

# miRNeasy 96

## プロトコールとトラブルシューティング

動物細胞および組織からの miRNA を含むトータル RNA  
のハイスループット精製用

目次	ページ
プロトコール	
吸引法/遠心法を用いた動物細胞からの small RNA を含むトータル RNA 精製	2
遠心法を用いた動物細胞からの small RNA を含むトータル RNA 精製	7
吸引法/遠心法を用いた動物組織からの small RNA を含むトータル RNA 精製	11
遠心法を用いた動物組織からの small RNA を含むトータル RNA 精製	16
トラブルシューティング	20
<b>Appendix A</b>	
Larger RNA ( >200 nt ) から miRNA 濃縮画分の分離精製	24



# プロトコール：吸引法/遠心法を用いた動物細胞からのsmall RNAを含むトータルRNA精製

実験を始める前の重要事項：

- miRNeasy 96 Kitを初めて使う際には、“Important Notes”(英語版 Handbook 17 ページ)をお読みください。
- RNAの収量および純度が顕著に低下し、プレートの目詰まりの原因になるため、RNeasyプレートをオーバーロードしないでください。英語版 Handbook 17 ページの“Determining the correct amount of starting material”を参照。
- はじめてRNAを取り扱う際にはAppendix C(英語版 Handbook 51 ページ)をお読みください。
- 細胞ペレットは次回使用するまで-70 で保存することも、直ぐに直接調製することもできます。凍結する前に細胞数を測定します。ステップ3でチューブを指で軽く叩いて細胞ペレットをルーズにするために、凍結した細胞ペレットは少し解凍します。

ステップ4でホモジナイズした細胞ライセートは数ヶ月間-70 で保存できます。ホモジナイズした凍結ライセートは完全に融解し、塩類が溶解するまで37 の水浴中でインキュベートしてから調製します。RNAが分解する可能性があるため、長くインキュベートすることは避けてください。

- RNeasyテクノロジーとQIAzolの組み合わせによってDNase処理なしでほとんどのDNAを効果的に除去できるため、DNase処理は通常必要ではありません。しかし非常に微量なDNAにも敏感な、いくつかのRNAアプリケーションでは追加のDNA除去が必要な場合もあります。このような場合には、残留した微量のDNAはカラム上でDNase分解するか(英語 Handbook 49ページのAppendix B参照)RNA精製後にDNase分解(プロトコールはテクニカルサポートにご連絡ください)により除去できます。
- Buffer RWTは保存中に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、バッファ中の沈殿物を温めて再溶解した後、室温(15 ~ 25 )にして使用します。
- QIAzol Lysis ReagentとBuffer RWTはグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版 Handbook 7ページをご覧ください。
- マルチチャンネルピペットを使用することをお奨めします(英語版 Handbook 12 ページ参照)。マルチチャンネルピペット用の容器にバッファおよびRNaseフリー水を注ぎます。新しく開封した容器を使用してください。
- -800から-900 mbarで吸引可能な吸引装置が必要です(英語版 Handbook 14 ~ 16 ページ参照)。各サンプルの条件を一定に保つために、ピペッティング・ステップごとに吸引スイッチを切り、マニフォールドに空気を通します。

- プロトコールの全ての遠心操作は Centrifuge 4K15C (英語版 Handbook 13 ページ参照)で行なってください。
- ステップ6での遠心操作および有機溶媒層から水層を分離する遠心操作(ステップ9)は必ず4で行ってください。miRNeasy 96プロトコールのその他のステップは全て室温(15~25℃)で実施します。実験操作を中断しないでください。

#### 実験開始前の準備事項

- Buffers RWTおよびRPEは濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、ボトルに記載されている必要量のエタノール(96~100%)を加えて、ワーキング溶液を調製します。
- すべてのバッファーが室温(15~25℃)になっているか確認してください。プレート上でのDNase分解をオプションで行なう場合には、Appendix Bの記載(英語版 Handbook 49ページ)に従ってDNase Iインキュベーション・ミックスを調製します。

#### 操作手順

1. QIAvac 96吸引マニホールドの準備: QIAvac baseの内側に廃液トレイを設置する。QIAvac baseの上にtop plateをぴったりとのせる。QIAvac top plateの中にRNeasy 96プレートを置き、RNeasy 96プレートが密着しているか確認する。QIAvac 96を吸引装置に接続する。吸引装置のスイッチをオフにしておく。  
注: 斜めにカットされているプレートの角が常に右側に来るようにRNeasy 96プレートを吸引マニホールドにセットします。
2. ステップ2aあるいは2bに従って細胞を収集する。
  - 2a. 単層培養細胞:  
マルチウェル細胞培養プレートで増殖した単層培養細胞はウェル内で直接溶解できる(ウェル当たり $1 \times 10^7$ 個以上の細胞は使用しない)。ピペットで培養液を完全に除去し、ステップ3に進む。  
注: 上清が完全に除去されていないとQIAzol Lysis Reagentが希釈され、RNA収量の低下に繋がることがあります。
  - 2b. 浮遊細胞:  
最高 $1 \times 10^7$ 個の細胞をコレクション・マイクロチューブ(添付)に移す。 $300 \times g$ で5分間細胞を遠心する。ピペットで上清を完全に除去し、ステップ3に進む。  
注: 上清が完全に除去されていないとQIAzol Lysis Reagentが希釈されます。これはRNA収量の低下に繋がることがあります。

3. QIAzol Lysis Reagent を添加して細胞を破碎する。

ベレット化した細胞は指で軽く叩き細胞ベレットをルーズにする。700  $\mu$ l の QIAzol Lysis Reagent を各プレートウェル/コレクション・マイクロチューブに添加する。ピペットで溶液を3回アップダウンして混和する。

プレートウェル内で溶解した場合には、ライセートをコレクション・マイクロチューブ（添付）に移す。
4. コレクション・マイクロチューブのキャップ（添付）でコレクション・マイクロチューブを閉じる。最高速度で1分間ボルテックスを用いて混和する。

1分間のボルテックスで最高  $3 \times 10^6$  個の細胞を十分にホモジナイズできます。  $3 \times 10^6$  以上の細胞を使用する場合には、細胞のホモジナイゼーションには TissueLyser システム（動物組織用のプロトコールに記載）を使用します。

注：ホモジナイズした細胞ライセートは数カ月間-70 で保存できます。
5. ホモジネート溶液が入ったコレクション・マイクロチューブのラックを実験台上に室温（15 ~ 25 ）で5分間放置する。

このステップは核タンパク質コンプレックスの解離を促進します。
6. 4 、6,000 x g で1分間遠心し、チューブのキャップについている溶液を回収する。
7. 140  $\mu$ l のクロロホルムを添加する。ホモジネートを含むコレクション・マイクロチューブ・ラックを新しいキャップ・ストリップでしっかりと蓋をする。コレクション・マイクロチューブ・ラックを15秒間激しく振る。

完全に混和することは次のステップで液層を分離するために重要です。
8. コレクション・マイクロチューブ・ラックを実験台上に室温（15 ~ 25 ）で2 ~ 3分間放置する。
9. 4 、6,000 x g で15分間遠心操作する。同じ遠心機を次の遠心操作ステップに使用する場合には、遠心後に遠心機を室温（15 ~ 25 ）に戻す。

