

Magtration System 12GC

Automated Nucleic Acid Isolation and Purification System

クイックマニュアル ~ RNA Purification ~



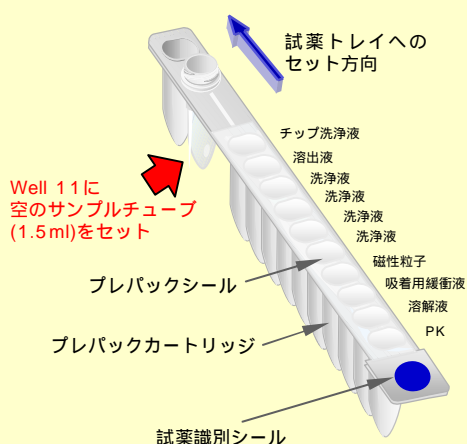
処理時間

細胞又は組織サンプルからのRNA抽出：約35分（DNase処理なし）
約45分（DNase処理含む）



試薬（Magtration® - MagaZorb® RNA Common Kit : Code No. E2004）
ICカード（Magtration® - MagaZorb® RNA / Common : Code No. I-1554）

Check!!



1. 1.5mlのスクリューキャップチューブ（キットに付属）中に試料（組織サンプルは10mg程度まで、細胞は10⁶個までの細胞ペレット）を入れる。
組織サンプルの場合は、RNA¹ater 1等の安定化剤を150μl添加して破碎処理を行います。細胞サンプルの場合は、生理食塩水200μlを添加し、ピペティング等で均一に懸濁します。
組織サンプルの破碎は、軟組織の場合はベッスル等で破碎できますが、堅い組織の場合、RNA¹aterを添加した状態でクライオショッカー、ビーズショッカーなどの破碎機で破碎を行い、破碎溶液中に固形物が残っていない状態で装置にセットして下さい。
2. 1で破碎処理したサンプルの入ったチューブをチップラックのサンプル設置位置にしっかりセットします。
3. DNase処理を行う場合は、チップラックに100μlのDNase 2溶液（約40 Unit）の入った1.5mlチューブをセットして下さい。
4. カートリッジ試薬に気泡が入っている場合は、軽くたたいて除いてください。気泡が入ったまま処理を行うと、試薬を完全に吸引できなかつたり、攪拌時の泡立ちの原因となることがあります。試薬シール部分やウエル内上方に試薬及び水滴の付着が見られる場合、軽く振って落として下さい。特に磁性粒子がウエルの壁面についている場合、泡立たないように転倒混和して壁面から落としてからセットして下さい。

¹ RNA¹ater[®]はAmbion社の登録商標です。



サンプル・消耗品のセット

サンプル：細胞懸濁液200μlまたは
組織破碎液150μl

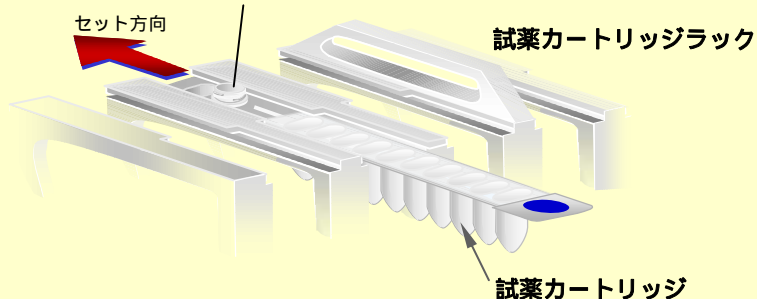
DNase溶液100μl
（付属の1.5mlチューブ）
DNase処理が必要な場合

チップ&チップホルダー
（付属のもの）

スクリューキャップ式チューブ
（付属の1.5mlチューブ）溶出液回収用

チップラック

1.5mlチューブは、ラックに試薬カートリッジを
セットした後に差し込んでください。



² DNase溶液：Ambion社のDNaseの場合、
DNase溶液 20μl + 10 × DNase Buffer 80μlを
1.5mlアシストチューブにいれてセットする。

* 試薬カートリッジを試薬カートリッジホルダーの
セット方向に入れ、“カチッ”となるまで差し込
んでください（試薬トレイに試薬カートリッジを入れ、
試薬のラベル部を下方向に押すとカチッと入ります）。



オペレーション・フロー

ICカードがセットされていることを確認して下さい。()

12GC PLUS の電源をONにします。

自動的にMenu画面へ移行します。

START キーを押す。

実行モード (ICカードのプロトコール名が表示されると同時に自動的に原点復帰を行います)

RNA PURIFICATION
--CELL/TISSUE--
-- PSSJ Ver.1.0/12GC--
Initializing...

