

RiboAmp™ RNA Amplification Kit Protocol

マイクロアレイセンターでは RiboAmp™ RNA Amplification Kit (ARCTURUS 社製カタログ番号 KIT0201) を使用している。

本キットに含まれている -20℃ 保存試薬のチューブには、様々な色のチューブが貼られている。本プロトコルではチューブラベルの色を“プライマー-A (ベージュ)”の様に表記する。これらすべての試薬は使用前に氷上で保持しておく。

Round One : 1st Strand Synthesis

1. RNA サンプルを 1.5ml RNase-free チューブでヌクレアーゼ free-water により 10 µl に調節したものを準備する。
2. プライマー-A (ベージュ) 1.0 µl を加え、混合してからスピンドウンする。
プライマー-A (ベージュ) は使用前に溶解し、よく混ぜてからスピンドウンしておく。
3. 65℃ で 5 分間インキュベートする。
4. 氷上で 1 分間冷却し (6 に進むまで氷上で維持する) スピンドウンする。
5. 未使用の 1.5ml RNase-free チューブで以下の 2 試薬を混合し、“供試サンプル数 + 1 サンプル” 分の 1st Strand Synthesis Mix を作成する。
1st Strand Master Mix (赤) は、溶解してから氷上に置く。
1st Strand Enzyme Mix は溶解せず、そのまま氷上に置く。

* 1 サンプル分の混合比重

1 st Strand Master Mix	7 µl
1 st Strand Enzyme Mix	2 µl
+ (= 1 st Strand Synthesis Mix)	9 µl

1st Strand Synthesis Mix は作成後、氷上で維持する。

6. 前項 4. で冷却したサンプルに、1st Strand Synthesis Mix 9 µl を加えて混合し、スピンドウンする。
7. 42℃ で 45 分間インキュベートする。
8. 氷上で 1 分間冷却し、スピンドウンする。
9. 1st Strand Nuclease Mix (ゴールド) 2 µl を加えて、混合し、スピンドウンする。
10. 37℃ で 20 分間インキュベートする。
11. 95℃ で 5 分間インキュベートする。(キャップロック等を使用して、チューブの蓋が開かないようにする)
12. 氷上で 1 分間冷却し、スピンドウンする。(次項に進むまで氷上で保持する)

Round One : 2nd Strand Synthesis

1. 前節 12.のサンプルに、氷上で冷却したプライマーB(ピンク)1.0 µl を加えて混合し、スピンドウンする。
プライマーB(ピンク)は使用前に溶解し、よく混ぜてからスピンドウンしておく。
2. 95 °C で 2 分間インキュベートする。(キャップロック等をはめる)
3. 氷上で 2 分間冷却し、スピンドウンする。(次に進むまで氷上で維持する)
4. 未使用の 1.5ml RNase-free チューブで以下の 2 試薬を混合し、“供試サンプル数 + 1 サンプル” 分の 2nd Strand Synthesis Mix を作成する。
2nd Strand Master Mix(白)は溶解してから氷上に置く。
2nd Strand Enzyme Mix は溶解せず、そのまま氷上に置く。

* 1 サンプル分の混合比重

2nd Strand Master Mix 29 µl
2nd Strand Enzyme Mix 1 µl
+ (= 2nd Strand Synthesis Mix) 30 µl

2nd Strand Synthesis Mix は作成後、氷上で維持する。

5. 前項 3 で冷却したサンプルに 2nd Strand Synthesis Mix 30 µl を加え混合し、スピンドウンする。
6. サンプルを以下の順にインキュベートする。
25 5 分間
37 10 分間
70 5 分間
4 次項に進むまで保持する。(最大 30 分まで保持可能)