遠心後にサンプル溶液は3つの層に分かれます：上層の無色でRNAを含む水層；白色の中間層；一番下の赤い有機溶媒層。水層の容量は約350  $\mu$ l です。

注：miRNA の濃縮分画を分離精製する場合には、本ステップを行なった後、Appendix A のステップを行います（英語 Handbook 46 ページ）。
10. 一番上の水層を新しい S-Block に移す。1.5 倍容量の100%エタノール（通常525  $\mu$ l）を添加し、ピペットを用いて溶液をアップダウンし混和する。遠心操作は行なわない。直ちにステップ11に進む。
11. RNeasy 96 プレートのウェルにサンプル（約875  $\mu$ l）をピペットで入れ、吸引装置のスイッチを入れる。サンプル溶液が完全に通過するまで吸引を続ける（1 ~ 5分）。吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 96 マニホールドに空気を通す。

サンプルを入れる前に QIAvac 96 吸引マニホールドが正確にセットされていることを確認します。ろ液は廃液トレイに収集されます。各サンプルの条件を一定に保つために、ピペティング・ステップごとに吸引スイッチを切り、マニホールドに空気を通します。

続くステップでのクロスコンタミを回避するために、ウェルの縁が濡れないように注意してください。

注：粘着シールで使用していないウェルを密封します。miRNeasy 96 Kit に添付されている AirPore Tape Sheet を使用しないでください。粘着テープが QIAGEN が販売している tape pads (cat. no. 19570) を使用してください。

オプションでの DNase 処理：オプションでプレート上の DNase 分解を行なう場合には（“実験を始める前の重要事項”参照）、このステップ後に B1 から B4（英語 Handbook 49 ページ）行います。

12. RNeasy 96 プレートの各ウェルに 800  $\mu$ l の Buffer RW1 を添加する。吸引装置のスイッチを入れ、サンプル溶液が完全に通過するまで吸引を続ける（1～5分）。吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 96 マニホールドに空気を通す。

ステップ 11 で使用した廃液トレイに洗浄画分を収集します。

オプションのプレート上での DNase 処理（30～31 ページ）を行なう場合にはこのステップを行う必要はありません（英語 Handbook 49 ページ）。

13. RNeasy 96 プレートをセットした top plate を QIAvac 96 base から持ち上げ、廃液トレイに入っているろ液を捨て\*、再度 QIAvac 96 吸引マニホールドを組み合わせる。

14. RNeasy 96 プレートの各ウェルに 800  $\mu$ l の Buffer RPE を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。サンプル溶液が完全に通過するまで吸引を続ける（1～5分）。吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 96 マニホールドに空気を通す。

15. RNeasy 96 プレートの各ウェルに再度 800  $\mu$ l の Buffer RPE を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。サンプル溶液が完全に通過するまで吸引を続ける（1～5分）。吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 96 マニホールドに空気を通す。

16. S-Block の上に RNeasy 96 プレートを置く。AirPore Tape Sheet で RNeasy 96 プレートをシールする。S-Block と RNeasy 96 プレートをホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットに設置する。プレートメンブレンを乾燥するために室温、6,000 rpm（約 5,600  $\times$  g）で 10 分間遠心する。

密封したプレートを遠心することによりクロスコンタミを回避します。

残留しているエタノールは、続いて行なう反応を阻害することがあるため、RNeasy メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。10 分間の遠心操作は、残留している微量塩類を確実に除去し、RNA 溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。

\* QIAzol Lysis Reagent と Buffer RW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety Information に関しては英語版 Handbook 3 ページを参照ください。

17. AirPore Tape Sheet を剥がす。新しい溶出用マイクロチューブがセットされたラックの上に RNeasy 96 プレート を置く。
18. RNA 溶出するために、各ウェルに 45 ~ 70  $\mu$ l の RNase フリー水を添加し、新しい AirPore Tape Sheet で RNeasy 96 プレート をシールする。室温で 1 分間インキュベートする。室温、6,000 rpm (約 5,600 x g) で 4 分間遠心する。  
注：RNeasy メンブレンに直接 RNase フリー水をピペットで注入します。RNase フリー水の一部が RNeasy 96 プレートの壁や Oリングに付着していると、溶出が不完全になります。
19. AirPore Tape Sheet を剥がす。再度 45 ~ 70  $\mu$ l の RNase フリー水を用いて溶出ステップ (ステップ 18) を繰り返す。  
注：完全に RNA を回収するために溶出ステップを繰り返すことが必要です。  
保存するためにマイクロチューブを密封するには、添付の溶出マイクロチューブ用キャップを用いてください。RNA は -20 あるいは -70 で保存します。

# プロトコール：遠心法を用いた動物細胞からの small RNA を含むトータルRNA精製

実験を始める前の重要事項：

- miRNeasy 96 Kitを初めて使う際には、“ Important Notes ”( 英語版 Handbook 17 ページ ) をお読みください。
- RNAの収量および純度が顕著に低下し、プレートの目詰まりの原因になるため、RNeasy プレートオーバーロードしないでください。英語版 Handbook 17 ページの “ Determining the correct amount of starting material ” を参照。
- はじめてRNAを取り扱う際にはAppendix C ( 英語版 Handbook 51 ページ ) をお読みください。
- 細胞ペレットは次回使用するまで-70 で保存することも、直ぐに直接調製することもできます。凍結する前に細胞数を測定します。ステップ2でチューブを指で軽く叩いて細胞ペレットをルーズにするために、凍結した細胞ペレットは少し解凍します。

ステップ3でホモジナイズした細胞ライセートは-70 で数ヶ月間保存できます。ホモジナイズした凍結ライセートは完全に融解し、塩類が溶解するまで37 の水浴中でインキュベートしてから調製します。RNAが分解する可能性があるため、長くインキュベートすることは避けてください。

- RNeasyテクノロジーとQIAzolの組み合わせによってDNase処理なしでほとんどのDNAを効果的に除去できるため、DNase処理は通常必要ではありません。しかし非常に微量なDNAにも敏感な、いくつかのRNAアプリケーションでは追加のDNA除去が必要な場合もあります。このような場合には、残留した微量のDNAはカラム上でDNase分解するか( 英語 Handbook 49 ページの Appendix B 参照 ) RNA精製後にDNase分解( プロトコールはテクニカルサポートにご連絡ください ) により除去できます。
- Buffer RWTは保存中に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、バッファ中の沈殿物を温めて再溶解した後、室温( 15 ~ 25 ) にして使用します。
- QIAzol Lysis ReagentとBuffer RWTはグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版 Handbook 7 ページをご覧ください。
- マルチチャンネルピペットを使用することをお勧めします( 英語版 Handbook 12 ページ参照 )。マルチチャンネルピペット用の容器にバッファおよびRNaseフリー水を注ぎます。新しく開封した容器を使用してください。
- プロトコールの全ての遠心操作はCentrifuge 4K15C( 英語版 Handbook 13 ページ参照 ) で行なってください。

- ステップ5での遠心操作および有機溶媒層から水層を分離する遠心操作（ステップ8）は必ず4で行ってください。miRNeasy 96 プロトコールのその他のステップは全て室温（15～25℃）で実施します。実験操作を中断しないでください。

#### 実験開始前の準備

- Buffers RWTおよびRPEは濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、ボトルに記載されている必要量のエタノール（96～100％）を加えて、ワーキング溶液を調製します。
- すべてのバッファーが室温（15～25℃）になっているか確認してください。プレート上でのDNase分解をオプションで行なう場合には、Appendix Bの記載（英語版 Handbook 49ページ）に従ってDNase Iインキュベーション・ミックスを調製します。

#### 操作手順

1. ステップ1aあるいは1bに従って細胞を収集する。

##### 1a. 単層培養細胞：

マルチウェル細胞培養プレートで増殖した単層培養細胞はウェル内で直接溶解できる（ウェル当たり $1 \times 10^7$ 個以上の細胞は使用しない）。ピペットで培養液を完全に除去し、ステップ2に進む。

