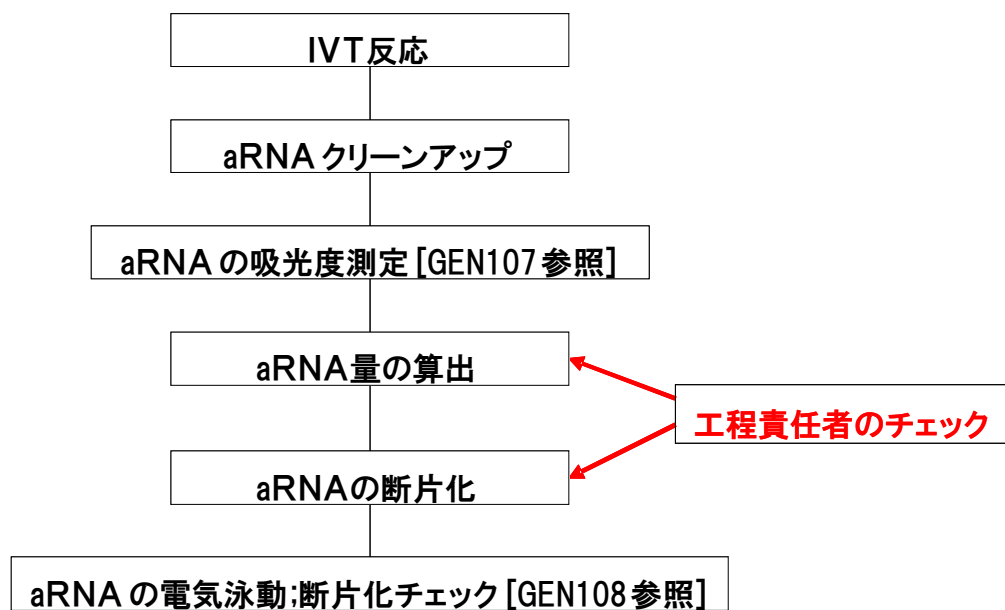


目 次

分類	項目	ページ
GEN110 Ver.3	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	3
	3.試薬の調製	3
	4.操作手順	
	4-1.IVT 反応	4
	4-2.aRNA のクリーンアップ	4 - 5
	4-3.aRNA の断片化	5 - 6
5.aRNA のクオリティの判断基準及び断片化チェック	7	

作業手順



1 序

本 SOP は、aRNA の合成手順について記載したものである。

2 試薬、器具及び機器

2-1 試薬

1) GeneChip® 3' IVT Express Kit BOX 2 of 2 (Affymetrix, Part #901229)

【キットの構成成分】

- ・ IVT Labeling Buffer 660 µL -30℃保存
- ・ IVT Labeling Enzyme Mix 198 µL -30℃保存
- ・ IVT Biotin Label 132 µL -30℃保存

2) GeneChip® 3' IVT Express Kit BOX 1 of 2 (Affymetrix, Part #901229)

【キットの構成成分】

- ・ aRNA Binding Buffer Concentrate 1.8 mL 室温保存
- ・ RNA Binding Beads 360 µL 4℃保存
- ・ aRNA Wash Solution Concentrate 10 mL 室温保存
- ・ aRNA Elution Solution 5 mL 室温保存
- ・ 5X Array Fragmentation Buffer 1 mL 室温保存

3) エタノール (和光純薬工業, cat.# 057-00456, 特級, 規格 : 99.5%以上または同等品)

室温保存

使用期限 : 購入日から 3 年

2-2 器具

1) 8-Strip PCR Tubes & Caps (0.2 mL)

2) U-Bottom Plate

2-3 機器

- 1) Thermal Cycler with heated Lid (capable of holding 0.2 mL tubes for reaction incubations)
- 2) Vortex Mixer
- 3) Microcentrifuge (with an adapter for the PCR strip-tubes or plates supplied with the kit)
- 4) Magnetic Stand for 96-well plates Ambion #AM10027 (MagneticStand - 96)
- 5) Orbital shaker for 96-well plates

3 試薬の調製

試薬を調整する前に Enzyme 類は数回タッピングをした後、冷凍試薬は室温で完全に融解した後、氷上にて保持し使用する。

1) aRNA Wash Solution

使用期限：調製後 1 ヶ月、室温保存

Wash Buffer のボトルに 8 mL のエタノール（和光純薬工業, cat.# 057-00456, 特級, 規格:99.5%以上または同等品）を添加し使用する。エタノールを添加した際、チェックを入れ、作成日を記載する。

