

AllPrep™ DNA/RNA Mini プロトコールとトラブルシューティング

同一の動物細胞 / 組織からのゲノムDNAと
トータルRNAの同時分離精製

目次	ページ
プロトコール	
動物細胞からのゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製	2
動物組織からのゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製	9
トラブルシューティング	16



プロトコール：動物細胞からのゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製

スタート・サンプル量の正確な測定

最適なRNAの収量および純度を得るためには、正しいスタートサンプル量を使用することが重要です。一般的には、使用できる最低量は細胞100個ですが、最大使用量は以下の項目により、変動します：

- 細胞の種類によるRNA含有量
- AllPrep DNA スピнкаラムのDNA結合容量
- RNeasy スピнкаラムのRNA結合容量（100 µg RNA）
- 効率的な溶解に必要なBuffer RLT Plus容量（使用できるBuffer RLT Plusの最大容量の限界は細胞数 1×10^7 個までである）

RNA含有量は細胞の種類により大きく変動します。スタートサンプルの最大量をいかに決定するかを以下に実例をあげて説明します：

- COS細胞は高含有量のRNAを有しています（ 10^6 個の細胞当たり約35 µgのRNA）。RNeasyスピнкаラムのRNA結合容量を超えてしまうため、 3×10^6 個以上の細胞を使用しないでください。
- HeLa細胞は平均的なRNA量を有しています（ 10^6 個の細胞当たり約15 µgのRNA）。RNeasyスピнкаラムのRNA結合容量を超えてしまうため、 7×10^6 個以上の細胞を使用しないでください。
- NIH/3T3細胞のRNA含有量は低く（ 10^6 個の細胞当たり約10 µgのRNA）、スタートサンプル量として最高 1×10^7 個の細胞を使用できます。

処理する細胞がTable 2（英語版Handbook 14ページ）に掲載されていない場合や、RNA含有量に関する情報がない場合には、 $3 \sim 4 \times 10^6$ 個以下の細胞で実験を開始することを推奨します。精製したRNAの収量および純度により、次回の調製で細胞数を増加することも可能です。

RNAと共にDNAが精製される原因となるため、AllPrep DNAスピнкаラムにオーバーロードしないでください。RNAの収量および純度が顕著に低下するため、RNeasyスピнкаラムをオーバーロードしないでください。

Table 3（英語版Handbook 15ページ）に様々な細胞培養容器中のHeLa細胞の数を掲載していますので参考にしてください。

実験を始める前の重要事項

- AllPrep DNA/RNA 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。
- 初めてRNAを調製する場合にはAppendix A (英語版 Handbook 38 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。凍結した細胞ペレットは少し融解させ、ステップ2でチューブを指で弾いて細胞塊を溶かします。ステップ3でホモジナイズした細胞ライセートは数カ月間 -70°C で保存できます。凍結した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ます。RNAが分解する可能性があるため、長時間のインキュベートは避けてください。不溶性物質が確認される場合には、 $3000 \sim 5000 \times g$ で5分間遠心します。上清を新しいRNaseフリーのガラス、あるいはポリプロピレンのチューブに移し、ステップ4を続けて行ないます。
- 使用前に β -メルカプトエタノール (β -ME) を Buffer RLT Plus に添加しなければなりません (1 ml Buffer RLT Plus 当たり 10 μl β -ME)。適切な保護着を着用の上、ドラフト内で調製してください。 β -MEを添加した後、Buffer RLT Plusは室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) で1ヶ月間安定です。
- Buffer RPE、Buffer AW1、Buffer AW2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。
- 保存中に Buffer RLT Plus は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、室温にして使用します。
- Buffer RLT Plus、Buffer RW1、Buffer AW1 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 に関しては英語版 Handbook 6 ページを参照ください。
- この実験の全てのステップは室温で行なってください。実験中は迅速に作業してください。
- 全ての遠心ステップは標準的なマイクロ遠心機を用いて $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ で行なってください。遠心機が 20°C 以下に冷却されていないことを確認します。