Round One : cDNA Purification

1. コレクションチューブ(キットに付属)に DNA/RNA Purification カラムをセットし、DNA Binding Buffer (DB) 250 µl を加える。
2. 室温で 5 分間静置する。
3. 16000 × g で 1 分間遠心し、フロースルー液を廃棄する。
4. コレクションチューブにカラムを再びセットする。前節 6.で冷却保持していたサンプルに DNA Binding Buffer(DB) 200 µl を加え、よく混ぜる。
5. ピペットで 4 の全液量を吸い取り、精製カラムに移す。
6. 100 × g で 2 分間遠心する。
7. 10000 × g で 30 秒間遠心し、フロースルー液を廃棄する。
8. コレクションチューブにカラムを再びセットし、DNA Wash Buffer(DW) 250 µl を加え

- る。
9. $16000 \times g$ で 2 分間遠心する。
 10. フロースルー液とコレクションチューブを廃棄する。
 11. 精製カラムをマイクロ遠心チューブにセットし、メンブレンの中央に DNA Elution Buffer(DE) $24 \mu\text{l}$ を慎重に加える。
 12. 室温で 1 分間インキュベートする。
 13. $16000 \times g$ で 1 分間遠心する。
 14. 精製カラムを廃棄し、cDNA を含む溶出液を氷上で保持する。

Round One : *In Vitro* Transcription (IVT)

すべての IVT Reaction components を氷上で溶解する。

IVT Enzyme Mix は溶解せず、そのまま氷上に置く。

試薬は使用直前に室温に持ってくる。

使用後の試薬は直ちに氷上に置くか、再凍結させる。

試薬を長時間室温に放置しない。

DNase Mix は使用するまで氷上で保持する。

1. 未使用の 1.5ml RNase-free にチューブに下記の 3 試薬を混合し、“ 供試サンプル + 1 サンプル ” 分の IVT Reaction Mix を作成し、穏やかに混和してスピンドウンする。

* 1 サンプル分の混合比重

IVT Buffer $8 \mu\text{l}$

IVT Master Mix $12 \mu\text{l}$

IVT Enzyme Mix $4 \mu\text{l}$

+ + (= IVT Reaction Mix) $24 \mu\text{l}$

IVT Reaction Mix は作成後、氷上に置く

2. 前節 14. のサンプルに IVT Reaction Mix $24 \mu\text{l}$ を加え、混合してからスピンドウンする。
3. 42°C で 2.5 時間インキュベートする。(オプション : 42°C で 4 時間インキュベートする。)
4. 氷上で 4°C まで冷却する。(約 2 分間氷上に置く)
5. DNase Mix (ブルー 4) を $2 \mu\text{l}$ 加え、混合してからスピンドウンする。
6. 37°C で 15 分間インキュベートする。
7. 氷上で 4°C まで冷却する。

7 が終了したら直ちに次のステップへ進む。

Round One : Antisense RNA (aRNA) Purification

RNA Binding Buffer (RB) は室温保存し、使用前によく混ぜる。沈殿物がある場合はよく混ぜて沈殿を溶かすか、チューブを温めて溶解する。

1. コレクションチューブに新しい DNA/RNA Purification column をセットし RNA Binding Buffer (RB) 250 μ l を入れて、5 分間室温に置く。
2. 16000 $\times$ g で 1 分間遠心する。
3. フロースルー液を廃棄し、再びコレクションチューブにカラムをセットする。
4. 前節 7. のサンプルに RNA Binding Buffer (RB) 200 μ l を加え、よく混ぜる。
5. 前節 4. の全液量をピペットで精製カラムに移す。
6. 100 $\times$ g で 2 分間遠心する。
7. 10000 $\times$ g で 30 秒間遠心する。
8. フロースルー液を廃棄し、コレクションチューブにカラムをセットする。
9. RNA Wash Buffer (RW) 200 μ l を精製カラムに加える。
10. 10000 $\times$ g で 1 分間遠心する。
11. フロースルー液を廃棄し、カラムをコレクションチューブにセットする。
12. RNA Wash Buffer (RW) 200 μ l をカラムに加える。
13. 16000 $\times$ g で 2 分間遠心する。
14. フロースルー液とコレクションチューブを廃棄し、キット内の新しいマイクロ遠心チューブにカラムをセットする。
15. RNA Elution Buffer (RE) 30 μ l をメンブレンの中央に慎重に加え、穏やかにタッピングする。
16. 室温で 1 分間インキュベートする。
17. 16000 $\times$ g で 1 分間遠心する。
18. カラムを廃棄し、チューブの溶出液を使用する。
19. バキューム遠心機を用いて 10 μ l になるように濃縮する。キット内の RNase-free water を用いて、サンプルの最終液量が 10 μ l になるように調節し、ピペットの目盛りを 10.0 μ l に合わせ確認する。

