

miRNeasy Mini プロトコールとトラブルシューティング

動物／ヒトの細胞および組織からの miRNA を含む
トータル RNA 精製用

目次	ページ
プロトコール	
動物細胞からの small RNA を含むトータル RNA 精製	2
動物組織からの small RNA を含むトータル RNA 精製	7
トラブルシューティング	11
Appendix A : 200 nt 以上の larger RNA から miRNA 濃縮画分の分離精製	15



プロトコール：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 Mini Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 12 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するため、RNeasy® Mini スピンカラムをオーバーロードしないでください。Handbook 12 ページの “Determining the amount of starting material” をお読みください。
- 初めて RNA を取り扱う際には Appendix E（英語版 Handbook 39 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°C 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数ヶ月間 -70°C で保存できます。ホモジナイズした凍結ライセートが完全に融解し、塩類が溶解するまで 37°C 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、長時間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。しかし非常に微量の 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 除去操作が必要な場合もあります。このような場合には、残留している微量の DNA はカラム上での DNase 分解（英語版 Handbook 35 ページの Appendix B 参照）、あるいは RNA 精製後に DNase 分解（プロトコールは弊社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、バッファーを温めて沈殿物を再溶解した後、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 6 ページをご覧ください。
- 液層の分離（ステップ 7）以外、全てのプロトコールステップおよび遠心操作は室温で行ないます。実験中は迅速に作業してください。

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（ $96 \sim 100\%$ ）を加えて、ワーキング溶液を調製します。
- カラム上で DNase 分解を行なう場合には、Appendix B の記載（英語版 Handbook 35 ページ）に従って DNase I ストック溶液を調製します。

操作手順

1. ステップ 1a あるいは 1b に従って細胞を回収する。

1a. 浮遊細胞（細胞は 1×10^7 個以上使用しない）：

細胞数を数え、使用量を決定する。適切な細胞数を遠心チューブ（別途準備）中で **300 x g** で 5 分間遠心操作を行ない、細胞をペレット化する。上清を注意深く完全に吸引除去した後ステップ 2 に進む。

注：細胞培養液が完全に除去されていないと、細胞の溶解が阻害されたりライセートが希釈され、RNeasy Mini スピнкаラム・メンブレンへの RNA 結合条件に影響を及ぼします。これらの変化により RNA 収量が低下することがあります。

1b. 単層培養細胞（細胞は 1×10^7 個以上使用しない）：

単層培養細胞は培養容器（直径 10 cm まで）中で直接溶解するか、あるいはトリプシン処理を行ない、細胞ペレットとして回収後溶解することができる。細胞培養フラスコの付着細胞は必ずトリプシン処理を行なう。

直接細胞溶解：

細胞数を数え、使用量を決定する。細胞培養液を完全に吸引し、即座にプロトコルのステップ 2 を行なう。

注：細胞培養液が完全に除去されていないと、細胞の溶解が阻害されたりライセートが希釈され、RNeasy Mini スピнкаラム・メンブレンへの RNA 結合条件に影響を及ぼします。これらの変化により RNA 収量が低下することがあります。

細胞のトリプシン処理および細胞の回収：

細胞数を数え、使用量を決定する。培養液を吸引除去し、PBS で細胞を洗浄する。PBS を吸引除去し、**0.1 ~ 0.25%**トリプシン / PBS 溶液を加える。ディッシュあるいはフラスコから細胞を剥離後、培養液（トリプシンを不活性化するために血清を含む）を添加し、細胞を RNase フリーのガラスあるいはポリプロピレン遠心チューブ（別途準備）に移し、**300 x g** で 5 分間遠心する。上清を完璧に吸引除去し、ステップ 2 に進む。

注：細胞培養液が完全に除去されていないと、細胞の溶解が阻害されたりライセートが希釈され、RNeasy Mini スピнкаラム・メンブレンへの RNA 結合条件に影響を及ぼします。これらの変化により RNA 収量が低下することがあります。

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ルーズにする。700 μ l の QIAzol Lysis Reagent を添加する。ボルテックスあるいはピペットで混和する。

注：細胞ペレットが完全に懸濁されていないと効率的に溶解されず、収量が低下します。

単層培養細胞の直接溶解には 700 μ l の QIAzol Lysis Reagent を培養ディッシュに添加する。ゴム製のポリスマンで細胞ライセートを回収する。ライセートをマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで入れる。ボルテックスあるいはピペットで混合し、細胞塊がないことを確認する。