注：上清が完全に除去されていないとQIAzol Lysis Reagentが希釈されます。これはRNA収量の低下に繋がることがあります。

##### 1b. 浮遊細胞：

最高 $1 \times 10^7$ 個の細胞をコレクション・マイクロチューブ（添付）に移す。 $300 \times g$ で5分間細胞を遠心する。ピペットで上清を完全に除去し、ステップ2に進む。

注：上清が完全に除去されていないとQIAzol Lysis Reagentが希釈されます。これはRNA収量の低下に繋がることがあります。

2. QIAzol Lysis Reagentを添加して細胞を破碎する。

ペレット化した細胞は指で軽く叩き細胞ペレットをルーズにする。 $700 \mu\text{l}$ のQIAzol Lysis Reagentを各プレートウェル/コレクション・マイクロチューブに添加する。ピペットで溶液を3回アップダウンして混和する。プレートウェル内に溶解した場合には、ライセートをコレクション・マイクロチューブ（添付）に移す。



3. コレクション・マイクロチューブのキャップ（添付）でコレクションマイクロチューブを閉じる。最高速度で1分間ボルテックスを用いて混和する。

1分間のボルテックスで最高  $3 \times 10^6$  個の細胞を十分にホモジナイズできます。 $3 \times 10^6$  以上の細胞を使用する場合には、細胞のホモジナイゼーションには TissueLyser システム（動物組織用のプロトコールに記載）を使用します。  
注：ホモジナイズした細胞ライセートは  $-70$  で数カ月間保存できます。
4. ホモジネート溶液が入ったコレクション・マイクロチューブのラックを実験台上に室温（ $15 \sim 25$ ）で5分間放置する。

このステップは核タンパク質コンプレックスの解離を促進します。
5.  $4$ 、 $6,000 \times g$  で1分間遠心し、チューブのキャップについている溶液を回収する。
6.  $140 \mu\text{l}$  のクロロホルムを添加する。ホモジネートを含むコレクション・マイクロチューブ・ラックを新しいキャップ・ストリップでしっかりと蓋をする。コレクション・マイクロチューブ・ラックを15秒間激しく振る。

完全に混和することは次のステップで液層を分離するために重要です。
7. コレクション・マイクロチューブ・ラックを実験台上に室温（ $15 \sim 25$ ）で2分間放置する。
8.  $4$ 、 $6,000 \times g$  で15分間遠心操作する。同じ遠心機を次の遠心操作ステップに使用する場合には、遠心後に遠心機を室温（ $15 \sim 25$ ）に戻す。

遠心後にサンプル溶液は3つの層に分かれます：上層の無色でRNAを含む水層；白色の中間層；一番下の赤い有機溶媒層。水層の容量は約  $350 \mu\text{l}$  です。  
注：miRNAの濃縮分画を分離精製する場合には、本ステップを行なった後、Appendix Aのステップを行います（英語 Handbook 46ページ）。
9. 一番上の水層を新しいS-Blockに移す。1.5倍容量の100%エタノール（通常  $525 \mu\text{l}$ ）を添加し、ピペットを用いて溶液をアップダウンし混和する。遠心操作は行なわない。直ちにステップ10に進む。
10. S-Blockの上にRNeasy 96 プレートを置く。
11. RNeasy 96 プレートのウェルにステップ9からのサンプル（約  $875 \mu\text{l}$ ）をピペットでアプライする。

続くステップでのクロスコンタミを回避するために、ウェルの縁が濡れないように注意してください。
12. AirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートをシールする。S-BlockとRNeasy 96 プレートをホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットに設置する。室温、 $6,000 \text{ rpm}$ （約  $5,600 \times g$ ）で4分間遠心する。

密封したプレートを遠心することによりクロスコンタミを回避します。  
オプションでのDNase処理：オプションでプレート上のDNase分解を行なう場合には（“実験を始める前の重要事項”参照）、このステップ後にB1からB4（英語 Handbook 49ページ）を行います。

13. S-Block内のろ液を捨て\* AirPore Tape Sheetを剥がす。RNeasy 96 プレートの各ウェルに800  $\mu$ lのBuffer RWTを添加する。新しいAirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートをシールする。室温、6,000 rpm (約5,600 x g)で4分間遠心する。  
オプションのプレート上でのDNase 処理 (30 ~ 31 ページ)を行なう場合にはこのステップを行う必要はありません (英語 Handbook 49 ページ)。
14. S-Block内のろ液を捨て† AirPore Tape Sheetを剥がす。RNeasy 96 プレートの各ウェルに800  $\mu$ lのBuffer RPEを添加する。新しいAirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートをシールする。室温、6,000 rpm (約5,600 x g)で4分間遠心する。
15. S-Block内のろ液を捨て AirPore Tape Sheetを剥がす。RNeasy 96 プレートの各ウェルに800  $\mu$ lのBuffer RPEを再度添加する。新しいAirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートをシールする。室温、6,000 rpm (約5,600 x g)で10分間遠心する。  
残留しているエタノールは、続いて行なう反応を阻害することがあるため、RNeasy メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。10分間の遠心操作は、残留している微量塩類を確実に除去し、RNA 溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。
16. AirPore Tape Sheetを剥がす。新しい溶出用マイクロチューブがセットされたラックの上にRNeasy 96 プレートを置く。
17. RNA 溶出するために、各ウェルに45 ~ 70  $\mu$ lのRNase フリー水を添加し、新しいAirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートをシールする。室温で1分間インキュベートする。室温、6,000 rpm (約5,600 x g)で4分間遠心する。  
注：RNeasy メンブレンに直接RNase フリー水をピペットで注入します。RNase フリー水の一部がRNeasy 96 プレートの壁やリングに付着していると、溶出が不完全になります。
18. AirPore Tape Sheetを剥がす。再度45 ~ 70  $\mu$ lのRNase フリー水を用いて溶出ステップ (ステップ17)を繰り返す。  
注：完全にRNAを回収するために溶出ステップを繰り返すことが必要です。  
保存するためにマイクロチューブを密封するには、添付の溶出マイクロチューブ用キャップを用いてください。RNAは-20 あるいは-70 で保存します。

\* QIAzol Lysis Reagentを含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety Informationに関しては英語版 Handbook 3 ページを参照ください。

† Buffer RWTを含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety Informationに関しては英語版 Handbook 3 ページを参照ください。

