

簡易プロトコル紹介： Dynabeads™ Oligo (dT)₂₅ を用いた mRNA 抽出・精製

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

* ご案内 *

このプロトコルは、一般的な mRNA 抽出・精製に対するものです。

ここでは例として Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を 200 µL (1mg) 用います (目安：20-50 mg 動物組織サンプル、100 mg 植物組織サンプルまたは 1 - 4 x 10⁶ cells)。これは必要に応じてスケールアップあるいはダウンが可能です。

用意する Buffer 類

- **Binding Buffer :**
20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 M LiCl, 2 mM EDTA
- **Lysis/Binding Buffer :**
100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM dithiothreitol (DTT)
沈殿が観察された場合、室温まで温め、攪拌してすべてのコンポーネントを完全に溶解してください
- **Washing Buffer A :**
10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% LiDS
- **Washing Buffer B :**
10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
- **Reconditioning Solution:**
0.1M NaOH
- **Storage Buffer Oligo (dT)₂₅ :**
250 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM EDTA, 0.1% Tween-20, 0.02% NaN₃

プロトコル

Dynabeads の準備

1. ピペッティングまたは、ローラーにて回転させ (5 分)、完全に Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を再懸濁し、チューブへ 200 µL (1mg) を移す
2. 磁石 (DynaMag) に取り付け、上清を除去する
3. 磁石からチューブを外し、100 µL の Binding Buffer を加え、再懸濁する
4. 磁石に取り付け、上清を除去する
5. 磁石からチューブを外し、100 µL の Binding Buffer に再懸濁する

細胞溶解液からの mRNA の単離

- 100 μL の Binding Buffer に再懸濁した洗浄済みの Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を磁石に取り付け、上清を除去し、磁石から外して細胞溶解液を加える
Note : 細胞溶解液は Dynabeads Oligo (dT)₂₅ 混合直前に溶解させたものか、使用直前まで -80°C で保存したものを使用してください
- Dynabeads Oligo (dT)₂₅ と溶解物をよく混合する
- ローラー、あるいはミキサーを用いて室温で 3 - 5 分、アニーリングさせる。
Note : 溶液に粘性がある場合にはアニーリング時間を増やしてください。このステップでサンプル中の mRNA は oligo dT 配列にアニーリングされます
- チューブを磁石に取り付け、2 分間静置後、上清を除去する
- Dynabeads - mRNA 複合体に Washing Buffer A (0.5 - 1 mL) を加え洗浄する
- チューブを磁石に取り付け、2 分間静置後、上清を除去する
- 続いて Washing Buffer B (0.5 - 1 mL) を加え洗浄する
- チューブを磁石に取り付け、2 分間静置後、上清 (Washing Buffer B) を除去する
- チューブを磁石から外し、10 - 20 μL 10mM の Tris-HCl, pH7.5 に再懸濁させる
- 75 - 80°C、2 分間インキュベートする
- チューブを磁石に取り付け、素早く mRNA を含む上清を新しい RNase フリーのチューブへ移す

Total RNA から mRNA の精製

このプロトコルは 75 μg の total RNA をスタートサンプルとしています

- Total RNA サンプルを 75 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ になるように distilled DEPC-treated water あるいは 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 を調製する
- 100 μL の Binding Buffer を加える。Total RNA の量が 75 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 未満の場合は、Binding Buffer で最終的に 200 μL になるように調整する
- RNA の高次構造を解消するために 65°C、2 分間インキュベートし、直ちに氷冷する
- 上記 3 のチューブに 100 μL の Binding Buffer に再懸濁した洗浄済みの Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を加える
- ミキサー等で攪拌しながら室温で 5 分間アニーリングする
- チューブを磁石に取り付け、2 分間静置後、上清を除去する
- 200 μL の Washing Buffer B (0.5 - 1 mL) を加え、慎重に 2、3 回ピペッティングしながら洗浄する。再度チューブを磁石に取り付け、2 分間静置後、上清 (Washing Buffer B) を完全に除去する
- 上記 7 の洗浄ステップを繰り返す
- チューブを磁石から外し、10 - 20 μL の 10mM Tris-HCl, pH7.5 に再懸濁させる
- 75 - 80°C、2 分間インキュベートする
- チューブを磁石に取り付け、素早く mRNA を含む上清を新しい RNase フリーのチューブへ移す

Dynabeads Oligo (dT)₂₅ の再生

【同一サンプルを使用する場合】

mRNA を溶出した後の Dynabeads Oligo (dT)₂₅ は同一サンプルであれば再生することなく使用できます。同じサンプルに対して mRNA を溶出した Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を用いて、同じ操作を繰り返すことでさらに mRNA を単離することも可能です。

【異なるサンプルを使用する場合】

異なるサンプルを用いる場合には、Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を再生して使用してください。5 回まで再生して利用することができます。

【再生プロトコル】

本プロトコルは最初に 100 μ L の Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を用いた場合です

1. 使用した Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を最初に分取した際と同量である 100 μ L の Reconditioning Solution を加え、懸濁液を新しい RNase-free のチューブへ移す
2. 65°C で 2 分間インキュベート
3. 磁石にセットして 30 秒間静置した後、上清を除去する
4. Reconditioning Solution で 2 回洗浄する (1~3 の操作を計 3 回おこなう)
5. Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を 100 μ L の Storage Buffer に懸濁する
6. 磁石にセットして 30 秒間静置した後、上清を除去する
7. 5 - 6 の操作をあと 2 回 (計 3 回) 繰り返す (あるいは pH が 8 以下になるまでおこなう)
8. 100 μ L の Storage Buffer に懸濁し冷蔵 (2-8°C) で保管する

Note : 一度用いた Dynabeads Oligo (dT)₂₅ を保管する場合は、コンタミを防ぐためにオリジナルのバイアルには戻さず、別のチューブで保管してください

製品リスト

Dynabeads Oligo (dT)₂₅

商品コード	商品名	梱包単位
DB61002	Dynabeads Oligo (dT) ₂₅	2 mL x 1
DB61005	Dynabeads Oligo (dT) ₂₅	5 mL x 1

Dynabeads Oligo (dT)₂₅ + バッファー付きのキット

商品コード	商品名	梱包単位
DB61006	Dynabeads mRNA Purification kit	2 mL
DB61011	Dynabeads mRNA DIRECT kit	5 mL
DB61012	Dynabeads mRNA DIRECT kit (8/40 isol.)	10 mL
DB61021	Dynabeads mRNA DIRECT Micro kit (100isol.)	2 mL

Dynabeads Oligo (dT)₂₅ 専用バッファー

商品コード	商品名	梱包単位
DBA33562	Lysis/Binding Buffer for Dynabeads mRNA Purification Kits	60 mL
DBA33565	Wash Buffer A for Dynabeads mRNA Purification Kits	60 mL

Dynabeads 専用磁石

商品コード	商品名	説明	梱包単位
DB12027	DynaMag-96 Side Skirted	96 ウェルタイタープレート、～96 ウェル平底プレート用 (48 ウェルは不可)	1 個
DB12320	DynaMag SPIN	1.5 mL チューブ 6 本立て	1 個
DB12321	DynaMag-2	1.5 mL または 2.0 mL チューブ 16 本立て	1 個
DB12331	DynaMag-96 Side	PCR プレート用 (ビーズをチューブ壁面に集めます)	1 個
DB12332	DynaMag-96 Bottom	PCR プレート用 (ビーズをチューブ底面に集めます)	1 個

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3 号館 5 階

TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076

技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail techservice@veritastk.co.jp