3. 3×10^6 個以下の細胞を調製する場合には、細胞を 1 分間ボルテックスすればホモジナイズできる。

3×10^6 細胞以上を処理する場合は QIAshredder ホモジナイザー、TissueRuptor™、あるいはシリンジと注射針を用いてホモジナイズできます。ホモジナイゼーション法の詳細に関しては、英語版 Handbook 16 ~ 18 ページの “Disrupting and homogenizing starting material” を参照してください。

注：不完全なホモジナイゼーションは RNA 収量の著しい低下や、RNeasy Mini スピнкаラムの目詰まりの原因になります。

注：ホモジナイズした細胞ライセートは数カ月間 -70°C で保存できます。

4. ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に室温（15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ ）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。

5. ホモジネート溶液が入ったチューブに 140 μ l のクロロホルムを添加し、しっかりと蓋をする。チューブを 15 秒間激しく振る。

混合液の完全な混和は次のステップで液層を分離するために重要です。

6. ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に室温（15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ ）で 2 ~ 3 分間放置する。

7. 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 $\times g$ で 15 分間遠心分離する。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 $^{\circ}\text{C}$ ）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 μ 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（15 ページ）のステップを行ないます。

8. 一番上の水層を新しい 2 ml のコレクションチューブ（添付）に移す。1.5 倍容量の 100%エタノール（通常 525 μ l）を添加し、ピペットで完全に混和する。遠心操作は行なわない。直ちにステップ 9 を行なう。

エタノール添加後、沈殿物が形成するかもしれませんが、これはこの調製法には影響しません。

9. **2 ml** コレクションチューブ（添付）の中にセットした **RNeasy Mini** スピнкаラムに最大 **700 μ l** のサンプル（形成した沈殿物を含む）をピペットでアプライする。カラムの蓋を静かに閉め、室温（**15 ~ 25°C**）、**8,000 x g** (**10,000 rpm**) 以上で **15 秒間**遠心操作を行なう。ろ液を棄てる*。

ステップ 10 でコレクションチューブを再使用します。

10. サンプルの残りをういてステップ 9 を繰り返す。ろ液を棄てる†。

ステップ 11 でコレクションチューブを再使用します。

オプション：オプションでカラム上の DNase 分解を行なう場合には、このステップ後に B1 ~ B4（英語版 Handbook 36 ページ）を行ないます。

11. オプション：**700 μ l** の **Buffer RWT** を **RNeasy Mini** スピнкаラムに添加する。チューブを静かに閉め、**8,000 x g** (**10,000 rpm**) 以上で **15 秒間**遠心してカラムを洗浄する。ろ液を棄てる†。

オプションのカラム上での DNase 処理を行なう場合にはこのステップを行なう必要はありません（英語版 Handbook 35 ページ）。

ステップ 12 でコレクションチューブを再使用します。

12. **500 μ l** の **Buffer RPE** を **RNeasy Mini** スピнкаラムにピペットで添加する。チューブを静かに閉め、**8,000 x g** (**10,000 rpm**) 以上で **15 秒間**遠心してカラムを洗浄する。ろ液を棄てる。

ステップ 13 でコレクションチューブを再使用します。

13. **RNeasy Mini** スピнкаラムに **500 μ l** の **Buffer RPE** を再度添加する。チューブを静かに閉め、**RNeasy Mini** スピнкаラム・メンブレンを乾燥するため、**8,000 x g** (**10,000 rpm**) 以上で **2 分間**遠心操作する。

RNA 溶出中にエタノールがキャリアオーバーしないように、長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥します。残留エタノールはダウンストリーム反応を妨害することがあります。

注：遠心操作後、**RNeasy Mini** スピнкаラムがろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。これによりエタノールのキャリアオーバーを防ぎます。

14. オプション：**RNeasy Mini** スピнкаラムを新しい **2 ml** コレクションチューブ（別途準備）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。最高スピードで **1 分間**マイクロ遠心機で遠心操作を行なう。

ステップ 13 の後 **RNeasy Mini** スピнкаラムの外側にろ液が残っている場合、あるいは **Buffer RPE** のキャリアオーバーの可能性を排除するためにこのステップを行ないます。

* 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 6 ページを参照ください。

† QIAzol Lysis Reagent あるいは **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 6 ページを参照ください。

