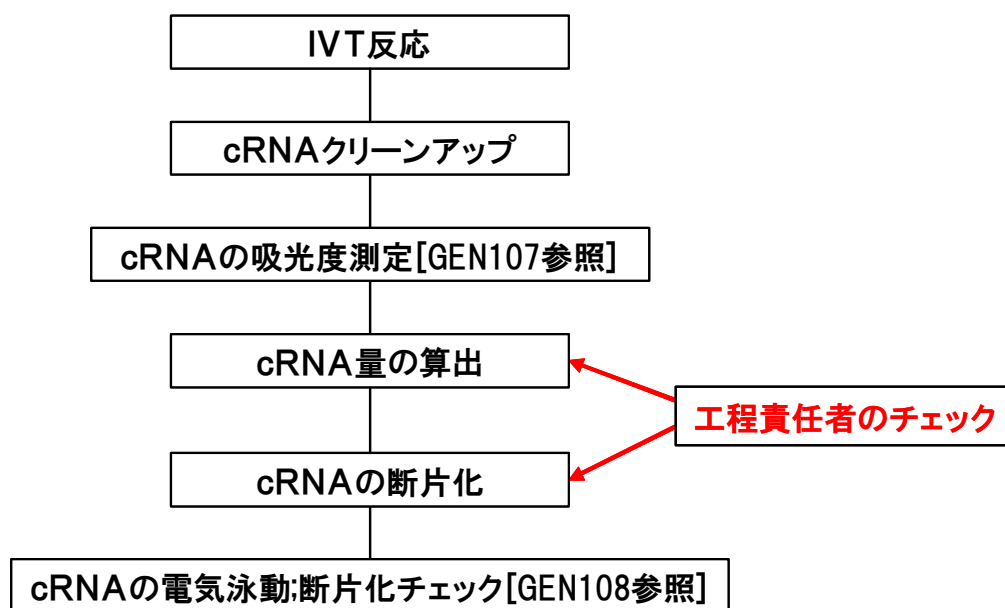


目 次

分類	項目	ページ
GEN110 Ver.4	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	3
	2-3.機器	3
	3.試薬の調製	3-4
	4.操作手順	
	4-1.IVT 反応	4
	4-2.cRNA のクリーンアップ	4-6
	4-3.cRNA の断片化	6
5.cRNA 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、cRNA 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) Affymetrix IVT labeling Kit (cat.# 900449: 30 反応)
-20℃保存
使用期限：購入日から 1 年（凍結融解は、1 回まで使用可能）

【キットの構成品】

・ 10X IVT Labeling Buffer	120 µL
・ IVT Labeling Enzyme Mix	120 µL
・ IVT Labeling NTP Mix	360 µL
・ 3'-Labeling Control (0.5 µg/µL)	10 µL
・ RNase-free Water	910 µL

3'-Labeling Control は廃棄して良い。

- 2) GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix, cat.# 900371:30 反応)
室温保存
使用期限：購入日から 1 年

【キットの構成品】

・ IVT cRNA Binding Buffer	18 mL
・ IVT cRNA Wash Buffer, 5 mL concentrate	5 mL
・ RNase-free Water	3 x 1.2 mL
・ 5X Fragmentation Buffer	1mL

注) 下記に示す cDNA のクリーンアップ用試薬と一緒に入っているので間違えないように注意する。

・ cDNA Binding Buffer	18 mL
・ cDNA Wash Buffer, 6 mL concentrate	6 mL
・ cDNA Elution Buffer	15 mL

- 3) DEPC-Treated water (Ambion, cat.# 9920 または同等品)
室温保存
使用期限：購入日から 1 年、開封後 3 ヶ月
- 4) 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) GeneChip Sample Cleanup Module(Affymetrix, cat.# 900371, 30 反応分)
使用期限：購入日から 1 年
- ・ IVT cRNA Cleanup Spin Columns 30
 - ・ 1.5 mL Collection Tubes (for elution) 60
 - ・ 2 mL Collection Tubes 60

注) cRNA のクリーンアップ用カラムは、cDNA のクリーンアップ用カラムと一緒に入っているの間違えないように注意する

cRNA 用カラム：透明 cDNA 用カラム：薄い紫色

- 2) DNase/RNase&Pyrogen フリー1.5 mL 容マイクロチューブ(BM-15, ビーエム機器または同等品)