# プロトコール：吸引法/遠心法を用いた動物組織からのsmall RNAを含むトータルRNA精製

実験を始める前の重要事項：

- miRNeasy 96 Kitを初めて使う際には、“ Important Notes ”( 英語版 Handbook 17 ページ )をお読みください。
- RNAの収量および純度が顕著に低下し、プレートの目詰まりの原因になるため、RNeasyプレートをオーバーロードしないでください。英語版 Handbook 17 ページの“ Determining the correct amount of starting material ”を参照。
- 初めてRNAを調製する場合にはAppendix C ( 英語版 Handbook 51 ページ )をお読みください。
- 瞬間凍結あるいはRNAlateで安定化した組織が使用できます。長期保存用に組織を凍結するには、液体窒素中で組織を瞬間凍結し、即座に $-70^{\circ}\text{C}$ で保存します。このように凍結した組織は $-70^{\circ}\text{C}$ で数ヶ月保存できます。QIAzol Lysis Reagent中での組織破碎前の重量測定あるいは取り扱いの際に組織を解冻させないでください。ホモジナイズした組織ライセートは $-70^{\circ}\text{C}$ で数カ月間保存できます。凍結ライセートを調製する際には、サンプルが完全に解凍してQIAzol Lysis Reagent中の塩が溶解するまで室温あるいは $37^{\circ}\text{C}$ の水浴でサンプルを解冻します。RNA化学分解の原因になるため、 $37^{\circ}\text{C}$ で長時間サンプルを処理することは避けてください。ステップ9に進みます。
- RNeasyテクノロジーとQIAzolの組み合わせによってDNase処理なしでほとんどのDNAを効果的に除去できるため、DNase処理は通常必要ではありません。しかし非常に微量なDNAにも敏感な、いくつかのRNAアプリケーションでは追加のDNA除去が必要な場合もあります。このような場合には、残留した微量のDNAはカラム上でDNase分解するか( 英語 Handbook 49ページのAppendix B参照 ) RNA精製後にDNase分解( プロトコールはテクニカルサポートにご連絡ください)により除去できます。
- Buffer RWTは保存中に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、バッファー中の沈殿物を温めて再溶解した後、室温(  $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$  )にして使用します。
- QIAzol Lysis ReagentとBuffer RWTはグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版 Handbook 7ページをご覧ください。
- マルチチャンネルピペットを使用することをお奨めします( 英語版 Handbook 12 ページ参照 )。マルチチャンネルピペット用の容器にバッファーおよびRNaseフリー水を注ぎます。新しく開封した容器を使用してください。
- $-800 \sim -900$  mbarで吸引可能な吸引装置が必要です( 英語版 Handbook 14 ~ 16 ページ参照 )。各サンプルの条件を一定に保つために、ピPETTING・ステップごとに吸引スイッチをきり、マニフォールドに空気を通します。

- プロトコルの全ての遠心操作はCentrifuge 4K15C（英語版 Handbook 13ページ参照）で行なってください。
- ステップ9での遠心操作および有機溶媒層から水層を分離する遠心操作（ステップ12）は必ず4℃で行ってください。miRNeasy 96プロトコルのその他のステップは全て室温（15～25℃）で実施します。実験操作を中断しないでください。

#### 実験開始前の準備

- Buffers RWTおよびRPEは濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、ボトルに記載されている様に適切な量のエタノール（96～100%）を加えて、ワーキング溶液を調製します。
- すべてのバッファーが室温（15～25℃）になっているか確認してください。プレート上でのDNase分解をオプションで行なう場合には、Appendix Bの記載（英語版 Handbook 49ページ）に従ってDNase Iインキュベーション・ミックスを調製します。

#### 操作手順

1. QIAvac 96吸引マニホールドの準備：QIAvac baseの内側に廃液トレイを設置する。QIAvac baseの上にtop plateをぴったりとのせる。QIAvac top plateの中にRNeasy 96プレートを置き、RNeasy 96プレートが密着しているか確認する。QIAvac 96マニホールドを吸引装置に接続する。吸引装置のスイッチをオフしておく。

注：斜めにカットされているプレートの角が常に右側に来るようにRNeasy 96プレートを吸引マニホールドにセットします。

2. コレクション・マイクロチューブにステンレススチールのビーズ（5 mm）を入れ（チューブ当たりビーズ1個）、コレクション・マイクロチューブ・ラックをドライアイスの入ったボックスに移す。

注：最高192サンプルの破碎とホモジナイゼーションにはTissueLyserを使用することを推奨します。あるいはローター・ステーター方式のホモジナイザーを組織の破碎とホモジナイゼーションに使用できます。このプロトコルではTissueLyserを用いた瞬間凍結組織からのRNA精製法を記載しています。RNAlaterで安定化した組織ではドライアイス上でコレクション・マイクロチューブを冷却する必要はありません。

3. 動物から組織サンプルを切除、あるいは保存していた組織サンプルを使用する。

安定化されていない組織はQIAzol Lysis Reagentに入れる前に解凍させないでください。

4. 使用する組織量を決定する。瞬間凍結組織は 50 mg、肝臓、胸腺、脾臓、RNAlater で安定した組織は 25 mg、脂肪組織は 100 mg 以上使用しない。組織を前もって冷却したコレクション・マイクロチューブに即座に入れる。このようにして、コレクション・マイクロチューブに必要な組織を全て入れる。

英語版 Handbook 17 ページのガイドラインを参照してスタートサンプルの量を決めます。

サンプル採取の後、瞬間凍結、あるいはステップ 6 と 7 での破碎とホモジナイゼーションを行なうまで、安定化されていない組織中の RNA は保護されていません。凍結動物組織は取り扱い中に解凍しないよう注意します。関連した操作はできるだけ迅速に行います。

5. ドライアイスからコレクション・マイクロチューブ・ラックを取り出し、各コレクション・マイクロチューブに 700  $\mu$ l の QIAzol Lysis Reagent を即座にピペットで添加する。
6. 添付されているキャップ・ストリップでコレクション・マイクロチューブ・ラックに蓋をして、TissueLyser を用いて 25 Hz で 5 分間ホモジナイズする。
7. 均一にホモジナイズするために TissueLyser ラックを回転し、さらに 25 Hz で 5 分間ホモジナイズする。

いくつかの破碎されにくい組織（例えばブタの皮膚）は 5 分間で 2 回のホモジナイゼーションでは完全にホモジナイズされないことがあります。しかし、破碎されなかった組織片は液層分離後に除去されるため、プロトコルに影響を及ぼしません。

注：ホモジナイズした細胞ライセートは -70 °C で数カ月間保存できます。

8. ホモジネート溶液が入ったコレクション・マイクロチューブのラックを実験台上に室温（15 ~ 25 °C）で 5 分間放置する。  
このステップは核タンパク質コンプレックスの解離を促進します。
9. 4 ~ 6,000 x g で 1 分間遠心し、チューブのキャップについている溶液を回収する。
10. 140  $\mu$ l のクロロホルムを添加する。ホモジネートを含むコレクション・マイクロチューブ・ラックを新しいキャップ・ストリップでしっかりと蓋をする。コレクション・マイクロチューブ・ラックを 15 秒間激しく振る。  
完全に混和することは次のステップで液層を分離するために重要です。
11. コレクション・マイクロチューブ・ラックを実験台上に室温（15 ~ 25 °C）で 2 ~ 3 分間放置する。

12. 4、6,000 x gで15分間遠心操作する。同じ遠心機を次の遠心操作ステップに使用する場合には、遠心後に遠心機を室温（15～25℃）に戻す。

遠心後にサンプル溶液は3つの層に分かれます：上層の無色でRNAを含む水層；白色の中間層；一番下の赤い有機溶媒層。脂肪含有量が特に高い組織では、赤い有機溶媒層の下にさらに透明な層が見られることがあります。水層の容量は約350 µlです。

注：miRNAの濃縮分画を分離精製する場合には、本ステップを行なった後、Appendix Aのステップを行います（英語Handbook 46ページ）。

13. 一番上の水層を新しいS-Blockに移す。1.5倍容量の100%エタノール（通常525 µl）を添加し、ピペットを用いて溶液をアップダウンし混和する。遠心操作は行なわない。直ちにステップ14に進む。
14. RNeasy 96プレートのウェルにサンプル（約875 µl）をピペットで入れ、吸引装置のスイッチを入れる。サンプル溶液が完全に通過するまで吸引を続ける（1～5分）。吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 96 マニホールドに空気を通す。

サンプルを入れる前にQIAvac 96吸引マニホールドが正確にセットされていることを確認します。ろ液は廃液トレイに収集されます。各サンプルの条件を一定に保つために、ピPETTING・ステップごとに吸引スイッチをきり、マニホールドに空気を通します。

続くステップでのクロスコンタミを回避するために、ウェルの縁が濡れないように注意してください。

注：粘着テープで使用していないウェルを密封します。miRNeasy 96 Kitに添付されているAirPore Tape Sheetを使用しないでください。粘着テープがQIAGENが販売しているtape pads（cat. no. 19570）を使用してください。