15. RNeasy Mini スピンカラムを新しい 1.5 ml のコレクションチューブ（添付）に移す。30 ~ 50 μ l の RNase フリー水を直接 RNeasy Mini スピンカラム・メンブレンにピペットでアプライする。カラムの蓋を静かに閉め、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作を行ない、RNA を溶出する。
16. 予想される RNA 収量が 30 μ g 以上の場合には、30 ~ 50 μ l の RNase フリー水を用いてステップ 15 を繰り返す。同じコレクションチューブに溶出する。

高濃度のトータル RNA を得るためには、この 2 度目の溶出ステップに最初の溶出液（ステップ 15 より）を使って溶出します。この収量は 2 度目に RNase フリー水を使って得られる量よりは 15 ~ 30% 少なくなりますが、最終濃度は高くなります。

プロトコール：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 Mini Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 12 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するため、RNeasy Mini スピンカラムをオーバーロードしないでください。英語版 Handbook 12 ページの “Determining the correct amount of starting material” を参照してください。
- 初めて RNA を取り扱う際には Appendix E（英語版 Handbook 39 ページ）をお読みください。
- 最適な結果を得るためには、採取した組織を RNAlater® RNA Stabilization Reagent 中で即座に安定化します。安定化試薬中の組織は 37°C で最高 1 日、15 ~ 25°C で 7 日間、2 ~ 8°C で 4 週間、また -20°C か -80°C では長期保存できます。
- 新鮮、凍結あるいは RNAlater で安定化した組織を使用できます。組織は -70°C で数ヶ月保存できます。QIAzol Lysis Reagent 中で組織を破碎する前の重量測定や取り扱いの際に組織を解凍しないでください。ホモジナイズした組織ライセート（QIAzol Lysis Reagent 中、ステップ 3）も -70°C で数ヶ月保存できます。凍結ライセートを調製する場合には、サンプルが完全に解け、溶解バッファー中の塩が溶解するまで室温（15 ~ 25°C）あるいは 37°C の水浴でサンプルを解凍します。RNA 化学分解の原因になるため、37°C で長時間サンプルをインキュベートすることは避けてください。ステップ 4 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 除去操作が必要な場合もあります。このような場合には、残留している微量の DNA はカラム上での DNase 分解（英語版 Handbook 35 ページの Appendix B 参照）、RNA 精製後の DNase 分解（プロトコールは弊社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、バッファーを温めて沈殿を再溶解した後、室温（15 ~ 25°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 6 ページをご覧ください。
- 液層の分離（ステップ 7）以外、全てのプロトコールステップおよび遠心操作は室温で行ないます。実験中は迅速に作業してください。

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。
- カラム上で DNase 分解を行なう場合には、Appendix B の記載（英語版 Handbook 35 ページ）に従って DNase I ストック溶液を調製します。

操作手順

1. 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。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、RNA^{later} で安定した組織は 25 mg、脂肪組織は 100 mg 以上使用しない。

RNA^{later} で安定化した組織を用いない場合には、QIAzol Lysis Reagent に入れる前に組織を決して解凍しないでください。

2. 全組織片を RNA 精製に使用できる場合には、破砕とホモジナイゼーション用の適切な大きさの容器に入った 700 μ l の QIAzol Lysis Reagent に組織片を直接入れる。

組織の一部のみを使用する場合には、組織片の重量を測定し、破砕とホモジナイゼーション用の適切な大きさの容器に入った 700 μ l の QIAzol Lysis Reagent に組織片を直接入れる。

サンプル採取の後、RNA^{later} Reagent による安定化、瞬間凍結、あるいはステップ 3 での破砕とホモジナイゼーションを行なうまで、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。

注：ホモジナイゼーション中に生じる可能性がある泡がこぼれないような容量を持つ最適な大きさの容器を使用します。

3. TissueLyser や TissueRuptor、あるいは他の方法を用いて即座にサンプルが均一になるまでホモジナイズする（通常 20～40 秒間）。

破砕およびホモジナイゼーション法の詳細に関しては英語版 Handbook 16～18 ページを参照ください。

注：TissueRuptor あるいは TissueLyser（英語版 Handbook 37 ページ、Appendix C）を用いてホモジナイゼーションを行なうと、他のホモジナイゼーション法を用いた場合よりもトータル RNA の収量は一般に高くなります。

ホモジナイゼーションの際に（特に脳組織）泡が形成されることがあります。泡が形成した場合には、ホモジネートを室温で 2～3 分放置し、泡が消えてから次のプロトコールステップに進みます。