2-3 機器

- 1) ヒートブロック (エッペンドルフ ; Thermomixer Comfort
タイテック ; DryThermoUnit DTU-N または同等品)
- 2) 微量高速冷却遠心機(トミー工業, MX-300 または同等品)

3 試薬の調製

- 1) IVT 反応用 mix

下表に従い、IVT 反応用 mix を調製する。cDNA の入った各チューブに IVT 反応用 master mix を 30 μ L ずつ分注し、タッピングしてからスピンドウン。ボルテックスは行わない。

試薬	1 本分	26 本分	50 本分
RNase-free Water	10 μ L	260 μ L	500 μ L
10 \times IVT Labeling Buffer	4 μ L	104 μ L	200 μ L
IVT Labeling NTP Mix	12 μ L	312 μ L	600 μ L
IVT Labeling Enzyme Mix	4 μ L	104 μ L	200 μ L
合計	30 μ L	780 μ L	1500 μ L

- 2) IVT cRNA Wash Buffer

使用期限：調製後 1 ヶ月、室温保存

ボトルに 20 mL のエタノール(96~100%, TGP では 99.5%以上を使用)を添加し使用する。エタノールを添加した際、ボトルフタのチェック欄 (□) にチェックを入れる。保存時沈殿が生じた場合は、30°Cに暖め沈殿を溶かした後使用する。

- 3) 80%(v/v) エタノール
使用期限：調製後 1 ヶ月、室温保存
RNase/DNase フリー50 mL 容コニカルチューブ等に、エタノールと DEPC-Treated water を 4:1 の比で混合する。
例) エタノール：DEPC-Treated water=40 mL：10 mL

4 操作手順

4-1 IVT 反応

- 1) 1.5 mL 容マイクロチューブ（蓋に識別番号を記載）に、サンプル溶液（クリーンアップ済みの 2nd cDNA）を 10 μ L ずつ分注する。
注）サンプルの分注時のチップはサンプル毎に交換する。チューブの先端以外にふれないように分注すること。チューブの先端以外に付着した場合は、IVT 反应用 master mix を添加した後に、チップを交換する。
- 2) 各チューブに IVT 反應用 master mix 30 μ L を分注する。タッピングで混合し、スピンドウンする。
注）IVT 反應用 Master Mix を分注する際に、チップに残るようであればチューブの内壁（上方）に付けてもよい。チップは、サンプルごとに交換する必要はないが、サンプルに付着した恐れがある場合は、速やかに交換する。
- 3) 300 rpm でミキシングしながら 37°C で 16 時間反応させる（エッペンドルフ製ヒートブロック使用）。
注）プログラム（“■37°C、16 hr、300 rpm→■■4°C、forever”）を使用する。
- 4) 反応後、保存する場合は、-80°C で保存する。

4-2 cRNA のクリーンアップ

以下に記載する全ての操作は、室温下で実施する。

- 1) IVT 反応済みのサンプル溶液(40 μ L)に 60 μ L の RNase-free water を加え、ボルテックスを用いて 3 秒間混合する。
注）RNase-free water の添加は、1 本のチップで行うが、サンプル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。
- 2) サンプル溶液に 350 μ L の IVT cRNA Binding Buffer を加え、ボルテックスを用いて 3 秒間混合する。
注）IVT cRNA Binding Buffer の添加は 1 本のチップで行うが、サンプル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。

