

**RNAlater™**

## プロトコールとトラブルシューティング

組織中のRNAの安定化および保護用

RNAlater TissueProtect Tube

RNAlater RNA Stabilization Reagent

### 目次

ページ

RNAlater RNA Stabilization Reagentを用いた

RNA安定化用プロトコール

2

トラブルシューティング

5



# RNAlater RNA Stabilization Reagent を用いた RNA 安定化用 プロトコール

本プロトコールは、RNAlater RNA Stabilization Reagent 中にヒトあるいは動物組織を保存するための操作手順です。RNeasy Protect Kit あるいは RNeasy Kit を用いた RNA 分離に関しては、RNeasy Mini Handbook (日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり) または RNeasy Midi/Maxi Handbook を参照してください。

## 実験を始める前の重要事項

- RNAlater TissueProtect Tube あるいは RNAlater RNA Stabilization Reagent を初めて使用する場合は、英語版 Handbook 7 ページの “ Important Points before Using RNAlater TissueProtect Tube and RNAlater RNA Stabilization Reagent ” をまずお読みください。
- 組織中の RNA を効率的に保護するために十分な量の RNAlater RNA Stabilization Reagent を使用することが重要です。この試薬が少なすぎると、保存中の組織の RNA 分解を起こす原因となります。英語版 Handbook 7 ページの “ Determining the volume of RNAlater RNA Stabilization Reagent for RNA stabilization in animal tissues ” をお読みください。
- 組織は、0.5 cm 以下の厚さにスライスしてください。組織片が 0.5 cm 以上の場合は、RNAlater RNA Stabilization Reagent 中に保存する前により薄くスライスする必要があります (本プロトコール・ステップ 3、英語版 Handbook 7 ページの “ Maximum tissue size for effective stabilization ” 参照)。厚さが 0.5 cm 以上の組織片では、サンプル中へ試薬が速く浸透せず、組織の中心部分での RNA が安定化されません。組織スライスが厚すぎると RNA 分解が起こります。
- 新鮮で凍結されていないサンプルだけを RNAlater RNA Stabilization Reagent を用いて安定化可能です。すでに凍結されている組織サンプルは、溶液中でゆっくり解凍するので、試薬が組織中に迅速に浸透する前に RNA の分解が始まります。
- RNA はサンプルの収集後、RNAlater RNA Stabilization Reagent で処理されるまでは保護されていないので、サンプル収集後、即座に適切な量の RNAlater RNA Stabilization Reagent 中にサンプルを沈めます (プロトコールのステップ 1 ~ 3)。
- RNAlater RNA Stabilization Reagent は、室温 (15 ~ 25 ) 以下で保存すると沈澱を形成することがあります。形成した沈澱は 37 で振盪すればまた溶解します。すべての沈澱を溶解させてから使用してください。
- RNAlater TissueProtect Tube の使用は 1 回限りです。チューブの再使用はしないでください。

1. 組織サンプルを切除する前に、RNAlater RNA Stabilization Reagent 中で安定化する組織サンプルの容量（あるいは重さ）を見積もる。
2. 組織サンプルを保存するために必要なRNAlater RNA Stabilization Reagentの適切な量を決定する。少なくとも、組織サンプルの10倍量のRNAlater RNA Stabilization Reagent（組織1 mgに対して約10  $\mu$ l）が必要である。必要量を計算し、適切なサイズのRNAlater TissueProtect Tubeを選ぶ。

小さいサイズのRNAlater TissueProtect Tubeは150 mgまでの組織の安定化用にデザインされています。大きいサイズのRNAlater TissueProtect Tubeは500 mgまでの組織を効率的に安定化するためにデザインされています。

組織サンプルをRNAlater RNA Stabilization Reagent 中で輸送する場合には、輸送中に組織が溶液中に確実に沈んでいるようにしてください。また輸送中にチューブが垂直に立っていることを確認してください。

注：組織は少なくとも10倍量のRNAlater RNA Stabilization Reagent（あるいは組織1 mgに対して10  $\mu$ lの溶液）の中に入れます。この試薬の量が少ないと、保存中にRNAの分解を起こす恐れがあります。英語版 Handbook 7ページの“Determining the volume of RNAlater RNA Stabilization Reagent for RNA stabilization in animal tissues”を参照してください。

3. 動物から組織サンプルを切除し、0.5 cm以下の厚さにカットする。このステップはできるだけ迅速に行い、直ちにステップ4に進む。

もし、組織の厚さがすでに（少なくとも1ヶ所の寸法が）0.5 cm以下の場合には、より細かくカットする必要はないので、すぐにステップ4に進む。

注：厚さが0.5 cm以上の組織片では、サンプル中へ試薬が早く浸透せず、組織の中心部分でのRNAが安定化されません。組織スライスが厚すぎるとRNA分解が起こります。大きい組織片は安定化する前に、0.5 cm以下の厚さにカットしてください。組織片は、少なくとも1ヶ所の寸法が0.5 cm以下になるようなサイズにしてください。英語版 Handbook 7ページの“Maximum tissue size for effective stabilization”を参照してください。