2) IVT 反応用 master mix

下表に従い、室温でチューブに mix を調製する。おだやかにボルテックスし、よく混合してスピンドウン（上限 5 秒間）を行う。

使用まで氷冷下で保存する。

試薬	1 サンプル分	25 サンプル分	50 サンプル分
IVT Biotin Label	4 μ L	100 μ L	200 μ L
IVT Labeling Buffer	20 μ L	500 μ L	1,000 μ L
IVT Enzyme Mix	6 μ L	150 μ L	300 μ L
合計	30 μ L	750 μ L	1,500 μ L

3) aRNA Binding Mix

下表に従い、室温で mix を調製する。RNA Binding Beads はボルテックスした後調製に用いること。

試薬	1 サンプル分	25 サンプル分	50 サンプル分
RNA Binding Beads	10 μ L	250 μ L	500 μ L
aRNA Binding Buffer Concentrate	50 μ L	1,250 μ L	2,500 μ L
合計	60 μ L	1,500 μ L	3,000 μ L

4 操作手順

4-1 IVT 反応

- 1) 各チューブに IVT 反应用 master mix 30 μ L を分注する。おだやかにボルテックスしよく混合して、スピンドウンする。
- 2) 40°C で 16 時間反応させる（サーマルサイクラー使用）。

この時点でサンプルを一晩保存可能（-20°C）。

4-2 aRNA のクリーンアップ

注) あらかじめ aRNA Elution Solution を必要量分注し 55°C で最低 10 分間予熱しておくこと（ヒートブロック使用）。

- 1) aRNA Binding Mix 60 μ L をサンプルに加える。
- 2) U-Bottom Plate にサンプルを移し、ピペッティングで混合する。
- 3) 120 μ L のエタノール（和光純薬工業, cat.# 057-00456, 特級, 規格：99.5%以上または同等品）をサンプルに加え、ピペッティングで混合する。
- 4) 300-500 rpm で 2 分間シェイクする。
- 5) マグネティックスタンドにプレートを置き最大 5 分間（TGP では 3 分間）静置する。
- 6) ビーズを拡散させないよう上清を除去し、マグネティックスタンドからプレートを外す。
- 7) aRNA Wash Solution 100 μ L をサンプルに加え、700-900 rpm で 1 分間シェイクする。
注) Wash Solution にエタノールが添加されているか確認。
- 8) マグネティックスタンドにプレートを置き最大 5 分間（TGP では 3 分間）静置する。
- 9) ビーズを拡散させないよう上清を除去し、マグネティックスタンドからプレートを外す。
- 10) 再度 aRNA Wash Solution 100 μ L をサンプルに加え、700-900 rpm で 1 分間シェイクする
- 11) マグネティックスタンドにプレートを置き最大 5 分間（TGP では 3 分間）静置する。

- 12) ビーズを拡散させないように上清を除去し、マグネティックスタンドからプレートを外す。
- 13) プレートをシェーカーに置き、1,000-1,200 rpm で1分間プレートを震動させて、ビーズから残りのエタノールを蒸発させる。
- 14) 50 - 60 °Cへ温めておいた aRNA Elution Solution を 50 µL 加え 1,000-1,200 rpm で3分間シェイクする。(ビーズが完全に分散されなかった場合、完全に分散するまでシェイクを続ける。)
- 15) マグネティックスタンドにプレートを置き最大5分間 (TGP では3分間) 静置し、ビーズを分離する。
- 16) ナンバリングした 1.5 mL チューブへ上清を採取。
- 17) 氷上へ置き、[SOP-GEN107]に従い、RNA 濃度測定を行う。

この時点で-20 °C以下で一年間保存可能。

4-3 aRNA の断片化

- 1) [SOP-GEN107]に従って 15 µg/32 µL になるように aRNA 溶液と RNase-free Water の液量を算出する。
TGP では出発材料が Total RNA なので、Total RNA のキャリーオーバーの影響をなくすため、以下の計算式で aRNA 量を計算する。