オプションでのDNase処理：オプションでプレート上のDNase分解を行なう場合には（“実験を始める前の重要事項”参照）、このステップ後にB1からB4（英語Handbook 49ページ）を行います。

15. RNeasy 96プレートの各ウェルに800 µlのBuffer RWTを添加する。吸引装置のスイッチを入れ、サンプル溶液が完全に通過するまで吸引を続ける（1～5分）。吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 96 マニホールドに空気を通す。

ステップ14で使用した廃液トレイに洗浄分画を収集する。

オプションのプレート上でのDNase処理（英語Handbook 49ページ）を行なう場合にはこのステップを行う必要はありません。

16. RNeasy 96プレートをセットしたtop plateをQIAvac 96 baseから持ち上げ、廃液トレイに入っているろ液を捨て\*、再度QIAvac 96吸引マニホールドを組み合わせる。

\* QIAzol Lysis ReagentとBuffer RWTを含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety Informationに関しては英語版Handbook 3ページを参照ください。

17. RNeasy 96 プレートの各ウェルに 800  $\mu$ l の Buffer RPE を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。サンプル溶液が完全に通過するまで吸引を続ける（1 ~ 5 分）。吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 96 マニホールドに空気を通す。
18. RNeasy 96 プレートの各ウェルに再度 800  $\mu$ l の Buffer RPE を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。サンプル溶液が完全に通過するまで吸引を続ける（1 ~ 5 分）。吸引装置のスイッチを切り、QIAvac 96 マニホールドに空気を通す。
19. S-Block の上に RNeasy 96 プレートを置く。AirPore Tape Sheet で RNeasy 96 プレートをシールする。S-Block と RNeasy 96 プレートをホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットに設置する。プレートメンブレンを乾燥するために室温、6,000 rpm（約 5,600 x g）で 10 分間遠心する。

密封したプレートを遠心することによりクロスコンタミを回避します。

残留しているエタノールは、続いて行なう反応を阻害することがあるため、RNeasy メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。10 分間の遠心操作は、残留している微量塩類を確実に除去し、RNA 溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。
20. AirPore Tape Sheet を剥がす。新しい溶出用マイクロチューブがセットされたラックの上に RNeasy 96 プレートを置く。
21. RNA 溶出するために、各ウェルに 45 ~ 70  $\mu$ l の RNase フリー水を添加し、新しい AirPore Tape Sheet で RNeasy 96 プレートをシールする。室温で 1 分間インキュベートする。室温、6,000 rpm（約 5,600 x g）で 4 分間遠心する。

注：RNeasy メンブレンに直接 RNase フリー水をピペットで注入します。RNase フリー水の一部が RNeasy 96 プレートの壁や Oリングに付着していると、溶出が不完全になります。
22. AirPore Tape Sheet を剥がす。再度 45 ~ 70  $\mu$ l の RNase フリー水を用いて溶出ステップ（ステップ 21）を繰り返す。

注：完全に RNA を回収するために溶出ステップを繰り返すことが必要です。

保存するためにマイクロチューブを密封するには、添付の溶出マイクロチューブ用キャップを用いてください。RNA は -20 あるいは -70 で保存します。

# プロトコール：遠心法を用いた動物組織からのsmall RNAを含むトータルRNA精製

実験を始める前の重要事項：

- miRNeasy 96 Kitを初めて使う際には、“Important Notes”(英語版 Handbook 17 ページ)をお読みください。
- RNAの収量および純度が顕著に低下し、プレートの目詰まりの原因になるため、RNeasyプレートをオーバーロードしないでください。英語版 Handbook 17 ページの“Determining the correct amount of starting material”を参照してください。
- 初めてRNAを調製する場合にはAppendix C(英語版 Handbook 51 ページ)をお読みください。
- 瞬間凍結あるいはRNAlaterで安定化した組織が使用できます。長期保存用に組織を凍結するには、液体窒素中で組織を瞬間凍結し、即座に-70 で保存します。このように凍結した組織は-70 で数ヶ月保存できます。QIAzol Lysis Reagent中での組織破碎前の重量測定あるいは取り扱いの際に組織を解冻させないでください。ホモジナイズした組織ライセートは-70 で数カ月間保存できます。凍結ライセートを用いて調製する際には、サンプルが完全に解冻してQIAzol Lysis Reagent中の塩が溶解するまで室温あるいは37 の水浴でサンプルを解冻します。RNA化学分解の原因になるため、37 で長時間サンプルを処理することは避けてください。ステップ8に進みます。
- RNeasyテクノロジーとQIAzolの組み合わせによってDNase処理なしでほとんどのDNAを効果的に除去できるため、DNase処理は通常必要ではありません。しかし非常に微量なDNAにも敏感な、いくつかのRNAアプリケーションでは追加のDNA除去が必要な場合もあります。このような場合には、残留した微量のDNAはカラム上でDNase分解するか(英語 Handbook 49ページのAppendix B参照) RNA精製後にDNase分解(プロトコールはテクニカルサポートにご連絡ください)により除去できます。
- Buffer RWTは保存中に沈殿物を形成することがあります。必要な場合には、温めて再び溶解した後、室温(15 ~ 25 )にして使用します。
- QIAzol Lysis ReagentとBuffer RWTはグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版 Handbook 7ページをご覧ください。
- マルチチャンネルピペットを使用することをお奨めします(英語版 Handbook 12 ページ参照)。マルチチャンネルピペット用の容器にバッファーおよびRNaseフリー水を注ぎます。新しく開封した容器を使用してください。
- プロトコールの全ての遠心操作はCentrifuge 4K15C(英語版 Handbook 13 ページ参照)で行なってください。



- ステップ8での遠心操作および有機溶媒層から水層を分離する遠心操作（ステップ11）は必ず4で行ってください。miRNeasy 96 プロトコルのその他のステップは全て室温（15～25℃）で実施します。実験操作を中断しないでください。

#### 実験開始前の準備事項

- Buffers RWTおよびRPEは濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、ボトルに記載されている様に適切な量のエタノール（96～100％）を加えて、ワーキング溶液を調製します。
- すべてのバッファーが室温（15～25℃）になっているか確認してください。プレート上でのDNase分解をオプションで行なう場合には、Appendix Bの記載（英語版 Handbook 49ページ）に従ってDNase Iインキュベーション・ミックスを調製します。

#### 操作手順

1. コレクション・マイクロチューブにステンレススチールのビーズ（5 mm）を入れ（チューブ当たりビーズ1個）、コレクション・マイクロチューブ・ラックをドライアイスの入ったボックスに移す。

注：最高192サンプルの破砕とホモジナイゼーションにはTissueLyserを使用することを推奨します。あるいはローター・ステーター方式のホモジナイザーを組織の破砕とホモジナイゼーションに使用できます。このプロトコルではTissueLyserを用いた瞬間凍結組織からのRNA精製法を記載しています。RNAlaterで安定化した組織ではドライアイス上でコレクション・マイクロチューブを冷却する必要はありません。

2. 動物から組織サンプルを切除、あるいは保存していた組織サンプルを使用する。  
安定化されていない組織はQIAzol Lysis Reagentに入れる前に解凍させないでください。

3. 使用する組織量を決定する。瞬間凍結組織は50 mg、肝臓、胸腺、脾臓、RNAlaterで安定した組織は25 mg、脂肪組織は100 mg以上使用しない。組織を前もって冷却したコレクション・マイクロチューブに即座に入れる。このようにして、コレクション・マイクロチューブに必要な組織を全て入れる。  
英語版 Handbook 17ページのガイドラインを参照してスタートサンプルの量を決めます。