操作手順

サンプルの破碎およびホモジナイゼーション

1. ステップ 1a あるいは 1b に従って細胞を収集する。

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（非付属品）中で **300 x g** で **5 分間** 遠心操作を行なう。上清を注意深く完全に吸引除去してからステップ 2 に進む。

注：細胞培養液を完全に除去しないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、核酸精製の条件が変化し、その結果、核酸の品質や収量が低下します。

1b. 付着細胞（細胞は 1×10^7 個以上使用しない）：

付着細胞は培養容器（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。

培養ディッシュでの直接細胞溶解：

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てプロトコールのステップ 2 に続く。

注：細胞培養液を完全に除去しないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、核酸精製の条件が変化し、その結果、核酸の品質や収量が低下します。

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。**PBS** を吸引除去し、**PBS** に **0.10 ~ 0.25 %** のトリプシンを加える。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（非付属品）に入れ **300 x g** で **5 分間** 遠心する。完全に上清を吸引除去しプロトコールのステップ 2 に進む。

注：細胞培養液を完全に除去しないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、核酸精製の条件が変化し、その結果、核酸の品質や収量が低下します。

2. **Buffer RLT Plus** を添加して細胞を破碎する。

ペレット化した細胞はチューブを指で軽く叩いてルーズにし、適切な量の **Buffer RLT Plus** を添加する（**5 ページ**、表 **5** 参照）。ボルテックスあるいはピペットで混合し、ステップ 3 に進む。

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。使用前に **Buffer RLT Plus** に β -ME を添加したかを確認します（“ 実験を始める前の注意事項 ” を参照）。

表5. 溶解した細胞ペレットに対する Buffer RLT Plus 量

細胞ペレットの細胞数	Buffer RLT Plus の容量
<5 x 10 ⁶	350 µl
5 x 10 ⁶ ~ 1 x 10 ⁷	600 µl

付着細胞を直接溶解するためには、適切な容量の Buffer RLT Plus (表6参照) をディッシュ内の細胞に添加する。細胞ライセートをゴム製のポリスマンで回収し、マイクロ遠心チューブ(別売り)にピペットでライセートを入れる。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してからステップ3に進む。

注：使用前に Buffer RLT Plus に β-ME を添加したかを確認します (“ 実験を始める前の注意事項 ” を参照)。

表6. 細胞を直接溶解する際の Buffer RLT Plus の量

ディッシュの直径	Buffer RLT Plus の量 *
<6 cm	350 µl
6 ~ 10 cm	600 µl

* 細胞数に関係なく、ディッシュの表面を完全に覆うために表示量を添加する。

3. 細胞ライセートをステップ 3a、3b あるいは 3c に従ってホモジナイズする。

ホモジナイゼーション法の詳細に関しては、英語版 Handbook 16 ページの “ Disruption and homogenization of starting material ” を参照してください。1 x 10⁵ 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ます。ホモジナイゼーション後にステップ4に進んでください。

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 スピんカラムの目詰まりの原因になります。ローター/ステーター方式ホモジナイザー - や QIAshredder を用いたホモジナイゼーションは、シリンジと針を使った方法よりもRNAの収量が一般的に増加します。

- 3a.** 2 ml のコレクションチューブにセットした QIAshredder スピんカラムにライセートを直接ピペットで添加し、最高スピードで2分間遠心操作する。ステップ4に進む。
- 3b.** ローター/ステーター方式ホモジナイザーを用いてライセートを30秒間ホモジナイズする。ステップ4に進む。
- 3c.** ライセートを RNase フリーのシリンジに取り付けた 20-G (直径 0.9mm) の注射針中を少なくとも5回通す。ステップ4に進む。

4. ホモジナイズしたライセートを **2 ml** のコレクションチューブ (付属品) にセットした **AllPrep DNA** スピんカラムに入れる。蓋を静かに閉め、**8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **30 秒** 間遠心する。

