

Agilent RNA 6000 Nano Assay プロトコール(操作手順書) v.03

お手数ですが、できるだけなくなる1週間前に次のキットをご注文いただきますようお願い申し上げます。(Agilent RNA6000ナノキット PN 5067-1511)

シリーズ II

使用前の注意事項

- ・ 試薬は4℃で保管してください。ラボチップ*は室温で保管して下さい。
- ・ RNase-freeのピペットチップを使用してください。Gel-Dyeの調製には付属のチューブを使用してください
- ・ 試薬は、室温に30分以上置いてから使用してください。保存条件(4℃)では、Dye(発色蛍光剤)が凝固しています。室温に戻した後、Vortexでよく攪拌し、均一になったことを必ず確認してください。
- ・ Dye(発色蛍光剤)及びDyeの混合液は、ピペティングの時以外は光にあてないように注意してください。光にあたると、Dyeは分解します。
- ・ RNA6000ラダーは、分析前に熱変性処理および分注を行い、適切な状態で保管してください。
- ・ RNA6000サンプルは、分析前に熱変性処理を行い、氷上で保管してください。
(手順は別紙をご参照ください。)
- ・ ラボチップのウェルに試薬をアプライするときは、ピペットチップの先をウェルの底に押し付けてアプライしてください。
- ・ ラボチップに試薬とサンプルをアプライし終わったら、5分以内に分析を開始してください。
5分以上放置すると試薬が乾燥したりDyeが分解するなどし、良い結果が得られない場合があります。
- ・ **本キットには変異原性及び毒性をもつ可能性があるDye/DMSO溶液が含まれています。必ず、ご所属のラボの安全ガイドに従い、手袋、マスク、眼鏡、白衣等を着用して実験を行ってください。特に手袋は、必ず着用してください。**
- ・ 一度使用したラボチップは再利用できません。
- ・ 使用済みのチップの処理については、分析したサンプルの安全性を考慮のうえ、ご所属のラボ、施設もしくは地域で定められた区分に従い、廃棄してください。

ラボチップキット以外に準備するもの

- ・ ピペット(10 μ l、100 μ l、1000 μ l)とピペットチップ(ピペットに対応するRNase Freeのもの)
※ピペットチップはオートクレーブしないで下さい。
- ・ 高速小型遠心器(13,000xg以上で操作できる物。必ず、遠心機ローターが室温に戻ってからご使用ください。)

サンプルの調製

- ・ 本プロトコールに従い、分析前に熱変性処理を行ってください。
- ・ RNA濃度をできるだけ正確に定量するためには、サンプル中のtotal RNA量が25~500ng/ μ lの範囲になるようにサンプルを調製してください。もし、濃度が濃い場合は、RNase-free水でサンプルを希釈してください。特に濃度が濃すぎる場合は、分析結果に悪影響を与えることがあります。

電極の洗浄方法

- ・ RNA6000ナノキットで使用する電極カートリッジはRNA6000ナノアッセイ専用でお使いいただくことをお奨めします。また、直前に分析した試料がRNaseに汚染されている可能性がある場合は、以下とは異なる手順での洗浄が必要です。(別紙をご参照ください。)

<RNAのみを分析する場合の電極の洗浄方法>

注意；電極クリーナーは1キットにつき2個入っています。一方をRNase Zap用、もう一方をRNase-Free水用を使用してください。それぞれ‘RNase Zap用’‘RNase-Free水用’と書いて区別して保管してください。

※RNaseZAP (cat.no.9780)は、Ambion社の製品です。

- 1) 電極クリーナーに、**350 μ lのRNase Zap**を満たします。(RNase Zapは350 μ l以上入れないように注意してください)
- 2) **RNase Zap**の入った電極クリーナーをAgilent 2100Bioanalyzerにセットします。
- 3) ふたを閉め、**60秒間**おきます。
- 4) この間に、別の電極クリーナーに、**350 μ lのRNase-Free水**を満たします。(RNase-Free水は350 μ l以上入れないように注意してください)
- 5) ふたを開け、RNase Zapの入った電極クリーナーを取り外します。(この電極クリーナーは繰り返し使用しますので、**‘RNase Zap用’**と書いて保管してください。)
- 6) **RNase-Free水**の入った電極クリーナーをAgilent 2100Bioanalyzerにセットします。
- 7) ふたを閉め、**10秒間**おきます。
- 8) ふたを開け、電極クリーナーを取り外します。(この電極クリーナーは繰り返し使用しますので、**‘RNase-Free水用’**と書いて保管してください。)
- 9) 電極が乾燥するまで、**10秒間**ふたを開けておきます。
- 10) ふたを閉めます。



Agilent Technologies

Agilent RNA 6000 Nano Assay プロトコール(操作手順書) v.03

お手数ですが、できるだけなくなる1週間前に次のキットをご注文いただきますようお願い申し上げます。(Agilent RNA6000ナノキット PN 5067-1511)