サンプル採取の後、瞬間凍結、あるいはステップ5と6での破砕とホモジナイゼーションを行なうまで、安定化されていない組織中のRNAは保護されていません。凍結動物組織は取り扱い中に解凍しないよう注意します。関連した操作はできるだけ迅速に行います。

4. ドライアイスからコレクション・マイクロチューブ・ラックを取り出し、各コレクション・マイクロチューブに700 µlのQIAzol Lysis Reagentを即座にピペットで添加する。
5. 添付されているキャップ・ストリップでコレクション・マイクロチューブ・ラックに蓋をして、Tissuelyserを用いて25 Hzで5分間ホモジナイズする。
6. Tissuelyserラックを回転し、さらに25 Hzで5分間ホモジナイズする。

いくつかの破碎されにくい組織（例えばブタの皮膚）は5分間で2回のホモジナイゼーションでは完全にホモジナイズされないことがあります。しかし、破碎されなかった組織片は液層分離後に除去されるため、プロトコールに影響を及ぼしません。

注：ホモジナイズした細胞ライセートは-70 で数カ月間保存できます。

7. ホモジネート溶液が入ったコレクション・マイクロチューブのラックを実験台上に室温（15 ~ 25 ）で5分間放置する。

このステップは核タンパク質コンプレックスの解離を促進します。

8. 4 、6,000 x gで1分間遠心し、チューブのキャップについている溶液をチューブに回収する。
9. 140 µlのクロロホルムを添加する。ホモジネートを含むコレクション・マイクロチューブ・ラックを新しいキャップ・ストリップでしっかりと蓋をし、15秒間激しく振盪する。

完全に混和することは次のステップで液層を分離するために重要です。

10. コレクション・マイクロチューブ・ラックを実験台上に室温（15 ~ 25 ）で2 ~ 3分間放置する。
11. 4 、6,000 x gで15分間遠心操作する。同じ遠心機を次の遠心操作ステップに使用する場合には、遠心後に遠心機を室温（15 ~ 25 ）に戻す。

遠心後にサンプル溶液は3つの層に分かれます：上層の無色でRNAを含む水層；白色の中間層；一番下の赤い有機溶媒層。脂肪含有量が特に高い組織では、赤い有機溶媒層の下にさらに透明な層が見られることがあります。水層の容量は約350 µlです。

注：miRNAの濃縮分画を分離精製する場合には、本ステップを行なった後、Appendix Aのステップを行います（英語Handbook 46ページ）。

12. 一番上の水層を新しいS-Blockに移す。1.5倍容量の100%エタノール（通常525 µl）を添加し、ピペットを用いて溶液をアップダウンし混和する。遠心操作は行なわない。直ちにステップ13に進む。
13. S-Blockの上にRNeasy 96 プレートを置く。
14. RNeasy 96 プレートのウェルにステップ12からのサンプル（約875 µl）をピペットでアプライする。

続くステップでのクロスコンタミを回避するために、ウェルの縁が濡れないように注意してください。

15. AirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートシーリングをシールする。S-BlockとRNeasy 96 プレートホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットに設置する。室温、6,000 rpm (約5,600 x g)で4分間遠心する。

密封したプレートを遠心することによりクロスコンタミを回避します。

オプションでのDNase処理：オプションでプレート上のDNase分解を行なう場合には、このステップ後にB1からB4（英語 Handbook 49ページ）を行います。

16. S-Block内のろ液を捨て\* AirPore Tape Sheetを剥がす。RNeasy 96 プレートの各ウェルに800 µlのBuffer RWTを添加する。新しいAirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートシーリングをシールする。室温、6,000 rpm (約5,600 x g)で4分間遠心する。

オプションのプレート上でのDNase処理（英語 Handbook 49ページ）を行なう場合にはこのステップを行う必要はありません。

17. S-Block内のろ液を捨て\* AirPore Tape Sheetを剥がす。RNeasy 96 プレートの各ウェルに800 µlのBuffer RPEを添加する。新しいAirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートシーリングをシールする。室温、6,000 rpm (約5,600 x g)で4分間遠心する。

18. S-Block内のろ液を捨てAirPore Tape Sheetを剥がす。RNeasy 96 プレートの各ウェルに800 µlのBuffer RPEを再度添加する。新しいAirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートシーリングをシールする。室温、6,000 rpm (約5,600 x g)で10分間遠心する。

残留しているエタノールは、続いて行なう反応を阻害することがあるため、RNeasyメンブレンを乾燥させることは非常に重要です。10分間の遠心操作は、残留している微量塩類を確実に除去し、RNA溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。

19. AirPore Tape Sheetを剥がす。新しい溶出用マイクロチューブがセットされたラックの上にRNeasy 96 プレートを置く。

20. RNAを溶出するために、各ウェルに45 ~ 70 µlのRNaseフリー水を添加し、新しいAirPore Tape SheetでRNeasy 96 プレートシーリングをシールする。室温で1分間インキュベートする。室温、6,000 rpm (約5,600 x g)で4分間遠心する。

注：RNeasyメンブレンに直接RNaseフリー水をピペットで注入します。RNaseフリー水の一部がRNeasy 96 プレートの壁やリングに付着していると、溶出が不完全になります。

21. AirPore Tape Sheetを剥がす。再度45 ~ 70 µlのRNaseフリー水を用いて溶出ステップ（ステップ20）を繰り返す。

注：完全にRNAを回収するために溶出ステップを繰り返すことが必要です。

保存するためにマイクロチューブを密封するには、添付の溶出マイクロチューブ用キャップを用いてください。RNAは-20 °Cあるいは-70 °Cで保存します。

\* QIAzol Lysis ReagentとBuffer RWTを含んだる液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety Informationに関しては英語版 Handbook 3ページを参照ください。

# トラブルシューティングガイド

## コメント

### 液層が完璧に分離しない

- |    |                              |   |
|----|------------------------------|---|
| a) | クロロホルムを添加しなかったかクロロホルムが不純物を含有 | イソアミールアルコールや他の不純物を含まないクロロホルムを添加したことを確認する。   |
| b) | 遠心する前にホモジネートの混和が不十分          | クロロホルム添加後にホモジネートは激しく振盪しなければならない。液層が明確に分離していない場合には、チューブを少なくとも15秒間激しく振盪し、インキュベーションと遠心操作を繰り返す。 |
| c) | RNA精製に使用したサンプルが有機溶媒を含む       | スタートサンプルが有機溶媒（例えばエタノール、DMSO）、強力なバッファー、あるいはアルカリ試薬を含んでいないことを確認する。これらは液層分離を妨害する。               |

### プレートのウェルが目詰まり

- |    |                   |   |
|----|-------------------|---|
| a) | スタート・サンプル量が多すぎる   | 次の調製にはスタートサンプル量を減らす。正確なサンプル量で実験を始めることが重要である（英語版 Handbook の17ページ参照）。   |
| b) | 破碎、ホモジナイゼーションが不十分 | 破碎とホモジナイゼーションに関する詳細は“Disruption and homogenization of starting materials”（英語版 Handbook 20～22ページ）を参照。<br>必要に応じて、遠心速度および遠心時間を増加する。次の調製にはスタートサンプル量を減らす（英語版 Handbook 17ページ）あるいはホモジナイゼーションの時間を増やす。 |
| c) | 遠心操作時の温度が低すぎる     | サンプル調製のための遠心ステップと液層の分離ステップ以外、全ての遠心操作は室温（15～25℃）で行う。20℃に設定しても20℃以下に冷却される遠心機もある。これがRNeasy 96プレートの目詰まりを起こす沈殿物を形成する原因になりえる。この場合には、遠心機の温度を25℃に設定する。エタノールを含むライセートを37℃で温めてから、RNeasy 96プレートにアプライする。   |

