

NBRP 非生体リソース調整方法

[Total RNA]

使用量

- embryo: 100 個
- brain : 1 個
- eye, testis : 2 個
- dorsal skin : (10 mm)²
- liver, kidney/adrenal, muscle, ovary : (5 mm)³

準備

- skin, muscle : カミソリでミンス
- eye : TRIZOL 100 μ l 中でペッスルを用いて潰す

抽出

1. 専用の 2 ml チューブに TRIZOL 1 ml とガラスビーズを加えておく。
2. Sampling
3. SmartSmash で破碎する (4000 rpm, 1 min)
4. 12000g, 10 min, 4°C 遠心
5. 上清を新しいチューブに移す。
6. クロホルム 0.2 ml を加えボルテックス
7. 15~30°C, 2 分間インキュベート
8. 12000g, 15 min, 4°C 遠心
9. 水相 (about 600 μ l) を新しいチューブに移す
10. イソプロピルアルコール 0.5 ml を加える
11. 15~30°C, 10 分間インキュベート
12. 12000g, 10 min, 4°C 遠心
13. 沈殿に 75%エタノールを 1ml 加える
14. ボルテックス。
15. 7500g, 5 min, , 4°C 遠心
16. 上清を捨てる
17. 沈殿に 75%エタノールを 1ml 加える

18. ボルテックス
19. 7500g, 5 min, , 4°C 遠心
20. RNase free water を加え、ピペッティング
21. 60°C, 10 分
22. 吸光度測定
23. 10 µg (eye: 5 µg) / 100 µl 以上となるように RNase free water でメスアップ
24. 100 µl づつスクリーキャップチューブに分注
25. エタ沈状態 (add 10 µl 3M 酢酸ナトリウム pH5.2, 250 µl EtOH) で-80°C保存
26. 5-10 µg (Eye: 2.5-5 µg) を常温で発送。