バーコード読取の可否を選択します。バーコード読取方法は「GC Data Station Quick Manual」を参照してください。

Input Batch Info?
Yes:Return
Skip:Start
Prev:ESC.

Sample 情報画面へ移行します。サンプル種を選択します。

SELECT SAMPLE
1. CELL
2. TISSUE
NEXT=1or2, ESC=Prev.

DNase処理の有無を選択します。

DNase TREATMENT
1. YES
2. NO
NEXT=1or2, ESC=Prev.

溶出液量を選択します。

SELECT ELUTION VOL.
1. 50µl
2. 100µl
NEXT=1or2, ESC=Prev.

選択項目を確認し、選択します。

表示例

SAMPLE: TISSUE
DNase : YES
ELUTION: 50µl
NEXT=RETURN, ESC=Prev.

START キーを押す。

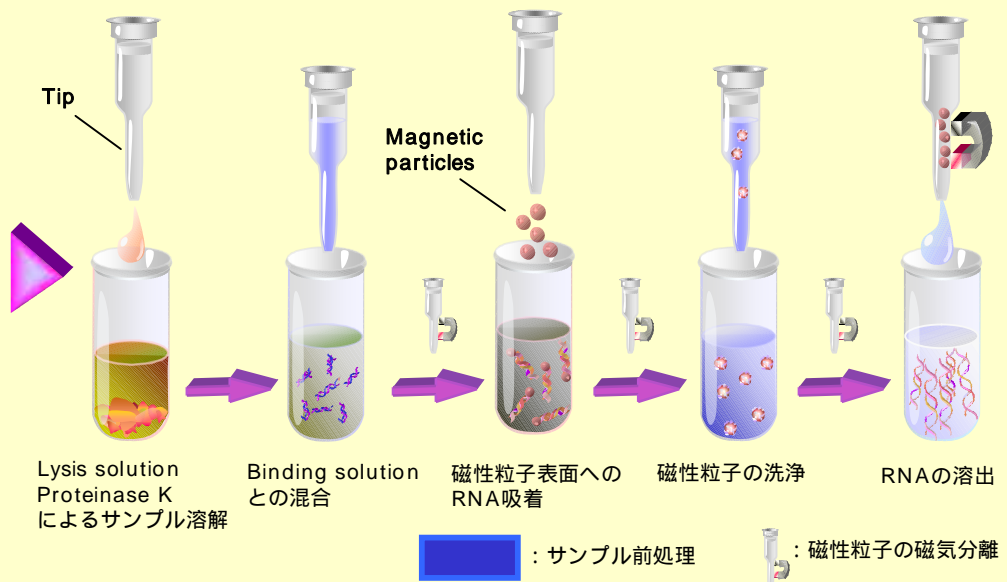
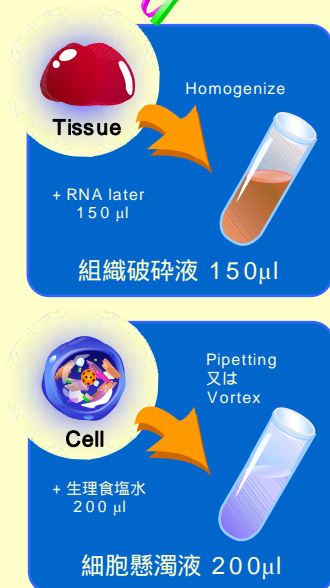
実行

* RUN終了後にピーブ音が鳴ります。

ICカードのセット&取り出しは、必ず本体の電源がOFFの状態で行ってください。12GC Plus専用のICカードをご使用ください。装置の動作中にフロントドアを開けるとプロトコルが緊急停止しますので、装置の動作中には決してフロントドアを開けないでください。