組織中のRNAは、サンプルの収集後、RNAlater RNA Stabilization Reagentで処理されるまでは保護されていないのでサンプルの収集後、即座に十分な量のRNAlater RNA Stabilization Reagent中にサンプルを沈めます。

4. RNAlater RNA Stabilization Reagentの中に組織片を完全に沈める。

注：組織中のRNAは、RNAlater RNA Stabilization Reagentで処理されるまでは保護されていません。サンプルの収集後、即座に十分な量のRNAlater RNA Stabilization Reagent中にサンプルを沈めます。

組織サンプルをRNAlater RNA Stabilization Reagent 中で輸送する場合には、輸送中に組織が溶液中に確実に沈んでいるようにしてください。また輸送中にチューブが垂直に立っていることを確認してください。

5. *RNAlater RNA Stabilization Reagent*の中に沈めた組織は、2 ~ 8 °Cでは最高4週間、18 ~ 25 °Cでは最高7日間、37 °Cでは最高1日保存できる。

-20 °Cでの長期保存には、まず試薬中のサンプルを2 ~ 8 °Cで一晩インキュベートした後、試薬中の組織を-20 °Cで保存する。

-80 °Cでの長期保存には、まず試薬中のサンプルを2 ~ 8 °Cで一晩インキュベートする。その後、組織を*RNAlater RNA Stabilization Reagent*から取り出し、-80 °Cで保存する。

*RNAlater RNA Stabilization Reagent*中に保存したサンプルは-20 °Cで凍結しません。低温により保存溶液中に結晶あるいは沈澱が形成されることがありますが、続いて行うRNA分離には影響しません。沈殿物を溶解する必要はありません。

-20 °Cあるいは-80 °Cで保存したサンプルを室温で解凍して調製し、再び凍結しても、20回までの凍結・解凍はRNAの品質や収量に影響しません。

注：できれば、低い温度で長期保存することをお勧めします（例；37 °Cあるいは室温で保存する代わりに2 ~ 8 °Cで4週間；長期保存には-20 °Cあるいは-80 °C）。

# トラブルシューティング

このトラブルシューティングガイドは何か問題が起こった時、解決法を見出すのにお役立てください。また、QIAGENテクニカルサポート部では、このハンドブックのインフォメーションやプロトコルあるいは分子生物学的なアプリケーションについての皆様からのご質問にいつでもお答えしております。

## コメント対処法

---

### RNAが分解

- |                         |  |
|-------------------------|--|
| a) スタートサンプルを即座に安定化しなかった | サンプルの収集後、サンプルを即座に適切な容量の試薬に沈める。   |
| b) スタートサンプル量が多すぎる       | スタートサンプル量を減らすか、大きいサイズのRNA <sup>later</sup> TissueProtect Tubeを使用する。( Handbook 7ページの“ Important Points before Using RNA <sup>later</sup> TissueProtect Tube and RNA <sup>later</sup> RNA Stabilization Reagent ”を参照)                      |
| c) カットしたサンプルが厚すぎる       | 厚すぎるサンプルを0.5 cm以下にスライスする。  |
| d) 組織が完全に溶液中に沈んでいない     | 組織が完全にRNA <sup>later</sup> RNA Stabilization Reagentに沈んでいることを確認する。小さい組織片はふたや容器の側面に付着することがある。   |
| e) 凍結したサンプル             | 安定化には新鮮な未凍結サンプルのみを使用する。  |
| f) 保存期間が長過ぎる            | 安定化したサンプルの保存期間は、37 °Cで1日、18 ~ 25 °Cで7日、2 ~ 8 °Cで4週間。長期保存には、-20 °Cあるいは-80 °Cで保存する。より低温での保存を薦める。   |
| g) RNA分離中にRNAが分解        | スタートサンプル、溶液、サンプルの適切な取り扱いが必要。全てのRNeasyバッファーはテストされ、RNaseフリーが保証されているが、使用中にRNaseが混入し得るので、調製中あるいはその後の取扱いにも、RNaseが混入しないように注意する。RNAの取り扱いの一般的な注意に関してはRNeasy Mini Handbook (日本語版プロトコルとトラブルシューティングあり) あるいはRNeasy Midi/Maxi HandbookのAppendix Aを読む。 |





---

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:techservicejp@qiagen.com



---

W W W . Q I A G E N . C O . J P

2300776 02/2005