注：ホモジナイズした細胞ライセートは数カ月間 -70°C で保存できます。

4. ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に室温（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。

5. ホモジネート溶液が入ったチューブに **140 μ l** のクロロホルムを添加し、しっかりと蓋をする。チューブを **15 秒** 間激しく振る。

完全に混合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。

6. ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に室温 (**15 ~ 25°C**) で **2 ~ 3 分** 間放置する。

7. **4°C**、**12,000 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°C**) 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 μ 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 (15 ページ) のステップを行ないます。

8. 一番上の水層を新しいコレクションチューブ (添付) に移す。**1.5 倍** 容量の **100% エタノール (通常 525 μ l)** を添加し、ピペットで完全に混和する。遠心操作は行なわない。直ちにステップ 9 を行なう。

エタノール添加後、沈殿物が形成するかもしれませんが、これはこの調製法には影響しません。

9. **2 ml** コレクションチューブ (付属品) の中にセットした **RNeasy Mini** スピнкаラムに最大 **700 μ l** のサンプル (形成した沈殿物を含む) をピペットでアプライする。カラムの蓋を静かに閉め、室温 (**15 ~ 25°C**)、**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒** 間遠心操作を行なう。ろ液を棄てる*。

ステップ 10 でコレクションチューブを再使用します。

10. サンプルの残りをを用いてステップ 9 を繰り返す。ろ液を棄てる*。

ステップ 11 でコレクションチューブを再使用します。

オプション：オプションでカラム上の DNase 分解を行なう場合には、このステップ後に B1 ~ B4 (英語版 Handbook 36 ページ) を行ないます。

11. **700 μ l** の **Buffer RWT** を **RNeasy Mini** スピнкаラムに添加する。チューブを静かに閉め、**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒** 間遠心してカラムを洗浄する。ろ液を棄てる[†]。

オプションのカラム上での DNase 処理を行なう場合にはこのステップを行なう必要はありません (英語版 Handbook 35 ページ)。

ステップ 12 でコレクションチューブを再使用します。

* 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 6 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 6 ページを参照ください。

12. 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy Mini スピнкаラムにピペットで添加する。チューブを静かに閉め、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心してカラムを洗淨する。ろ液を棄てる。

ステップ 13 でコレクションチューブを再使用します。

13. RNeasy Mini スピнкаラムへ 500 μ l の Buffer RPE を添加する。チューブを静かに閉め、RNeasy Mini スピнкаラム・メンブレンを乾燥するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心操作する。

RNA 溶出中にエタノールがキャリーオーバーしないように、長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥します。残留エタノールはダウンストリーム反応を妨害することがあります。

注：遠心操作後、RNeasy Mini スピнкаラムがろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。これによりエタノールのキャリーオーバーを防ぎます。

14. オプション：RNeasy Mini スピнкаラムを新しい 2 ml コレクションチューブ（別途準備）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。最高スピードで 1 分間マイクロ遠心機により遠心操作を行なう。

ステップ 13 の後 RNeasy Mini スピнкаラムの外側にろ液が残っている場合は、Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除するためにこのステップを行ないます。

15. RNeasy Mini スピнкаラムを新しい 1.5 ml のコレクションチューブ（添付）に移す。30 ~ 50 μ l の RNase フリー水を直接 RNeasy Mini スピнкаラム・メンブレンにピペットでアプライする。カラムの蓋を静かに閉め、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作を行ない、RNA を溶出する。

16. 予想される RNA 収量が 30 μ g 以上の場合には、30 ~ 50 μ l の RNase フリー水を用いてステップ 15 を繰り返す。同じコレクションチューブに溶出する。

高濃度のトータル RNA を得るためには、この 2 度目の溶出ステップに最初の溶出液（ステップ 15 より）を使って溶出します。この収量は 2 度目に RNase フリー水を使って得られる量よりは 15 ~ 30% 少なくなります。最終濃度は高くなります。

トラブルシューティング

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（ステップ5）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、プロトコルのステップ6と7での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中が有機溶媒を含む
スタートサンプルが有機溶媒（例；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。

カラムの目詰まり

- 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 12 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“Disrupting and homogenizing starting material”（英語版 Handbook 16～18 ページ）を参照。
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 12 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
液層の分離（ステップ7）以外、全ての遠心操作は室温（15～25℃）で行なう。20℃に設定しても20℃以下に冷却される遠心機もある。このような場合、RNeasy Mini スピнкаラムの目詰まりを起こす沈殿物を形成し、RNA収量が低下する。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 Mini スピнкаラムにアプライする。

