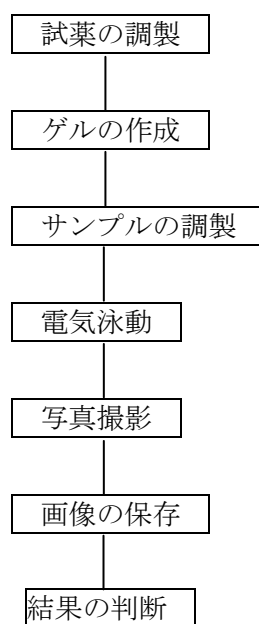


目 次

分類	項目	ページ
GEN108	作業手順の流れ図	1
Ver.5	1. 序	2
	2. 試薬・器具	2-3
	3. 使用機器	3
	4. 1×TAE 泳動 Buffer の調製	3
	5. 1%アガロースゲルの作製	3-4
	6. 泳動用サンプルの調製	4-5
	7. total RNA の変性	5-6
	8. 電気泳動	6
	9. ゲルの撮影 (アトー画像検出システム)	7-11
	10. 結果の判定	12

作業手順の流れ図



1 序

本 SOP は、アガロースゲルによる RNA の電気泳動について記載する。電気泳動は、抽出 RNA の品質チェック及び断片化 RNA のチェックの際に行う。なお、RNA の泳動の際には RNase の混入に十分注意する。

エチジウムブロマイドは発がん性物質であるため、取り扱いには十分に注意する。

2 試薬・器具

2-1 試薬

- 1) 50×TAE Buffer (GIBCO、cat.# 24710-030 等、室温保存)
使用期限：購入日から 1 年以内、開封後：6 ヶ月以内
- 2) アガロース (Sigma-Aldrich、TypeI、cat.# A 6013 等、室温保存)
使用期限：購入日から 3 年以内
- 3) Loading Buffer (ニッポンジーン、cat.# 313-90111 等、室温保存)
使用期限：購入日から 1 年以内、開封後：6 ヶ月以内
メーカー推奨の希釈濃度は、サンプルの 1/5～1/10 量である。
Loading Buffer のグリセロール濃度は 50% であり、1/10 希釈した場合でも final 5% なので問題はない。
- 4) DNA サイズマーカー OneSTEP Ladder 1kb(1-10kbp) (ニッポンジーン、cat.# 310-05371、セットパック (500 μ L×3 袋); cat.# 310-05373 等、冷蔵保存)
使用期限：購入日から 1 年以内、開封後：6 ヶ月以内
- 5) 10 mg/mL エチジウムブロマイド溶液 (Invitrogen、cat.# 15585-011 等、室温保存)
使用期限：購入日から 3 年以内
- 6) TE Buffer (pH.8.0) (Invitrogen、cat.# 12090-015 等)
使用期限：購入日から 1 年以内、開封後：3 ヶ月以内
- 7) Destaining bags(MolecularReagents、cat.# 5459.25 ; フナコシ扱い等)
エチジウムブロマイドを除去するために使用
使用期限：購入日から 5 年以内

2-2 器具

- 1) 電気泳動装置 (ミューピット)
- 2) 電子レンジ
- 3) 三角フラスコ、サランラップ
- 4) ゲルトレイ、コーム (40 mL、25 well 用)

- 5) マイクロピペッター、連続分注機、チップ、マイクロチューブ、ラック
- 6) PCR 用 8 連チューブ(Porex Bio product、cat.# 435 等)
- 7) 電子天秤、薬包紙
- 8) 泳動写真撮影用紙(SONY、cat.#UPP-110HD)

3 使用機器

- 1) アトーゲル画像検出システム (アトー株式会社)
- 2) PCR サーマサイクラー(PTC-200、MJ Reserch Japan)

4 1×TAE 泳動 Buffer の調製

下表に従って 50×TAE Buffer とミリ Q 水を混合し、1×TAE 泳動 Buffer を調製する。

	0.3 L 分	0.6 L 分	1 L 分	2 L 分
50×TAE	6 mL	12 mL	20 mL	40 mL
ミリ Q 水	294 mL	588 mL	980 mL	1960 mL

注) 1 回の電気泳動で約 300 mL の泳動 Buffer を必要とする

5 1%アガロースゲルの作製 (Mupid ゲルトレイ大 1 枚分、40 mL)