抽出工程 - RNA Purification -





トラブルシューティングガイド

症状

主な原因

コメント

(1) 収量が低い



サンプル量が過剰

規定量以上のサンプルを使用しても収量は上がり、むしろ率は低下します。サンプル量を減らしてみてください。細胞の場合、 1×10^6 cells/200 μ l以下に、組織サンプルは、10mg以下/150 μ lとして下さい。



サンプルの溶解不足

サンプルの攪拌、破砕が不十分である可能性があります。破砕不足により固形物が残った状態で装置にかけると、抽出操作中にチップの目詰りが起き、収量が悪くなる可能性があります。



サンプルの破砕不足

サンプルの攪拌、破砕が不十分である可能性があります。破砕不足により固形物が残った状態で装置にかけると、チップの目詰り、溶解工程及び懸濁、吸引操作が不十分になり収量が悪くなる可能性があります。破砕液が1000 μ l用ピペットで容易にピペティング出来る程度が目安です。



Tipのつまり

組織によっては、筋繊維が多く含まれるものがありますので、破砕操作を十分に行ってください。上記の項目を参照。



プレバック試薬量の状態

カートリッジ試薬に気泡が入っている場合、試薬シール部分やウエル内上方に試薬及び水滴の付着が見られる場合は、軽くたたいて除いてください。気泡が入ったまま処理を行うと、試薬を完全に吸引できなかったり、攪拌時の泡立ち等の原因となり、収量が低下する場合があります。特に磁性粒子がウエルの壁面についている場合、泡立たないように転倒混和して壁面から落としてからセットして下さい。

(2) A260/A280
が低い



サンプル量が過剰

サンプル量を減らして検討します。(1)を参照。



RNA濃度

RNA濃度が低い場合、A260/A280値が低くなる場合があります。



磁性粒子の混入

磁性粒子が混入しますと、バックグラウンド(A320)が高くなったり、ノイズが出る場合があります。吸光度測定やAgilent 2100Bio Analyzerでの分析前には10000g、1分間遠心後の上清をお使いください。

(3) RNAが分解し
ている



サンプル量が過剰

過剰なサンプル量を用いた場合、RNaseを十分に不活性化できない場合があります。サンプル量を減らして検討します。



溶出液の放置

処理終了後のサンプルを長時間放置しないで下さい。抽出終了後、速やかに溶出チューブのフタを閉め、-80℃に保管して下さい。



サンプル保存の影響

抽出後速やかな凍結が行われなかったサンプルや凍結融解を繰り返したサンプルを抽出に用いると、RNAの分解が確認されます。サンプルの抽出や保存には細心の注意を払って下さい。



DNaseの選定

DNaseIの処理によってRNAが分解を受ける場合があります。RNase FreeのDNase Iを使用するか、推奨メーカーのDNase Iを使用して下さい。DNase bufferも同様、RNase Freeのものをご使用ください。

(4) RT-PCRがうまく
いかない



Genomic DNAの混入

イントロンレス遺伝子や配列の似た遺伝子がゲノム上に存在する場合、ゲノムDNAの影響を考慮する必要があります。6GC/12GCでDNase 処理を含むプロトコルで抽出を行ったRNAを解析に使用してください。



DNaseの選定

(3)を参照。



サンプル量が過剰

サンプル量を減らして検討します。(1)(2)(3)を参照。

(5) 溶出液が着色
する



ヘム、クロロフィルの
混入

ヘモグロビンやクロロフィルを多量に含むサンプルを用いた場合、溶出液が若干着色する場合があります。サンプル量を減らすか、特に組織サンプルの場合、血液成分の混入をなるべく避けてください。