- 3) 250 μ L の 100%エタノールを加え、ピペッティングにより混合する。そのまま、2 mL コレクションチューブにセットした IVT cRNA Cleanup Spin Column に全サンプル溶液(700 μ L)を分注する。
注) 100%エタノールの添加は 1 本のチップで行うが、サンプル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) 蓋を閉め微量高速冷却遠心機を用い遠心(10,500 rpm、15 秒、室温)を行う。遠心後、コレクションチューブ及びチューブ内の溶液を廃棄する。
- 5) カラムを新しい 2 mL コレクションチューブにセットする。
- 6) カラムに 500 μ L の IVT cRNA Wash Buffer を添加し、蓋を閉め遠心(10,500 rpm、15 秒、室温)を行う。遠心後、コレクションチューブ内の溶液を廃棄し、再度受けチューブにセットする。
注) Wash Buffer 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。
- 7) カラムに 500 μ L の 80%(v/v)エタノールを分注し、蓋を閉め遠心(10,500 rpm、15 秒、室温)を行う。遠心後、コレクションチューブ内の溶液を廃棄し、再度受けチューブにセットする。
注) 80%エタノールの添加は 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。
- 8) カラムの蓋を開けた状態で再び遠心(10,500 rpm、5 分、室温)する。遠心後、コレクションチューブ及びチューブ内の溶液を廃棄する。
- 9) カラムを新しい 1.5mL 容マイクロチューブにセットし、11 μ L の RNase-free Water をカラムメンブレンの上に確実に添加する。
注) RNase-free Water の添加は、1 本のチップで行うが、フィルター、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。
- 10) カラムの蓋を閉め、遠心(15,000rpm、1 分、室温)を行う。
- 11) マイクロチューブはそのまま、新たに 10 μ L の RNase-free Water をカラムメンブレンの中心に確実に滴下する。
注) RNase-free Water の添加は、1 本のチップで行うが、フィルター、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。

- 12) カラムの蓋を閉め、遠心(15,000 rpm、1分、室温)を行う。
- 13) [SOP-GEN107]に従い、RNA濃度測定を行う。

4-3 cRNAの断片化

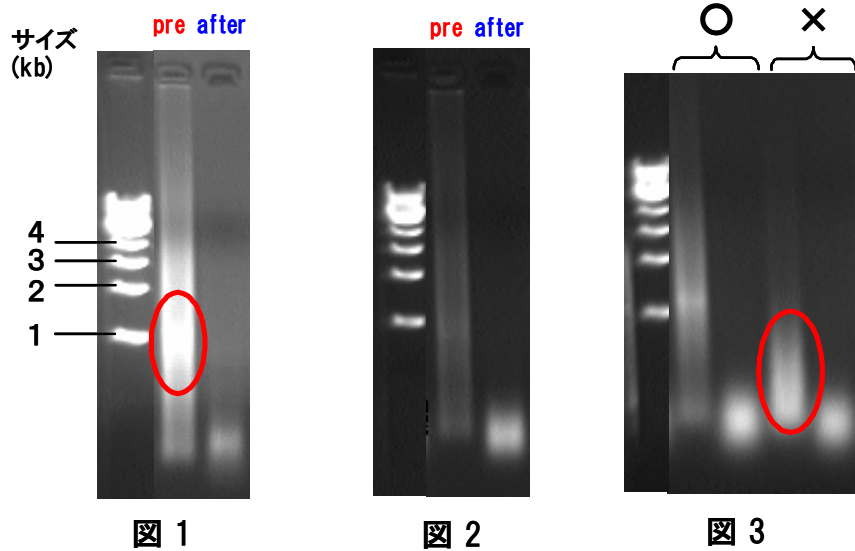
- 1) [SOP-GEN107]に従って 20 µg/32 µL になるように cRNA 溶液と RNase-free Water の液量を算出する (全血では 10 µg/32 µL)。
TGP では出発材料が Total RNA なので、Total RNA のキャリーオーバーの影響をなくすため、以下の計算式で cRNA 量を計算する。

$\text{cRNA 量} = \text{RNA}_{\text{m}} - (\text{totalRNA}_{\text{i}}) \times Y$ <p>RNA_m=IVT 後に計測した cRNA 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 cDNA 溶液量²⁾/回収した cDNA 量³⁾</p> <p>1) TGP では、通常、5 µg 2) TGP では、通常、10 µL 3) TGP では、通常、12 µL</p>
--

- 2) 1.5 mL 容マイクロチューブ (蓋に識別番号を記載) に、4-3.1) で算出した cRNA 液量と RNase-free Water を分注する。
注 1) 分注は、RNase-free Water→cRNA 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。cRNA サンプル液の添加はサンプルごとに交換する。
注 2) 残った cRNA 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 5×fragmentation buffer を 8 µL ずつ添加する。タッピングにより混合後、スピンドウンする。
注) 5×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 µL 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°C、35 分間反応させる (タイテック製ヒートブロック使用)。
- 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 µL 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°C で保存可能。

5 cRNA のクオリティの判断基準及び断片化チェック

5-1 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。



5-2 判定の基準

1) cRNA のクオリティチェック

- ・ 断片前の cRNA 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 cRNA 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 cRNA 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) 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、cRNA のクオリティチェック及び cRNA 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