- 1) 100 mL の三角フラスコにアガロース 0.4 g を秤量する。汚染を防ぐために、アガロースをはかり取るときはスパーテルを使わない。余分にとったアガロースは、ボトルに戻さない。
- 2) 1×TAE 泳動 Buffer を 40 mL 加え、よく混ぜる。
- 3) 三角フラスコの口をサランラップ等 (チップ等で空気穴を開けておく) または、丸めたキムワイプで覆う。
- 4) 電子レンジ(800 W)で 30 秒加熱する。電子レンジから取り出し、三角フラスコ底面を回すようにしてよく混ぜる。なお、熱せられたアガロース溶液は混ぜたときに突沸する場合がありますので十分注意する。
- 5) さらに電子レンジで加熱を行い、沸騰したところで止めよく混ぜる。完全にアガロースが溶けるまで電子レンジで加熱を行う (3 回程度沸騰させる。複数枚のゲルを作製する場合、3 回の沸騰でもアガロースが溶けきらない場合がありますので注意する)。

- 6) 電子レンジから取り出した三角フラスコをよく回転させる。手で触れられる位まで冷まして(55℃位)から、10 mg/mL エチジウムブロマイド (EtBr) 溶液を 2 μ L (最終濃度 0.5 μ g/mL) 添加する。三角フラスコをよく振り混合した後、ゲルトレイに静かに注ぐ(ゲルの温度が高いとトレイが変形するので注意する)。泡ができた場合は、チップ等を用いて泡を取り除く。
- 7) コームを挿し、室温でゲルを固める (30~45 分)。三角フラスコ内を約 50 mL の水ですすぐ。1 回目のすすぎ液は Destaining bags の入ったポリ容器に貯める。その後のすすぎ液は通常の洗浄液として流してよい。
- 8) ゲルが十分に固まったら、ウェルを壊さないようにコームを静かに抜く。ゲルを保存する場合は、ゲルの乾燥を防ぐために各ウェルに 1×TAE 泳動 Buffer を注入した上で、1×TAE 泳動 Buffer の入ったタッパーにトレイごとゲルを置き密封する。タッパーには、作製日と作製者を書いたテープを貼る。その日のうちに使用しない場合は、冷蔵庫に入れて保管する。ゲルは作製後、1 週間以内に使用する。複数のゲルを一度に作成する場合は、下表に従って試薬を混合し、上記 1)~8) の操作を行う。

	1 枚分	2 枚分	3 枚分	4 枚分	5 枚分
アガロース	0.4 g	0.8 g	1.2 g	1.6 g	2 g
1×TAE	40 mL	80 mL	120 mL	160 mL	200 mL
10 mg/mL EtBr 溶液*	2 μ L	4 μ L	6 μ L	8 μ L	10 μ L
使用する三角フラスコの容量	100 mL 容	200 mL 容	200 mL 容	300 mL 容	500 mL 容

EtBr 溶液はアガロースを溶解後に添加する。6) 参照

6 泳動用サンプルの調製

- 1) 下表に従って、Loading Buffer、TE のマスターミックスを調製する。なお、Loading Buffer は SDS が析出する場合がありますので、析出していた場合は 50℃程度の湯浴で結晶を溶かしてから使用する。

a) total RNA 抽出後の Quality チェック用

試薬	1 サンプル 当たり	24 サンプル分 (実際は、27 サンプル分)	48 サンプル分 (実際は、53 サンプル分)
Loading Buffer	2 μ L	54 μ L	106 μ L
TE Buffer	7 μ L	189 μ L	371 μ L

b) cRNA の断片化のチェック用

試薬	1 サンプル 当たり	24 サンプル分 (実際は、27 サンプル分)	48 サンプル分 (実際は、53 サンプル分)
Loading Buffer	1 μ L	27 μ L	53 μ L
TE Buffer	3 μ L	81 μ L	159 μ L

- 2) PCR用の8連チューブをラックにセットする。一番左側のチューブを油性ペンでマークしておく。8連チューブに1)で調製したLoading BufferとTEのミックスを、抽出RNAの品質チェックの場合は9 μ L、断片化RNAのチェックの場合は4 μ Lを、連続分注機を用いて分注する。
なお、ヒト肝細胞サンプルの場合は濃縮でRNA溶液量が減っているため、サンプル0.5 μ L+Loading Buffer 4.5 μ Lとする。
- 3) 各サンプル1 μ Lを8連チューブに添加し、ピペティングでよく混ぜる。