シリーズ II

<RNA6000ラダー、RNAサンプルの熱変性処理手順(推奨)>

RNA 6000 Nano Assayプロトコールは、未変性条件下でRNAを電気泳動します。RNAの高次構造の影響をできるだけ防ぐために、RNA6000ラダーとRNAサンプルは、分析前に熱変性処理を行ってください。

ヒートブロックまたは温水浴中で、70°Cで2分加熱します。熱処理後はすみやかに氷上に移してください。

準備

RNase-FreeのピペットチップおよびRNase-Freeのチューブを用意します。

必ず手袋をして取り扱ってください。

1. Agilent RNA6000ナノ・ラダ(黄●)を溶解させた後、小型遠心器で約5秒スピンドウンし、壁面の液を落としてください
2. 次に、20 ul容量のピペットチップを付けたピペッターで、数回のピペッティングを行い混合し直します。
3. RNase-Free チューブに全量移します。
4. 上記1-3で調製されたRNA6000ラダー、またはRNAサンプルをヒートブロック、または温水浴中で70°C/2分熱処理した後、速やかに氷上に移し、5分間放置します。
5. 変性したRNAラダーを 適量ずつ(1日使用量ずつ) RNase-free チューブに分注してください
6. 分注後は、-80°Cで保存します。
7. 使用の際は融解し、氷上で保存してください(再度熱変性を行わないでください)

※ ラダーの熱処理が不十分な場合、ピークがブロードになったり、あるいは2つに分かれたりすることがあります。

※ ラダーの凍結融解の繰り返しは4~5回に止めるようにしてください。通常、上記熱変性処理を行い、再凍結したものは、そのまま融解させて使用できます。

※ Agilent RNA6000ナノ・ラダは別途ご購入いただけます。(PN 5067-1529)



Agilent Technologies

Agilent RNA 6000 Nano Assay プロトコール(操作手順書) v.03

シリーズ II

Gelの調製

1. 付属のスピンドフィルターに、RNA gel matrix (赤 ●) を550 μ l移します。この時、gel matrixは必ず室温に戻してから使用してください。
※Gel matrixは粘性が高いので、ピペット操作はゆっくり行い、ピペットにゲルが残らないようにしてください。
※Dye溶液はろ過した後に添加することになります。他のアッセイと異なるのでご注意ください。
2. 1500g \pm 20%で10分間遠心を行います。
※遠心分離機の温度を室温にしてから、遠心してください。遠心後再度、Vortexで攪拌して使用してください。
3. 遠心ろ過したgel matrixをキットに付属のチューブに65 μ lずつ分注します。
※必ず付属の0.5 mL チューブを使用してください。
※分注したgel matrixは、1ヶ月以内(4°C保存)に使用してください。

Gel-Dye Mixの調製

1. 分注した1本のgel matrix 65 μ lに、RNA dye溶液(青 ●)を1 μ l入れます。この時、Dye溶液は必ず30分以上室温に置いた後、Vortex等で均一にしてから、使用してください。
2. Gel-Dye MixをVortexとタッピングを併用してよく混合します。
3. 13,000gで10分間遠心を行います。
※遠心分離機の温度を室温にしてから、遠心してください。
※遠心作業終了後は直ちに、使用してください。
※この溶液は光にあてないようにしてください。
※なお、Gel-Dyeは調製当日限り有効です、余ったGel-Dyeは廃棄してください。

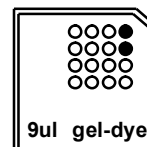
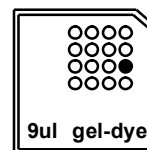


Gel-Dye Mixのアプライ

<確認事項>

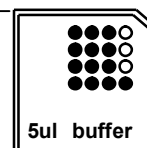
- ※クリップの銀色のストッパーを一番上の段にセットしてください。プランジャーは1mlの位置まで引きます。
- ※シリンジをチップ調製スタンドのふたに取り付けます。(ルアーロック)
- ※チップ調製スタンドのふたをあけて(※ふたの右端の銀色のストッパーを上へ上げるとふたが上がります)底面プレートがCの位置になっていることを確認してください。

1. 新しいRNAナノ用のラボチップを開封しスタンドの上に置きます。
2. Gel-dye mix 9 μ lを [G] (白抜きG) マークのウェルにアプライします。
※遠心作業終了後直ちに行ってください。また、液層の中間層からピペティングし、底部を取らないようご注意ください。
※ピペット操作はゆっくり行い、ピペットにゲルが残らないようにしてください。
3. チップ調製スタンドのふたを閉めます。 ※“カチット”音がすることを確認してください。
4. プランジャーをクリップで止まる位置まで押しこみ、そのまま30秒保持します。
5. クリップのストッパーを外して、プランジャーを解放した後、元の位置(1ml)まで戻します。
6. チップ調製スタンドのふたを開けます。
7. ゲルがアプライできたら、ラボチップを裏返して、流路に泡がはいっていないことを確認してください。(細かい流路が完全に見えなくなったらOKです。)
8. Gel-dye mix 9 μ lを2ヶ所の [G] マークのウェルにアプライします。