Round Two : 1st Strand Synthesis

1. ラウンド 1 のサンプル (aRNA) をヌクレアーゼ free-water で 10 μ l に調節したものを準備する。
2. プライマー B (ピンク) 1.0 μ l を加え、混合してからスピンドウンする。
プライマー B (ピンク) は使用前に溶解し、よく混ぜてからスピンドウンしておく。
3. 65 °C で 5 分間インキュベートする。
4. 氷上で 1 分間冷却し (6 に進むまで氷上で維持する) スピンドウンする。

5. 未使用の 1.5ml のチューブに以下の試薬を混合し、“ 供試サンプル数 + 1 サンプル ” 分の 1st Strand Synthesis Mix を作成する。

1st Strand Master Mix(赤)は溶解してから氷上に置く。

1st Strand Enzyme Mix は溶解せず、そのまま氷上に置く。

*** 1 サンプル分の混合比重**

1st Strand Master Mix 7 μ l

1st Strand Enzyme Mix 2 μ l

+ (= 1st Strand Synthesis Mix) 9 μ l

1st Strand Synthesis Mix は作成後、氷上に置く。

6. 前項 4.で冷却したサンプルに、1st Strand Synthesis Mix 9 μ l を加えて混合し、スピンドウンする。
7. 25 °C で 10 分間インキュベートする。
8. 37 °C で 45 分間インキュベートする。
9. 氷上で 1 分間 (最大でも 30 分間保持可) 冷却し、軽くスピンドウンする。

Round Two : 2nd Strand Synthesis

1. 前節 9.の氷上に保持していたサンプルにプライマーA(ベージュ)1.0 μ l を加え混合し、スピンドウンする。

プライマーA (ベージュ) は使用前に溶解し、よく混ぜてからスピンドウンしておく。

2. 95 °C で 2 分間インキュベートする。(キャップロック等を使用して、チューブの蓋が開かないようにする)
3. 氷上で 2 分間冷却する。
4. 1.5ml のチューブに以下の試薬を混合し、“ サンプル数 + 1 サンプル ” 分の 2nd Strand Synthesis Mix を作成する。

2nd Strand Master Mix(白)は溶解して氷上に置く。

2nd Strand Enzyme Mix は溶解せず、氷上に置く。

*** 1 サンプル分の混合比重**

2nd Strand Master Mix 29 μ l

2nd Strand Enzyme Mix 1 μ l

+ (= 2nd Strand Synthesis Mix) 30 μ l

2nd Strand Synthesis Mix は作成後、氷上に置く。

5. 冷却したサンプルに 2nd Strand Synthesis Mix 30 μ l を加え混合し、スピンドウンする。
6. サンプルを以下の順にインキュベートする。

- 37 15 分間
70 5 分間
4 次に進むまで保持する。(最大 30 分まで保持可)

Round Two : cDNA Purification

1. コレクションチューブ (キットに付属) に DNA/RNA Purification カラムをセットし、DNA Binding Buffer(DB) 250 μ l を加える。
2. 室温で 5 分間静置する。
3. 16000 $\times$ g で 1 分間遠心し、フロースルー液を廃棄する。
4. コレクションチューブにカラムを再びセットする。前節 6. で冷却保持していたサンプルに DNA Binding Buffer(DB) 200 μ l を加え、よく混ぜる。
5. ピペットで 4 の全液量を吸い取り、精製カラムに移す。
6. 100 $\times$ g で 2 分間遠心する。
7. 10000 $\times$ g で 30 秒間遠心し、フロースルー液を廃棄する。
8. コレクションチューブにカラムを再びセットし、DNA Wash Buffer(DW) 250 μ l を加える。
9. 16000 $\times$ g で 2 分間遠心する。
10. フロースルー液とコレクションチューブを廃棄する。
11. 精製カラムをマイクロ遠心チューブにセットし、メンブレンの中央に DNA Elution Buffer(DE) 24 μ l を慎重に加える。
12. 室温で 1 分間インキュベートする。
13. 16000 $\times$ g で 1 分間遠心する。
14. 精製カラムを廃棄し、cDNA を含む溶出液を氷上で保持する。

