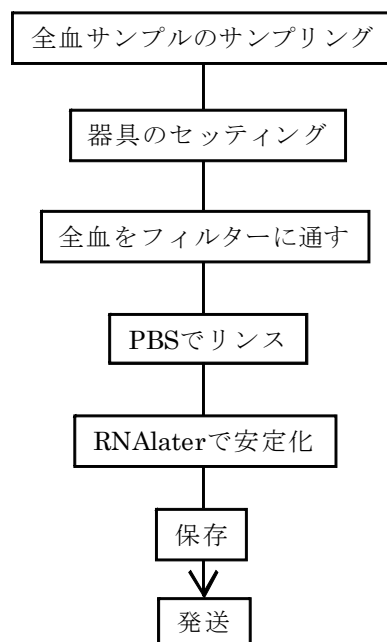


目 次

分類	項目	ページ
GEN102-2 Ver.3	total RNA の抽出	
	作業手順の流れ図	1
	1.序	2
	2.サンプル採取用器具の送付	
	3.試薬および器具	2
	3-1.試薬	2
	3-2.器具	2
	4.器具のセッティング	3
5.サンプル採取と白血球群の分離	3, 4	
6.サンプルの輸送	4	

作業手順の流れ図



1 序

本 SOP では, LeukoLOCK™を用いた全血からの白血球群の単離から輸送までについて記載する. なお検体の取り扱いおよび採血については SOP/GEN102 を参照のこと。

2 サンプル採取用器具の送付

試験開始前に LeukoLOCK Fractionation & Stabilization を試験受託施設に送付する。

3 試薬および器具

3-1 試薬

- 1) LeukoLOCK Total RNA Isolation System (Ambion, cat.# AM1923, 20 rxn)
使用期限: キットの期限に従う
 - ・ 1X PBS pH 7.4 室温-20 または 4℃または保存
 - ・ RNeasy® Lysis Solution 室温保存

3-2 器具

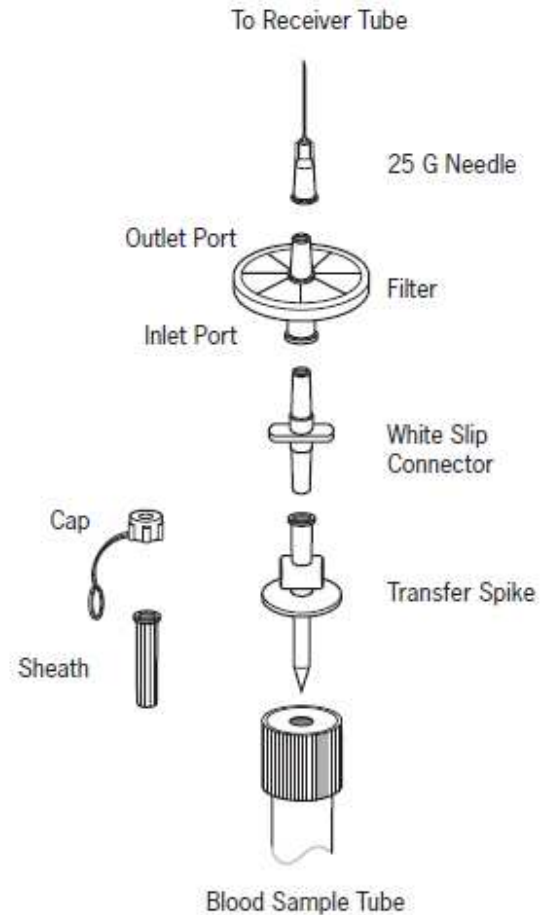
- 1) LeukoLOCK Fractionation & Stabilization (Ambion, cat.# AM1933, 20 rxn)
使用期限:
 - ・ Rubber Septum Cap
 - ・ White Slip Connector
 - ・ Transfer Spike
 - ・ LeukoLOCK™ Filter
- 2) 抗凝血剤入り血液採血管 (9 mL EDTA K3 Vacuette®, Greiner Bio-One, cat.# 455036 または Venosafe® EDTA K3, Terumo®, cat.# VF-109SDK を推奨)
- 3) 10 mL 真空採血管 (抗凝血剤なし) (10 mL Vacutainer®, BD, cat.# 366430 または Venoject®, Terumo, cat.# VT-100SP を推奨)
- 4) 5 mL シリンジ
- 5) 25 G x 5/8 インチ針 (テルモ, cat.# NN-2525R)

4 器具のセッティング

- 1) 1X PBS のボトルの上に Rubber Septum Cap を装着し, Transfer Spike をキャップに通す.
- 2) Transfer Spike の一番上の部分にスクリューキャップを装着し, ボトルからの蒸発を防ぐ.
- 3) RNAlater のボトルも 2)と同様に行う.

5 サンプル採取と白血球群の分離

- 1) 抗凝血剤としてEDTAの入ったチューブへ, 腹大動脈から4~5 mLの全血サンプルを採取する.
- 2) Transfer Spike を全血サンプルの入ったチューブのフタのゴムに刺す.
注) Transfer Spike の外装とスクリューキャップは, サンプル保存時にフィルターのシールに使用するため, 捨てずに残しておく.
- 3) White Slip Connector を Transfer Spike の先に挿入する.
- 4) フィルターにナンバリングし, フィルターの注入口(広がっている側)と White Slip Connector を繋ぐ.
- 5) 25 G x 5/8 インチ針をフィルターの放出口(細くなった側)へ繋ぐ.
- 6) 2)~5)の手順で組み立てたフィルター装置を逆さまにし, 針を空の 10 mL 排出用血液回収チューブ(受けチューブ)へ突き刺す. 減圧状態のチューブにより, 血液はフィルターを通過する.
- 7) フィルターのくさび型の部分がクリアになるまで静置する.
注) 濾過の工程は通常 2 分以内.
- 8) フィルターを装置から取り外す.
- 9) 4. の 1X PBS ボトルのフタの Transfer Spike に 5 mL シリンジを繋ぐ. ボトルを逆さまにして 3 mL を装てんする. もしくはチューブに分注した PBS をシリンジですって空気を排出する.
- 10) PBS を入れたシリンジをフィルターに繋ぎ, 生化学的汚染物入りで廃液(PBS)を受けながら, ~3-5 滴/秒の速さで PBS をフラッシュする.
- 11) 9)と同様にして, 4. の RNAlater のボトルに 5 mL シリンジを装着し, RNAlater を 3 mL 装てんする.
- 12) RNAlater を入れたシリンジをフィルターに繋ぎ, 生化学的汚染物入りで廃液(RNAlater)を受けながら, ~3-5 滴/秒の速さで RNAlater をフラッシュする.



- 13) フィルターに RNAlater が入ったままとなるよう、シリンジをフィルターから取り外す。
注) シリンジをフィルターから外す際、RNAlater が流れないように、シリンジを外す前にピストンを引いてはならない。
- 14) Transfer Spike の外装とスクリューキャップでフィルターの二つの口をシールする。
- 15) シールしたフィルターは氷上にビニールを敷き、その上に一時保存する。
- 16) 割付けバーコードラベルの一方を保存用袋に添付し、もう一方はチェックシートの対応する欄に貼り付ける。サンプリングしたフィルターは投与群ごとに袋に入れる。
- 17) -20℃で凍結保存する。

6 サンプルの輸送

- ・ サンプル採取翌日以降 (-20℃保存時) に発送する場合は、バーコードチェックシートと共にドライアイスの入ったクーラーボックスに入れて、トキシコゲノミクスプロジェクト事務局宛に冷凍宅急便で輸送する。

以下余白