7 total RNA (泳動用サンプル) の変性

注) 本操作は、cRNAの電気泳動の際には行わない。

- 1) サーモサイクラーのスイッチ(背部)をONにする。
(Self testが始まる。所用時間: 約1分)
- 2) レバーを押し上げることによりPCRサーモサイクラーの蓋(Alpha unit)を開ける。
- 3) サンプルの入ったチューブをできるだけブロックの中央に置くようにセットする。
- 4) PCRサーモサイクラーの蓋を閉めて、Tumbwheel(蓋に付いている青いダイヤル)を抵抗が感じられるまで、左(Closeの方向)に回した後、その状態から右(Openの方向)へ、1/2~3/4回転ダイヤルを戻す。
- 5) トップレバーを押し上げることによりPCRサーモサイクラーの蓋(Alpha unit)を開け、再び蓋を戻す。
- 6) Select キー-◁▷ を押して“RUN”にカーソルを移動させる(Defaultは“_RUN”)。
- 7) 決定する(Proceed キー△を押す)。
- 8) Select キー-◁▷ を押して<MAIN>にカーソルを合わせる
(ア)(Defaultは“_<MAIN>”)。
- 9) 決定する(Proceed キー△を押す)。

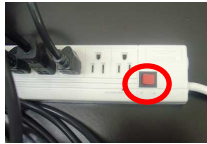
- 10) **Select** キー-◀▶ を押して“RNA ヘンセイ”のところにカーソルを合わせる。
- 11) 決定する (**Proceed** キー△を押す)。
- 12) 使用する Block の選択画面が出てくるので、**Block** キーを押し、A(L)又は B(R)を選択する。
- 13) 決定する (**Proceed** キー△を押す)。
- 14) TUBE と PLATE の選択画面 (Vessel Type) が出てくるので、**Select** キー-◀▶
① を押して“TUBES”のところにカーソルを合わせる (Default は
“_TUBES”)
- 15) 決定する (**Proceed** キー△を押す)。
- 16) Volume 選択画面が表示されるので、“**Volume(μL):**”にサンプル液量を入力する。
(Default は“10”)すでに入力する液量が表示されている場合は、**Proceed** キー
△を押して決定する。
- 17) “**Use heated lid?**”と表示されるので、**Select** キー-◀▶ を押し、カーソルを
“**Yes**”に合わせる (Default は“_Yes”)。
- 18) 決定する (**Proceed** キー△を押す)。
- 19) 反応が終了したら (4℃になるように設定されている)、**Stop** キー又は **Cancel** キー
▽を押す。
- 20) トップレバーを押し上げることによりロックし PCR サーマサイクラーの蓋
(Alpha unit) を開け、チューブを取り出す。
- 21) “**Stop RNA ヘンセイ on A?**”と表示されるので、**Select** キー-◀▶ を押し、カ
ーソルを“**Yes**”に移動させる (Default で“_No”が選択されているので、“_Yes”
に変更する)
- 22) 決定する (**Proceed** キー△を押す)。
- 23) 再び、**Cancel** キー▽を押して初期の画面に戻す。
- 24) PCR サーマサイクラーのスイッチ (背部) を **OFF** にする。

8 電気泳動

- 1) ゲルのウェルの底に穴が開いていないことを確認する。泳動槽のスイッチ側にウェルがくるようにしてゲルを泳動槽に置く。1×TAE 泳動 Buffer を静かに注ぐ(ゲルの表面から 3 mm 程度浸るように)。保存したゲルを使用した場合は、マイクロピペット(P1000)を用いて 1×TAE 泳動 Buffer を数回吹きつけ、ウェルを洗う。
- 2) マイクロピペット(P10)を用いて、サンプルをアプライするウェルの左端または右端に DNA サイズマーカーを 5 μ L アプライする。続いて、Loading Buffer と混ぜたサンプルを各ウェルに 5 μ L ずつアプライする。
- 3) すべてのサンプルをアプライした後、泳動槽に蓋をしてコードをつなぐ。泳動槽のスイッチを入れ、100 V 又は 135 V で泳動を行う。RNA は一極から+極側方向に泳動されるので、極性切り替えスイッチの向きに注意する。泳動槽の白金線から泡があがっていること、サンプルがウェルからゲルに入ったことを確認する。濃い青の色素 (Bromophenol Blue) がゲルの約 1/2 の位置まで泳動されたら泳動を止める。(1%のゲルでは、Xylene Cyanol FF(薄い水色の色素)は約 5,000 bp の DNA と、Bromophenol Blue (濃い青の色素) は約 900 bp の DNA と同じ速度で泳動される。
- 4) 泳動槽の電源を切る。ゲルをトレイから取り出し、UV トランスイルミネーター付属のトレイにのせ写真撮影装置まで運ぶ。ゲルを取り扱う際には手袋を着用する。この際、ゲルとトレイの間に気泡が入らないよう注意する。
- 5) 泳動 Buffer は、Destaining bags の入ったポリ容器に貯める。泳動槽内を約 300 mL の水ですすぐ。1 回目のすすぎ液は Destaining bags の入ったポリ容器に貯める。その後のすすぎ液は一般廃液として流してよい (なお、Destaining bags は 1 週間ごとに交換し、使用済み Destaining bags はエチジウムブロマイド専用容器に可燃ごみとして廃棄する)。