磁性粒子の混入

磁性粒子が混入すると回収液が黒っぽく見えることがあります。酵素反応に影響を及ぼすことはありませんが、遠心操作で磁性粒子を落してください。(2)を参照。

(6) 磁性粒子が
凝集する



サンプル量が過剰

サンプル量を減らして検討します。(1)(2)(3)を参照。



Magratation System 12GC Plus

Automated Nucleic Acid Isolation and Purification System

クイックプロトコール ~ RNA Purification ~



サンプルの前処理



- ① 0.1-0.25%トリプシンを添加したPBSをディッシュに加え、細胞を剥離してください。剥離後は血清含有培養液を添加し、遠心操作に移ってください。遠心後、最低一回以上の洗浄を行ってください。
- ② 組織サンプルを液体窒素中で乳鉢と乳鉢を用いて細かい粉末にしたものをRNA安定化剤に入れてください。ビーズショッカーで使用するビーズの種類によっては破砕液を全量吸引しにくい場合、RNA安定化剤を多めに添加してください。
- ③ 組織サンプル量を多く入れても処理には問題ありませんが、RNAの安定性が低下しますので10mg/150μlを目安として調整してください。
- ④ 組織破砕の目安は、1000 μl のピペッターで詰りなく容易にMixingできる程度としてください。
- ⑤ 1.5ml スクリューキャップチューブ^{*1}に
Tissue 破砕液 : 150 μl または
Cell 懸濁液 : 200 μl を分注して下さい。
規定量以上は装置上で吸引しませんのでご注意ください。

*1 キットに付属のものを使用すること。

*2 推奨品 Ambion : RNA later[®] (Cat# 7020)

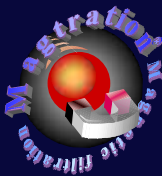
*3 推奨破砕機
QIAGEN
: Tissue Lyser(Cat# 85200)、
Roche Diagnostics
: MagNA Lyser(Cat# 3358968)

各種組織の処理条件の詳細は上記のメーカーの説明書又はHandbookをご参照ください。

 Precision System Science

〒271-0064
千葉県松戸市上本郷88
047-303-4800(代)

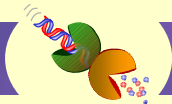
テクニカルサポート
TEL : 047-303-4801
E-mail : tech-support@pss.co.jp



Magratration System 12GC Plus

Automated Nucleic Acid Isolation and Purification System

クイックプロトコール ~ RNA Purification ~



DNase I の調整



DNase 推奨品

DNase I RNase-free	(Ambion , Cat. No. 2222)
DNase I, Amplification grade	(Invitrogen, Cat. No. 18068-015)
DNase I (RNase-free)	(TaKaRa, Cat. No. 2215A)
RQ1 RNase-Free DNase	(Promega, Cat. No. M6101)
Deoxyribonuclease (RT Grade)	(Nippon Gene, Cat. No. 313-03161)
DNase I, RNase-free	(Roche, Cat. No. 776785)



10X DNase buffer 推奨品

DNase I buffer 10X	(Ambion , Cat. No. 8170G)
10X DNase (RT Grade) buffer	(Nippon Gene, Cat. No. 特注品)



DNaseの調整

1. Magratration®-MagaZorb® RNA common kit 付属の1.5mlチューブを用意します。
2. 推奨DNase I 及び10X DNase bufferを用意します。
3. 下記のテーブルに従いDNase溶液を調整します。



下記のテーブルに従い、トータルで80-100µlの範囲でDNase I溶液を調整します。各メーカーのDNase I及びDNase buffer (A ~ C) の組み合わせにより調整容量が異なりますのでご注意ください。調整後の溶液はMagratration System 6GC/12GCの指定の場所にセットしてください。

例) TakaraのDNase、NipponGeneのbufferを使用する場合。

DNaseを8µl、10X bufferを30µl、10X BSAを60µlでトータル98µlとなります。

DNase I の使用量

DNase I	DNase I (µl)
Ambion, DNase I RNase-free	20 [2U/µl]
Invitrogen, DNase I, Amplification grade	1 [114U/µl]
TaKaRa, DNase I (RNase-free)	8 [5U/µl]
Promega, RQ1 RNase-Free DNase	40 [1U/µl]
Nippon Gene, Deoxyribonuclease (RT Grade)	40 [1U/µl]
Roche, DNase I, RNase-free	4 [10U/µl]



各社Buffer の使用量

A 添付buffer (µl)	B Ambion 10X buffer (µl)	C NipponGene 10X (RT-Grade)buffer	
		10X buffer (µl)	10X BSA (µl)
B	80	30	50
添付なし	80	30	60
80	80	30	60
60	60	40	20
C	60	40	20
添付なし	80	30	60