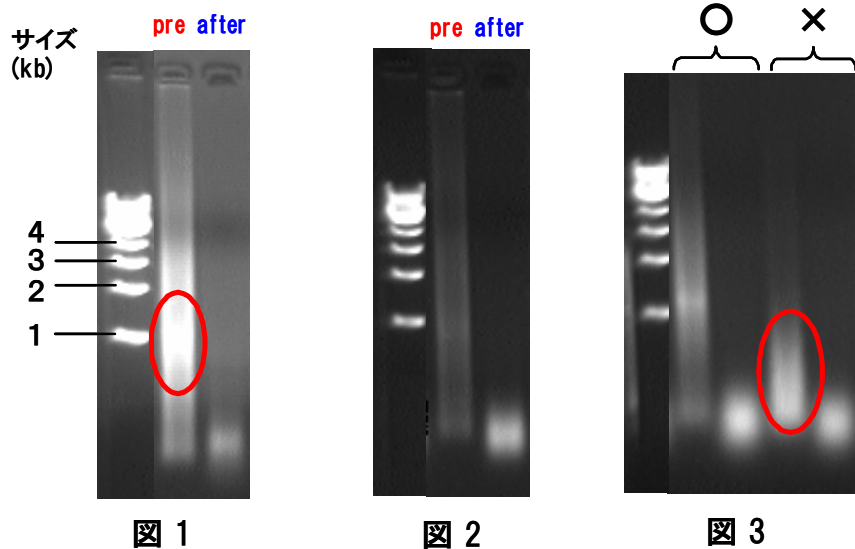
$\text{aRNA 量} = \text{RNA}_m - (\text{totalRNA}_i) \times Y$ <p>RNA_m=IVT 後に計測した aRNA 量 Total RNA_i=出発材料の total RNA 量¹⁾ Y=IVT のステップで使用した aDNA 溶液量²⁾ / 回収した cDNA 溶液量³⁾ 1)TGP では、通常、(50-500 ng) µg 2)TGP では、通常、30 µL 3)TGP では、通常、30 µL</p>
--

- 2) フタとチューブにナンバリングした 8-Strip PCR Tubes に、4-3 1) で算出した aRNA 液量と RNase-free Water を分注する。
分注は、RNase-free Water→aRNA サンプル液の順で行う。RNase-free Water の添加は1本のチップで行う。aRNA サンプル液の添加はサンプルごとに交換する。
残った aRNA 溶液は、サンプル ID ラベルを貼って-80°Cに保存する。

- 3) 調製したサンプル毎に 5X Array Fragmentation Buffer を 8 μ L ずつ添加する。混合後、スピンドウンする。
注) 5X Array Fragmentation Buffer の添加は 1 本のチップで行うが、サンプル、内壁等に付着した恐れがある場合は速やかにチップを交換する。
- 4) [SOP-GEN108] に従って、電気泳動用に断片化前のサンプルとして 1 μ L を分取して電気泳動用の 8 連 PCR 用チューブに分注する。
- 5) 94 $^{\circ}$ C で 35 分間反応させる (サーマルサイクラー使用)。
- 6) 反応後氷冷下に置いた後 (最低 2 分程度)、スピンドウンする。電気泳動用に断片化後のサンプルとして 1 μ L のサンプル溶液を[SOP-GEN-108]に従って準備した、8 連チューブに分注する。
- 7) 断片化前及び断片化後のサンプルを[SOP-GEN-108]に従って、電気泳動を行う。
- 8) 断片化したサンプルは原則的には保存しない。
但し、工程管理者の指示があった場合には、-80 $^{\circ}$ C で保存可能。

5 aRNA のクオリティの判断基準及び断片化チェック

- 1) 下記に典型的な泳動像を示す（良い例及び悪い例）。判定基準については、5.2) 参照。



2) 判定の基準

2)-1 aRNA のクオリティチェック

- ・ 断片前の aRNA の泳動像が全体的にスメアリングしており、1 kbp 付近が濃く染まっている・・・図 1→○（理想的）
- ・ 断片化前の aRNA の泳動像が全体的にスメアリングしているが、1 kbp 付近が濃く染まっていない・・・図 2→○
- ・ 断片化前の aRNA が 1 kbp 以下のマーカー付近に集中している・・・図 3→×
（このサンプルを用いてハイブリした場合、バックグラウンド値が高くなることが多い）

2)-2 断片化の確認

- ・ 断片化処理後のバンドが泳動の先端付近にある（35～200 bp）・・・図 1、図 2→○

上記の基準に従い、aRNA のクオリティチェック及び aRNA 断片化の確認を行う。
判定基準に当てはまらない場合及び判断の難しい場合は、工程責任者に連絡する。
以下余白