Round Two : *In Vitro* Transcription (IVT)

すべての IVT Reaction components を氷上で溶解する。

IVT Enzyme Mix は溶解せず、そのまま氷上に置く。

試薬は使用直前に室温に持ってくる。

使用後の試薬は直ちに氷上に置くか、再凍結させる。

試薬を長時間室温に放置しない。

DNase Mix は使用するまで 4℃ を維持する。

1. 未使用の 1.5ml RNase-free チューブに下記の 3 試薬を混合し、“サンプル数 + 1 サンプル” 分の IVT Reaction Mix を作成し、穏やかに混和してスピンドウンする。

***1 サンプル分の混合比重**

IVT Buffer	8 μ l
IVT Master Mix	12 μ l
IVT Enzyme Mix	4 μ l
+ + (= IVT Reaction Mix)	24 μ l

IVT Reaction Mix は作成後、氷上に置く。

IVT Reaction Mix をボルテックスにかける場合は最小目盛りとし、穏やかに混ぜるか、タッピングして混ぜる。

2. 前節 14.のサンプルに IVT Reaction Mix 24 μ l を加え、混合してからスピンドウンする。
3. 42 °C で 4 時間インキュベートする。(オプション : 42 °C で 6 時間インキュベートする)
4. 4 °C まで冷却する。(2 分間氷上で保持)
5. DNase Mix (ブルー 4) を 2 μ l 加え、混合してからスピンドウンする。
6. 37 °C で 15 分間インキュベートする。
7. 4 °C まで冷却する。

7 が終了したら直ちに次のステップへ進む。

Round Two : Antisense RNA (aRNA) Purification

RNA Binding Buffer (RB) は室温保存し、使用前によく混ぜる。沈殿物がある場合はよく混ぜて沈殿を溶かすか、チューブを温めて溶解する。

1. コレクションチューブに新しい DNA/RNA Purification column をセットし、RNA Binding Buffer (RB) 250 μ l を入れて、5 分間室温に置く。
2. 16000 $\times$ g で 1 分間遠心する。
3. フロースルー液を廃棄し、再びコレクションチューブにカラムをセットする。
4. 前節 7.のサンプルに RNA Binding Buffer (RB) 200 μ l を加え、よく混ぜる。
5. 前項 4.の全液量をピペットで精製カラムに移す。
6. 100 $\times$ g で 2 分間遠心する。
7. 10000 $\times$ g で 30 秒間遠心する。
8. フロースルー液を廃棄し、コレクションチューブにカラムをセットする。
9. RNA Wash Buffer (RW) 200 μ l を精製カラムに加える。
10. 10000 $\times$ g で 1 分間遠心する。
11. フロースルー液を廃棄し、カラムをコレクションチューブにセットする。
12. RNA Wash Buffer (RW) 200 μ l をカラムに加える。
13. 16000 $\times$ g で 2 分間遠心する。
14. フロースルー液とコレクションチューブを廃棄し、キット内の新しいチューブにカラムをセットする。

15. RNA Elution Buffer (RE) 30 μ l をメンブレンの中央に慎重に加え、穏やかにタッピングする。
16. 室温で 1 分間インキュベートする。
17. 16000 $\times$ g で 1 分間遠心する。
18. カラムを廃棄し、チューブの溶出液を使用する。
19. 溶出液 1 ~ 5 μ l にヌクレアーゼ free-water を加え 100 μ l にし、希釈液を作成する。
20. 精製産物の O.D.値を 260_{nm} と 280_{nm} で測定する。