コメント

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(15 ページ)のプロトコールに従う。このプロトコールには RNeasy MinElute® Cleanup Kit が追加が必要。

RNA 収量が低いあるいは皆無

- 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 12 ページ）。
- 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 “Disrupting and homogenizing starting material”（英語版 Handbook 16 ~ 18 ページ）を参照。

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 12 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) 溶出バッファーが正確に注入されていない RNeasy Mini スピнкаラムのメンブレンが完全にバッファーで覆われるように、必ずメンブレンの中央部分に溶出バッファーを注入する。
- d) RNA がメンブレンに残留している プロトコールの溶出ステップを繰り返すが、遠心前に RNeasy Mini スピнкаラムに RNase フリー水を添加後、実験台で 10 分間インキュベートする。

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（ステップ 4）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°C）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。

コメント

- 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 41 ページ、Appendix F 参照)。

RNA が分解

- a) サンプルの取り扱いが不適切 凍結組織サンプルでは液体窒素中で即座に瞬間凍結し、 -70°C で適切に保存する。特にプロトコールの最初の数ステップでは迅速に操作する。“Appendix E: General Remarks on Handling RNA” (英語版 Handbook 39 ページ) と “Handling and storage of starting material” (英語版 Handbook 16 ページ) を参照。
- b) RNase の混入 全てのバッファーはテストされ、RNase フリーであることが保証されているが、使用中に RNase が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 E: General Remarks on Handling RNA” (英語版 Handbook 39 ページ) を参照。
- RNase を使用した DNA 調製の際に用いた吸引乾燥装置に RNA サンプルを入れない。

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 ステップ 7 の液層分離は 4°C で行なう。遠心操作中に遠心機が 10°C 以上に加熱されないことを確認する。
- 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 プロトコールで指示されているステップで、RNase-Free DNase Set (英語版 Handbook 35 ページの Appendix B) を用いてオプションのカラム上 DNase 分解を行なう。
- 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・プロトコール (RNeasy Mini 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。

* 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 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 20 ~ 30℃で使用する。
- b) エタノールの
キャリアオーバー 二回目の Buffer RPE による洗浄（ステップ 13）で 20 ~ 25℃、8,000 x g（10,000 rpm）以上で 2 分間遠心操作し、RNeasy Mini スピнкаラムメンブレンを確実に乾燥する。遠心操作後、RNeasy Mini スピнкаラムがろ液に接触しないように遠心機からカラムを注意深く取り除く。これによりエタノールのキャリアオーバーを防ぐ。
- エタノール混入の可能性を完全に排除するため、プロトコルのステップ 14 に記載されているように RNeasy Mini スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、1 分間最高速度で遠心操作することを推奨する。

Appendix A : 200 nt 以上の larger RNA 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 などの大きな 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。miRNA 濃縮画分の回収には、RNeasy MinElute Cleanup Kit (cat. no. 74204) が必要です。

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 に特異的なリアルタイム定量 RT-PCR で定量することをお薦めします。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

前述のプロトコルに記載されているようにステップ 1 ~ 7 を行ないます (2、7 ページ)。その後ステップ 8 に進まず、下記のステップ A1 ~ A10 を行なって miRNA 濃縮画分のみを分離するか、ステップ A1 ~ A16 を行なって small RNA 画分と 200 nt 以上のトータル RNA 画分を分離します。

- A1.** 一番上の水層を 2 ml の新しい反応チューブ (別途準備) に移す。等量の 70% エタノール (通常 350 μ l) をサンプルに添加し、ボルテックスで十分に混和する。遠心操作は行なわない。その後直ちにステップ A2 に進む。
- A2.** 形成した沈澱物も含んだサンプル (約 700 μ l) を、2 ml のコレクションチューブにセットした RNeasy Mini スピンカラムにピペットで加える。チューブの蓋を静かに閉めて、室温 (15 ~ 25°C)、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心操作する。miRNA を含むろ液を 2 ml の新しい反応チューブ (別途準備) にピペットで入れる。
- A3.** miRNA 濃縮画分のみを精製する際には、RNeasy Mini スピンカラムを捨ててステップ A4 ~ A10 のみを行なう。