### 溶出したRNAが少ないあるいは皆無

- |    |                 |   |
|----|-----------------|---|
| a) | スタート・サンプル量が多すぎる | サンプルのオーバーロードは顕著に収量を低下する。スタート・サンプル量を減らす（英語版 Handbook の17ページ参照）。プロトコール・ステップに適したエタノール濃度を必ず用いる。 |
|----|-----------------|---|

## コメント

- |                      |   |
|----------------------|---|
| b) 破砕、ホモジナイゼーションが不十分 | 破砕とホモジナイゼーションに関する詳細は“Disruption and homogenization of starting materials”(英語版 Handbook 20 ~ 22 ページ)を参照。 |
| c) バッファーの温度が低すぎる     | 全てのバッファーは調製中は室温(15 ~ 25 )でなければならない。   |
| d) RNA がメンブレンに残留している | RNA 溶出を再度行なうが、まず遠心操作前に RNase フリー水を RNeasy 96 プレートに入れ、実験台上で 10 分間インキュベートする。                              |

miRNA 収量が低い、あるいは続くアプリケーションで良い結果が得られない

- |                 |   |
|-----------------|---|
| a) エタノール濃度が不正確  | プロトコール・ステップに適したエタノール濃度を必ず用いる。   |
| b) 長い RNA による妨害 | ある種のアッセイでは mRNA や rRNA の存在により高いバックグラウンドが発生することがある。この場合、miRNA の濃縮画分を分離するために Appendix A (英語版 Handbook 46 ページ) のプロトコールに従う。 |

$A_{260}/A_{280}$  値が低い

- |   |   |
|---|---|
| a) ホモジナイゼーションに使用した QIAzol Lysis Reagent 量が不十分 | スタートサンプル量を減らす、QIAzol Lysis Reagent 量とホモジナイゼーション時間を増加する。   |
| b) ホモジナイゼーション後にサンプルを 5 分間インキュベートしなかった         | プロトコールに記載してあるようにホモジナイゼーション後にサンプルを室温(15 ~ 25 )に放置する。このステップは核タンパク質コンプレックスの解離を促進する。                    |
| c) $A_{260}/A_{280}$ の測定用に RNA を水で希釈          | 純度を測定する前のサンプルの希釈には RNase フリー水ではなく、10 mM Tris-Cl, * pH 7.5 を使用する(英語版 Handbook 53 ページ、Appendix D 参照)。 |

\* 試薬類を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。詳細は製品メーカーの相当する MSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

## コメント

---

### RNAが分解

- a) スタート・サンプルの不適切な取り扱い 組織を最適な方法で取り扱ったか、また、特に最初の組織溶解やホモジナイゼーションステップに関する最初のステップで操作を中断することなく行なったかの確認をする。ある種の組織（例えば膵臓や小腸）は多量のRNaseを含む。動物からこれらの組織はできるだけ迅速に切除するように注意し、切除後組織を即座に液体窒素中で凍結するか、RNAlater RNA Stabilization Reagent\* に入れる。
- b) RNaseの混入 全てのバッファはテストされ、RNaseフリーであることが保証されているが、使用中にRNaseは混入する可能性がある。操作中および操作後の取り扱いの際にRNaseが混入しないように注意する“Appendix C: General Remarks on Handling RNA”（英語版 Handbook 51ページ）を参照。

### ダウンストリーム実験でDNAが混入

- a) 液層分離を高温で行なった 最適な液層分離と水層からゲノムDNAを除去するためには液層分離ステップを4で行なわなければならない。遠心操作中に遠心機が絶対に10にならないようにする。
- b) 水層に中間層が混入 水層への中間層の混入はRNA溶出液中のDNA含有量の増加に繋がる。必ず中間層が混入しないように水層を移す。
- c) DNase処理していない プロトコルで指示されているステップで、RNase-Free DNase Set（英語版 Handbook 49ページのAppendix B）を用いてオプションのカラム上DNase分解を行う。
- あるいはmiRNeasy操作を行なった後、RNAを含む溶出液をDNaseで分解する。加熱処理でDNaseを不活性化した後、RNAは後処理なしに直接、あるいはRNeasy RNAクリーンアップ・プロトコル（RNeasy 96 Handbook参照）を用いて再精製し、ダウンストリーム・アプリケーションに使用できる。

\* RNAlater RNA Stabilization Reagentに関する詳細は、RNAlater Handbook（日本語版プロトコルとトラブルシューティングあり）をご覧ください。

## コメント

---

### RNA濃度が低すぎる

溶出量が多すぎた

より少量のRNaseフリー水で溶出する。より少量で溶出すると核酸濃度は増加するが、トータル収量は低下することがある。

### RNAを用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない

- a) 溶出の際に塩類がキャリアオーバー Buffer RPE は必ず 15 ~ 25 で使用する。
- b) エタノールのキャリアオーバー 遠心法のプロトコールのみ：2回目のBuffer RPEでの洗浄中ステップで、プレートウェルのメンブレンを乾燥するために、室温（15 ~ 25 ）、6,000 rpm（約5,600 x g）で10分間遠心したことを確認する
- c) 吸引法/遠心法プロトコール：吸引力が弱すぎる 効率的なRNA結合および洗浄を実現するためには-800 ~ -900 mbarで吸引可能な吸引装置が必要である。

### ウェル間の再現性が低い

- a) 溶出量が多すぎた ウェル間の再現性を改善するには2 x 50 µlあるいは2 x 75 µlの溶出量を使用する。
- b) 吸引力が弱すぎる 効率的なRNA結合および洗浄を実現するためには-800 ~ -900 mbarで吸引可能な吸引装置が必要である。
- c) ホモジナイゼーションが不完全 ある種の組織はホモジナイズが困難なために、サンプル間でバラツキが生じる。
- d) サンプル間のバラツキ 組織サンプルからのRNA収量は、ほとんどの組織が均一でなく、ドナー間のバラツキもあるため、培養細胞からのRNA収量よりも変動が大きくなる。

## Appendix A : Larger RNA (>200 nt) と miRNA 濃縮画分の分離精製

本プロトコルを用いて、miRNA や他の small RNA の濃縮画分を分離精製できます。mRNA や rRNA などの larger RNA の除去により、ダウンストリーム・アプリケーションのバックグラウンドを低下させることが可能です。

このプロトコルには別途に RNeasy 96 プレートが必要です。miRNeasy 96 Kit に添付の RNeasy 96 プレートを使用すると、1 個のキットで調製可能なサンプル数が 4 x 96 から 2 x 96 に減少します。RNeasy 96 Kit を購入されほうが経済的ですので、お勧めします ( 英語版 Handbook 56 ページの ordering information 参照 )。

### miRNA の定量

本プロトコルを用いて得られる miRNA 濃縮画分には、200 塩基未満の様々な RNA ( 例 ; tRNA ) が濃縮されています。このために、miRNA 収量を OD 測定や蛍光法により定量することができません。目的の small RNA に特異的なりアルタイム定量 RT-PCR で定量することをお勧めします。miRNA の定量には、使用するサンプル中に十分に存在することが知られている miRNA を標的としたアッセイを用います。

### 操作手順

液層分離までのプロトコル・ステップ ( 前述プロトコルでステップ 9 あるいはステップ 8 まで ) をすべて行います。プロトコルの次のステップに続ける代わりに、下記のステップ A1 ~ A15 を行って miRNA 濃縮画分のみを分離するか、ステップ A1 ~ A22 を行って small RNA 画分と 200 nt 以上のトータル RNA 画分を分離します。