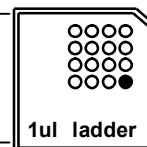
Sample Bufferのアプライ

1. Marker (緑 ●) 5 μ lを [H] マークのウェルにアプライします。
2. Marker (緑 ●) 5 μ lを各サンプルウェルにアプライします。
サンプルの数が11個以下でも、必ず全部のサンプルウェルにMarkerをアプライしてください。
16本の電極全てを分析に使用するため、Markerがないと、分析が正常に行われなくなります。



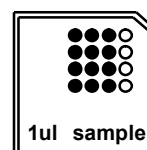
Ladderのアプライ

1. RNA6000ラダー(黄 ●) 1 μ lを [H] マークのウェルにアプライします。
RNA6000ラダー(黄 ●)は、必ず熱変性処理したものをご使用ください。(別紙参照)
※RNAラダーはAgilent RNA6000 ナノキットに含まれているものを必ずご使用ください。



サンプルのアプライ

1. サンプル1 μ lを各サンプルウェルにアプライします。
サンプルが11個以下の場合は、使わないサンプルウェルにMarker (緑 ●) 1 μ lを足してください。
2. ラボチップ専用のボルテックスミキサーの目盛りを、2400rpmに合わせ、ラボチップを載せ、1分間混合します。
※攪拌スピードが不適当な場合、結果に悪影響を及ぼすことがあります。
3. 調製の終わったラボチップは、5分以内にAgilent 2100Bioanalyzerにセットして、分析をスタートしてください。
4. 分析終了後は、必ず本プロトコール1ページに記載した方法により電極を洗浄してください。



Agilent Technologies

Agilent RNA 6000 Nano Assay プロトコール(操作手順書) v.03

お手数ですが、できるだけなくなる1週間前に次のキットをご注文いただきますようお願い申し上げます。(Agilent RNA6000ナノキット PN 5067-1511)

シリーズ II

<RNaseで汚染されている電極の洗浄方法>

※ピン電極部分のみの取り外しができないタイプの電極の場合

- ・ バイオアナライザ本体から電極アセンブリを取り外します。
- ・ 電極ピンを下側に向けて電極アセンブリを持ち、柔らかい歯ブラシをRNase ZAPまたはRNase Awayに浸して、できるだけそっと、かつ徹底的に数分間電極を磨きます。RNase Zapは洗浄剤が入っているので、泡が立ちます。液が、電極ピン以外のところにつかないように注意してください。
- ・ 電極アセンブリを、電極ピンを下側に向けてピーカーの上にそっと置きます。電極ピンがどこにも触れないように注意してください。
- ・ 泡が消えたら、きれいな歯ブラシをRNase-Free水に浸し、電極ピンをそっと磨きます。
- ・ 次にきれいな歯ブラシをエタノールに浸し電極ピンをそっと磨きます。
- ・ 再度きれいな歯ブラシをRNase-Free水に浸し、電極を完全にきれいにします。
- ・ エアクリーナー（カメラ、コンピュータ店などで入手できます。）を吹き付けて、電極を乾かします。
- ・ 電極アセンブリを、電極ピンを下側に向けてピーカーの上にそっと置きます。電極ピンがどこにも触れないように注意してください。このまま2時間以上置いて完全に乾かします。
※この洗浄を行ったときは、洗浄後少なくとも2時間はバイオアナライザを使用しないでください。
- ・ 電極アセンブリを元通りバイオアナライザ本体に取り付けます。
- ・ ハードウェアの自己診断を行います。(Instrument contextでDiagnostics tabを選ぶ)
- ・ 自己診断メニューから、short circuit test のみを選択し、実行します。このテストは2~3分かかります。このテストには未使用のDNAまたはRNAチップが必要です。このテストに使ったチップは、後で通常の分析に使用できます。
- ・ short circuit test をパスしない場合は、電極が完全には乾いていません。さらに2時間以上置いてshort circuit test を繰り返してください。さらにこのテストをパスしない場合は、電極を外してエアクリーナーをよく吹き付けて乾燥させ、再度テストを繰り返してください。もしどうしてもテストをパスしない場合は、アジレント・テクノロジー株式会社のコールセンターまでご連絡ください。

※ピン電極部分のみの取り外しができるタイプの電極の場合

- ・ このタイプの電極は、ピン電極部分を取り外し、その部分のみ下記の溶液による洗浄が可能です。
 - ・ ミリQレベルの純水
 - ・ イソプロパノール
 - ・ RNaseZAP
- ・ 汚れが気になる場合、ピン電極部分のみオートクレーブが可能です。プラスチック材料のオートクレーブ法に従って処理してください。
- ・ 洗浄後は完全に乾かしてから、上記手順でshort circuit test を行い、パスすることを確認してご使用下さい。



Agilent Technologies