を 2 μ L 加えて 100 倍希釈を行う。ボルテックスミキサーで十分に混合し、スピンドウンする。
- 4-2 total RNA (in vitro)及び cRNA サンプル希釈液の調製
0.5 mL 容マイクロチューブに TE を 199 μ L 分注後、cRNA 溶液を 1 μ L 加えて 200 倍希釈を行う。ボルテックスミキサーで十分に混合し、スピンドウンする。

5 Multiskan Spectrum による RNA 濃度の測定

- 1) Multiskan Spectrum 本体のスイッチを **ON** にする (光源を安定させるために測定開始の少なくとも 20 分前にスイッチを入れる)。
- 2) Multiskan Spectrum に接続している PC を起動する。

- 3) 96 well UV 透過マイクロプレートの底面にゴミ、汚れ及び傷が無いことを確認する。ゴミ等が付着している場合は、エアダスターを吹きかけて、埃等を飛ばしてから使用する。汚れや傷がある場合、新しいプレートを使用する。
- 4) 下表に従い、96 well UV 透過マイクロプレートにサンプルを 99 μ L ずつ分注する。Blank の well には TE を 99 μ L 分注する。サンプルは A3 から分注し、測定は duplicate で行う。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank		# 1		# 9		# 17					
B			# 2		# 10		# 18					
C			# 3		# 11		# 19					
D			# 4		# 12		# 20					
E			# 5		# 13		# 21					
F			# 6		# 14		# 22					
G			# 7		# 15		# 23					
H			# 8		# 16		# 24					

 サンプルを分注しない well。

- 5) デスクトップの「**Multiskan Spectrum**」アイコンをクリックする。
 - 6) 「**Self Test Results**」ダイアログボックスは、「**Close**」を選択してダイアログボックスを閉じる。
- 5-1 total RNA (in vivo) サンプルの測定
- 1) 選択ツリーの「Reader Protocols」から「Predefined Protocol」の「Toxico」を選択する。
(「Show Toxico」を開き、「Blanks」タブをクリックすると Blank の位置、「Plate Map」タブをクリックするとサンプルの位置の確認を行うことが出来る)
 - 2) 「**Plate out**」ボタンをクリックし、マイクロプレートをアームにセットする。
 - 3) 「**Start Toxico**」をクリックし測定を開始する。
- 5-2 totalRNA(in vitro)及び cRNA サンプルの測定
- 4) 選択ツリーの「Reader Protocols」から「Predefined Protocol」の「cDNA」を選択する。
 - 5) 「**Plate out**」ボタンをクリックし、マイクロプレートをプレートキャリアにセットする。
 - 6) 「**Start cRNA**」をクリックし測定を開始する。

5-3 測定終了後、260 nm、280 nm、975 nm(水の吸収、光路長の補正)、900 nm(プレートの吸収)及び濃度の結果レポートが表示される。

- 1) 「**Export**」ボタンをクリックし、レポートを保存する。
ファイル名は、W + **Working ID**+アルファベット (一回目の **total** の場合は **A**、二度目は **B**、**cRNA** の場合は **C**)とし、測定したサンプルに応じて決められたフォルダに保存する。

Working ID ; 00789 の場合
totalRNA (一回目) ; W00789A
totalRNA (二回目) ; W00789B
cRNA ; W00789C

- 2) 保存後、「**Remove**」ボタンをクリックし、レポートを消去する。
- 3) 「**Plate In**」をクリックし、Multiskan Spectrum のプレートトレイを収納する。
- 4) Multiskan Spectrum 本体のスイッチを **OFF** にする。
- 5) アプリケーションを終了し、PC の電源を切る。
- 6) ファイルサーバーに接続している PC で、測定結果のレポートを実験管理マクロ (Excel)で開き、total RNA 測定の場合は 5 µg 相当の total RNA を含む液量、cRNA の場合は、32 µg 相当の cRNA を含む液量、および添加する RNase Free Water 量の計算を行う。

使用する実験管理マクロ
total RNA (一回目) ; totalRNA 量計算－前半
total RNA (二回目) ; totalRNA 量計算－後半
cRNA ; cRNA 量計算

- 7) OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比、濃度のばらつき、975 nm の値、900 nm の値を確認する。
異常があった場合は工程責任者に連絡し、Gene Quant による再測定を行う(5 項参照)。

total RNA 濃度が 500 µg/mL 未満、cRNA 濃度が 1,500 µg/mL 未満、そして OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比が 2.3 以上あるいは 1.9 未満となった場合はエラーが示される。サンプル番号を工程責任者に連絡し、対応指示を受ける。

6 Gene Quant による RNA 濃度の測定

- 1) Gene Quant 本体のスイッチを **ON** にする。
- 2) THERMAL PRINTER のスイッチを **ON** にする。
- 3) セルを洗浄した際の水滴が残っていないことを確認する。
- 4) 「シヨウカノウデス」の表示が出たら、set-up ボタンを押し
ソクテイビ
サンプル No. (通常 1 から)
シュツリョクモード **Printer**
オートプリント **オン**
スキャン **オフ**
ヒョウジゲンゴ **ニホンゴ**
ヒツケプリント **ハイ**
ソウサオン **オン**

の各項目を入力または選択し、**enter ボタン**を押す。

- 5) RNA ボタンを押して「キシヤクリツ」を確認する。訂正する場合は **set-up ボタン**を押して数値を入力後、**enter ボタン**を押す。

希釈率 total RNA(in vivo) : 100
total RNA(in vitro) : 200
cRNA : 200

- 6) セルに TE を 70 μ L 以上入れて Gene Quant にセットする (ブランク測定)。
- 7) **set ref ボタン**を押してリファレンスの測定を行う。測定後セルを取りだし TE を捨てる。セルの中に TE が残っていないことを確認する。
- 8) 再測定サンプルを 2 つの well から等量とり 1 つに合わせ、よく混合する。
- 9) セルに測定したいサンプルを 70 μ L 以上分注する。
- 10) **ENTER** または **RNA** ボタンを押し、測定を開始する。
- 11) 測定結果が自動的に印刷される。「Working ID」、「サンプル番号」、「測定者」を記入し、実験記録書に貼付する (測定結果は感熱紙に印刷されるため、コピーを「Total RNA 計算結果」シートに貼付する)。結果を工程責任者に連絡する。
- 12) 測定終了後、セルを取り出し、セルからサンプルを取り除く。セルを MilliQ 水で十分に洗浄した後、乾燥させて保管する。
- 13) Gene Quant 本体及び THERMAL PRINTER の電源を **OFF** にする。

以下余白