注：吸引と遠心を組み合わせた方法を利用する際には、ステップ A8 ~ A12 および A17 ~ A19 で遠心操作を行う代わりに吸引することが可能です。この場合、溶出前にプレートを 6,000 rpm で 10 分間遠心することにより乾燥し、微量のエタノールのキャリーオーバーを防止します。

- A1. 一番上の水層を新しい S-Block に移す。等量の 70 % エタノール ( 通常 350  $\mu$ l ) を添加し、ピペットを用いて溶液をアップダウンで混和する。遠心操作は行わない。その後直ちにステップ A2 に進む。
- A2. 新しい S-Block 上に RNeasy 96 プレートをセットする。
- A3. 形成した沈澱物も含んだサンプル ( 約 700  $\mu$ l ) を RNeasy 96 プレートのウェルにピペットを用いて入れる。
- A4. 各 RNeasy 96 plate を AirPore Tape Shee でシールする。S-Block と RNeasy 96 プレートをホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットにセットする。室温 ( 15 ~ 25 )、6,000 rpm ( 約 5,600 x g ) で 4 分間遠心操作する。  
る液の入った S-Block を保存し、後で miRNA 濃縮画分の精製に使用します。



A5. miRNA濃縮画分のみを精製する際には、RNeasy 96 プレートを持ってステップ A6 ~ A15のみを行う。

miRNA濃縮画分およびlarger RNA (>200 nt)を両方とも精製する際には、RNeasy 96 プレートを保管してステップA16で使用する(プレートは4 あるいは室温[15 ~ 25 °C]で保存可能であるが長期間は保存しない)。miRNA精製はステップA6 ~ A15、large RNA精製はステップA16 ~ A22を行う。

#### miRNA濃縮画分の精製

A6. ステップA4からのろ液を含むS-Blockに、0.65倍容量の100%エタノール(通常450 µl)を添加し、ピペットを用いて溶液をアップダウンで混和する。遠心操作は行わない。すぐにステップA7に進む。

A7. S-Block上に新しいRNeasy 96 プレートをセットする。

A8. 各サンプル900 µlを新しいRNeasy 96 プレートのウェルにピペットを用いて加える。各RNeasy 96 plateをAirPore Tape Sheetでシールする。S-BlockとRNeasy 96 プレートをホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットにセットする。室温(15 ~ 25 °C)、6,000 rpm(約5,600 x g)で4分間遠心操作する。

A9. S-Blockを空にして\*、AirPore Tape Sheetを剥がし、残ったサンプルでステップA8を繰り返す。

A10. オプション: S-Blockを空にして\*、AirPore Tape Sheetを剥がす。800 µlのBuffer RWTをRNeasy 96 プレートの各ウェルに添加する。各RNeasy 96 プレートを新しいAirPore Tape Sheetでシールする。室温(15 ~ 25 °C)、6,000 rpm(約5,600 x g)で4分間遠心操作する。

miRNA濃縮画分およびlarger RNA (>200 nt)を両方とも精製する際にはこのステップは行わないでください。

A11. S-Blockを空にして\*、AirPore Tape Sheetを剥がす。800 µlのBuffer RPEをRNeasy 96 プレートの各ウェルに添加する。各RNeasy 96 プレートを新しいAirPore Tape Sheetでシールする。室温(15 ~ 25 °C)、6,000 rpm(約5,600 x g)で4分間遠心操作する。

A12. S-Blockを空にして\*、AirPore Tape Sheetを剥がす。もう一度800 µlのBuffer RPEをRNeasy 96 プレートの各ウェルに添加する。各RNeasy 96 プレートを新しいAirPore Tape Sheetでシールする。室温(15 ~ 25 °C)、6,000 rpm(約5,600 x g)で10分間遠心操作する。

残留しているエタノールは、続いて行なう反応を阻害することがあるため、RNeasyメンブレンを乾燥させることは非常に重要です。10分間の遠心操作により、残留している微量の塩を除去し、溶出中のエタノールの混入を防ぎます。

\* ろ液はQIAzol Lysis ReagentあるいはBuffer RWTを含んでいるため、漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版Handbook 3ページを参照ください。

A13. AirPore Tape Sheetを剥がす。溶出用マイクロチューブがセットされた新しいラックの上にRNeasy 96 プレートを置く。

A14. small RNA画分を溶出するために、各ウェルに45 ~ 70  $\mu$ lのRNaseフリー水を添加し、RNeasy 96 プレートを新しいAirPore Tape Sheetでシールする。室温で1分間インキュベートする。その後室温（15 ~ 25  $^{\circ}$ C）6,000 rpm（約5,600 x g）で4分間遠心操作する。

A15. AirPore Tape Sheetを剥がす。さらに45 ~ 70  $\mu$ lのRNaseフリー水で溶出ステップ（ステップA14）を繰り返す。

注：RNAを完全に回収するためには溶出ステップを繰り返す必要があります。

トータルRNA (>200 nt) の精製

A16. 新しいS-Block上にRNeasy 96 プレート（ステップA5から）をセットする。

A17. 800  $\mu$ lのBuffer RWTをRNeasy 96 プレートの各ウェルに添加する。各RNeasy 96 plateを新しいAirPore Tape Sheetでシールする。室温（15 ~ 25  $^{\circ}$ C）6,000 rpm（約5,600 x g）で4分間遠心操作する。

オプション：RNase-Free DNase Setを用いたプレート上でのDNase分解を行う場合には、このステップの代わりにステップB1 ~ B4（英語版 Handbook 49 ページ、Appendix B）を行います。その後ステップA18に進みます。

A18. S-Blockを空にして\*、AirPore Tape Sheetを剥がす。800  $\mu$ lのBuffer RPEをRNeasy 96 プレートの各ウェルに添加する。各RNeasy 96 plateを新しいAirPore Tape Sheetでシールする。室温（15 ~ 25  $^{\circ}$ C）6,000 rpm（約5,600 x g）で4分間遠心操作する。

A19. S-Blockを空にして\*、AirPore Tape Sheetを剥がす。もう一度800  $\mu$ lのBuffer RPEをRNeasy 96 プレートの各ウェルに添加する。各RNeasy 96 プレートを新しいAirPore Tape Sheetでシールする。室温（15 ~ 25  $^{\circ}$ C）6,000 rpm（約5,600 x g）で10分間遠心操作する。

残留しているエタノールは、続いて行なう反応を阻害することがあるため、RNeasy メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。10分間の遠心操作により、残留している微量の塩を除去し、溶出中のエタノールの混入を防ぎます。

A20. AirPore Tape Sheetを剥がす。新しい溶出用マイクロチューブがセットされたラックの上にRNeasy 96 プレートを置く。

A21. RNA画分を溶出するために、各ウェルに45 ~ 70  $\mu$ lのRNaseフリー水を添加し、RNeasy 96 プレートを新しいAirPore Tape Sheetでシールする。室温で1分間インキュベートする。その後室温（15 ~ 25  $^{\circ}$ C）6,000 rpm（約5,600 x g）で4分間遠心操作する。

\* ろ液はBuffer RWTを含んでいるため、漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 3 ページを参照ください。

**A22.**AirPore Tape Sheetを剥がす。さらに45 ~ 70  $\mu$ lのRNaseフリー水で溶出ステップをもう一度繰り返す。

注：溶出ステップを繰り返すことにより、RNAを完全に回収することが可能です。

---

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II  
Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice.jp@qiagen.com



---

WWW.QIAGEN.CO.JP

2301051 07/2006