9 ゲルの撮影（アトー画像検出システム）

- 1) ゲル電気電気泳動装置（テーブルタック）及びパソコンのスイッチを ON に



撮影装置の Main スイッチは常に ON のままでテーブルタックのスイッチで電源を ON/OFF する



- 2) 手袋を両手にしてゲルを専用トレイに移す

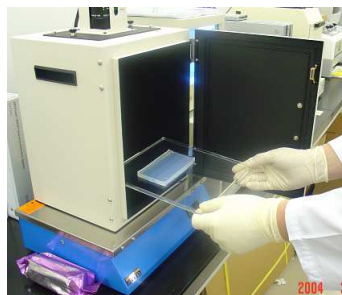
黒いシールは
左下



ゲルの溝

方向を間違えてゲルを置くと暗箱に入らなくなるので注意

- 3) 暗箱の中にトレイをいれる（両手に手袋をすること）



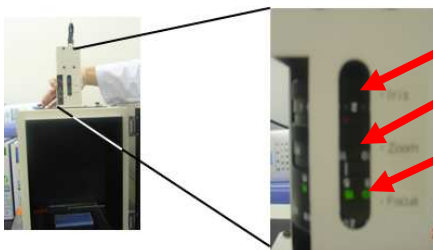
ゲルを扱う前にあらかじめ暗箱の扉を開けておくと本体をエチプロ汚染することはない

- 4) 片方の手の手袋を外し素手で機器の操作を行い、手袋をした手でゲルの位置の調節を行う。



素手になる代わりに、ゴム手袋の上にビニールの手袋をしても良い

- 5) Zoom のダイヤルでゲルの大きさを調整する



Iris (絞り) : 通常は2~4

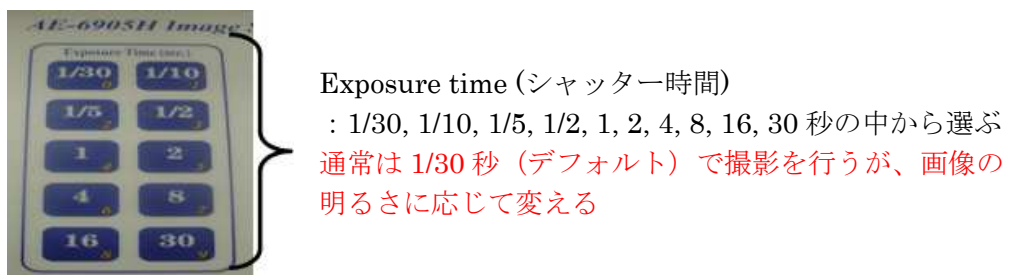
Zoom : 通常は15ぐらいだが、必要に応じて調節する

Focus : 通常は5ぐらい

- 6) イルミネーターのスイッチを ON にする



- 7) モニターに現時点の画像が現れ、シャッタースピードも表示される。明るさ等が気になる場合は、希望のシャッタースピードのスイッチを押す。



- 8) 希望の画像になったら “Freeze” を押して、イルミネーターのスイッチを OFF にする。



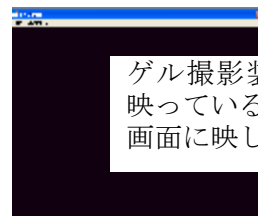
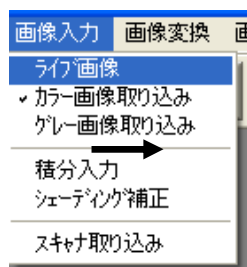
- 9) プリンターのスイッチを押して、画像の印刷を行う。「Working ID」、「サンプル番号」、「測定者」を記入し、実験記録書に貼付する。



- 10) 「ユーザー名：TGP パスワード：toxico ログオン先：TGP」を指定してPCを立ち上げる。
- 11) 「CS Analyzer 2.0」をクリックして解析ソフトを立ち上げる。