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 Mini スピンカラムを保管してステップ A11 で使用する (スピンカラムは 4°C 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 A4 ~ A10、large RNA 精製はステップ A11 ~ A16 を行なう。

RNeasy MinElute Cleanup Kit を用いて **miRNA 濃縮画分**の精製 (ステップ **A4 ~ A10**)

A4. ステップ **A2** からのろ液に **450 μ l** の **100%エタノール (0.65 倍容量)** を添加し、ボルテックスでよく混和する。遠心操作は行なわない。すぐにステップ **A5** に進む。

A5. **2 ml** コレクションチューブ (添付) にセットした **RNeasy MinElute スピнкаラム** に、サンプル **700 μ l** をピペットでアプライする。チューブの蓋を静かに閉めて、室温 (**15 ~ 25°C**)、**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒間**遠心操作する。ろ液を棄てる*。

全サンプルがスピнкаラムにアプライされるまで、このステップを繰り返します。毎回ろ液を棄ててください。

A6. オプション：**700 μ l** の **Buffer RWT** を **RNeasy MinElute スピнкаラム** に添加する。静かにチューブの蓋を閉め、カラムを洗浄するために **8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒間**遠心操作する。ろ液を棄てる*。

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なわないでください。

ほとんどの混雑物が最初の **RNeasy Mini スピнкаラム** 上で除去されるので、このステップは miRNA 濃縮画分でオプションとして使用できます。

A7. **500 μ l** の **Buffer RPE** を **RNeasy MinElute スピнкаラム** にピペットで入れる。チューブの蓋を静かに閉めて、**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒間**遠心操作する。ろ液を棄てる。

A8. **RNeasy MinElute スピнкаラム** に **500 μ l** の **80%エタノール** を添加する。チューブを静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを乾燥するため、**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **2 分間**遠心操作する。ろ液とコレクションチューブを棄てる。

注：遠心操作後、**RNeasy MinElute スピнкаラム** がろ液に触れて、その結果エタノールのキャリーオーバーが起こらないように、コレクションチューブから注意して **RNeasy スピнкаラム** を取り除いてください。

A9. **RNeasy MinElute スピнкаラム** を新しい **2 ml** コレクションチューブに移す。蓋を開き、**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **5 分間**遠心操作を行なう。

A10. **RNeasy MinElute スピнкаラム** を **1.5 ml** のコレクションチューブにセットし、スピнкаラム・メンブレンに **14 μ l** の **RNase フリー水** をピペットで入れる。チューブを静かに閉め、**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **1 分間**遠心操作を行ない、**miRNA 濃縮画分** を溶出する。

* QIAzol lysis Reagent あるいは 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 6 ページを参照ください。

RNeasy Mini スピнкаラムを用いたトータル RNA (>200 nt) の精製 (ステップ A11 ~ A16)

A11. 700 μ l の Buffer RWT を RNeasy Mini スピнкаラム (ステップ A3 から) に添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレン洗浄のために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。ろ液を棄てる*。

オプション: RNase-Free DNase Set を用いたカラム上での DNase 分解を行なう場合には、このステップの代わりにステップ B1 ~ B4 (英語版 Handbook 35 ページ、Appendix B) を行ないます。その後ステップ A12 に進みます。

A12. RNeasy Mini スピнкаラムに 500 μ l の Buffer RPE を添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレン洗浄のために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。ろ液を棄てる。

A13. 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy Mini スピнкаラムにピペットで入れる。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレン洗浄のために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。ろ液とコレクションチューブを棄てる。

A14. RNeasy Mini スピнкаラムを新しい 2 ml コレクションチューブに移す。蓋を開けて最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

A15. RNeasy Mini スピнкаラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブに移す。30 ~ 50 μ l の RNase フリー水を直接スピнкаラム・メンブレンにピペットでアプライする。チューブを静かに閉め、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作を行ない、トータル RNA を溶出する。

A16. 予想される RNA 収量が 30 μ g 以上の場合には、30 ~ 50 μ l の RNase フリー水を用いてステップ A15 をもう一度繰り返す。同じコレクションチューブに溶出する。

* 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 6 ページを参照ください。

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, RNeasy®, MinElute®, TissueRuptor™ (QIAGEN Group).

"RNAlater[®]" is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents.

QIAzol Lysis Reagent is a subject of US Patent No. 5,346,994 and foreign equivalents.

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2006–2007 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

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