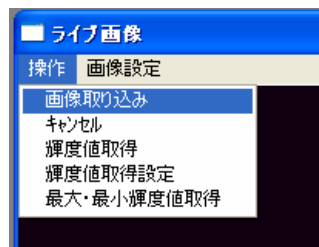


- 12) “画像入力” → “ライブ画像”をクリックして、ゲル撮影装置の画像をPCに表示させる

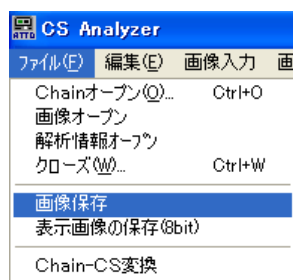


ゲル撮影装置のモニターに映っている画像がPCの液晶画面に映し出される

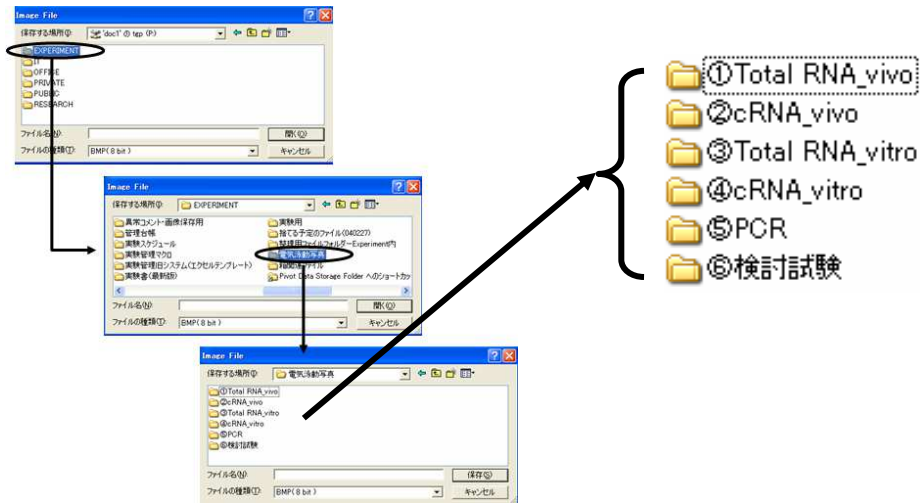
- 13) 取り込んだ画像画面で“操作” → “画像の取り込み”をクリックしてPCに画像を取り込む



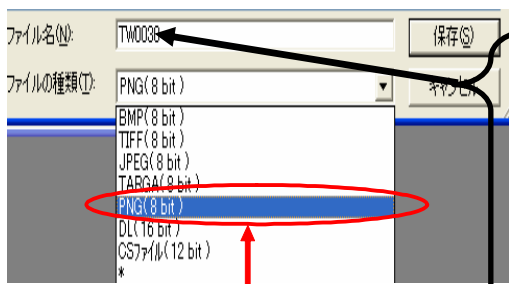
- 14) “ファイル” → “画像保存”をクリックして、画像を保存する



- 15) ファイルサーバー→「21-EXPERIMENT」→「電気泳動写真」の6つのフォルダから適切なフォルダを選択して保存する。



- 16) ファイル名をつけて保存す



PNG形式で保存する

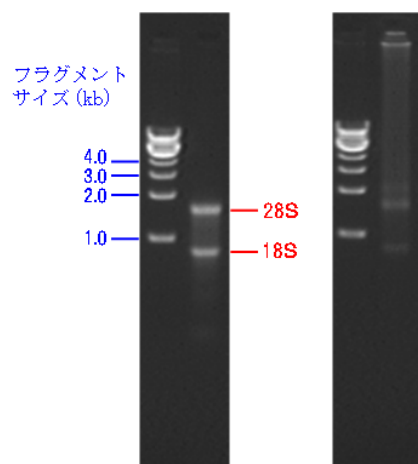
以下のルールでファイル名をつける

- 1) total RNA の場合 「T」 + 「ワーキング ID」
例) W00300 の場合 → 保存ファイル名「TW00300」
例) W00300E2 の場合 → 保存ファイル名「TW00300E2」
- 2) c RNA の場合 「C」 + 「ワーキング ID」
例) W00300 の場合 → 保存ファイル名「CW00300」
例) W00300E2 の場合 → 保存ファイル名「CW00300E2」
- 3) 同じサンプルで再泳動を行った場合
枝番号を発生
例) 「CW00300」、「CW00300-1」、「CW00300-2」

- 17) PC をシャットダウンして、ゲル電気電気泳動装置（テーブルタック）のスイッチを OFF にする。
- 18) 撮影後のゲルはサランラップで包み、所定の容器に廃棄し、可燃物として処理する。

10 結果の判定

- 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。cRNA の場合は断片化されているかことを確認する。



RNA が分解している場合

以下余白