注：遠心操作後にカラムのメンブレン上に液体が残留していないことを確認します。必要に応じて、すべての液体がメンブレンを通過するまで同様に遠心操作を繰り返します。

5. **AllPrep DNA** スピんカラムを新しい **2 ml** のコレクションチューブ (付属品) にセットし、室温 (**15 ~ 25**) に放置、あるいはステップ **14 ~ 17** の **DNA** 精製を後で行なう場合は **4** で保存する。ステップ **6 ~ 13** の **RNA** 精製にはろ過液を使用する。

注：AllPrep DNA スピんカラムを長期間室温あるいは **4** で放置しないでください。カラムを冷凍しないでください。

トータルRNA精製

6. ステップ **5** からのろ過液に同容量の **70 %** エタノール (一般的には **350 µl** または **600 µl**) を添加し、ピペットでよく混和する。遠心操作は行なわない。直ぐにステップ **7** に進む。

ホモジナイゼーションおよびAllPrep DNA スピんカラムへの結合ステップ中にライセート量が減少した場合には、その量に応じてエタノール量を調節してください。

注：ある種の細胞からのRNA調製では、エタノール添加後に沈殿物を生じることがありますが、これは本調製法に影響はありません。

7. 最大 **700 µl** のサンプル (形成した沈殿物を含む) を **2 ml** コレクションチューブ (付属品) の中にセットした **RNeasy** スピんカラムにアプライする。カラムの蓋を静かに閉めて、**8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒** 間遠心操作する。ろ過液を捨てる。*

ステップ **8** でコレクションチューブを再使用します。

サンプル量が **700 µl** 以上の場合には、残りのサンプルを続けて **RNeasy** スピんカラムにアプライし、上記の条件で遠心操作を行なってください。各遠心操作の後、ろ過液を捨てます。*

8. **700 µl** の **Buffer RW1** を **RNeasy** スピんカラムに添加する。カラムの蓋を静かに閉め、スピんカラム洗浄のために **8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒** 間遠心する。ろ過液を捨てる。*

ステップ **9** でコレクションチューブを再使用します。

注：遠心操作後、**RNeasy** スピんカラムがろ過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。コレクションチューブが完璧に空になっていることを確認します。

* Buffer RLT Plus や Buffer RW1 を含んだろ過液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

9. **RNeasy** スピнкаラムへ **Buffer RPE 500 μ l** を添加する。カラムの蓋を静かに閉め、洗浄のために **8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒間**遠心操作する。ろ過液を捨てる。

ステップ 10 でコレクションチューブを再使用します。

注： Buffer RPE は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールを Buffer RPE に添加したかを確認します（“ 実験を始める前の注意事項 ” を参照）。

10. **RNeasy** スピнкаラムに **500 μ l** の **Buffer RPE** を添加する。カラムの蓋を静かに閉め、**RNeasy** スピнкаラム・メンブレンを乾燥するため、**8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **2 分間**遠心操作する。

長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥することにより、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します。残留エタノールはダウストリーム反応を妨害する事があります。

注：遠心操作後、カラムがろ過液に触れて、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 **RNeasy** スピнкаラムを注意して取り除いてください。

11. オプション：**RNeasy** スピнкаラムを新しい **2 ml** コレクションチューブ（付属品）に移し、ろ過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**遠心操作を行う。

ステップ 10 の後 **RNeasy** スピнкаラムの外側にろ過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。

12. **RNeasy** スピнкаラムを新しい **1.5 ml** のコレクションチューブ（付属品）に移す。**RNase** フリー水 **30 ~ 50 μ l** を直接スピнкаラム・メンブレンに添加する。チューブを静かに閉め、**8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **1 分間**遠心操作を行い、**RNA** を溶出する。

13. 予想した **RNA** 量が **30 μ g** 以上の場合には、新しい **RNase** フリー水 **30 ~ 50 μ l** を用いて、あるいはステップ 12 の溶出液を用いて（高濃度の **RNA** が必要な場合）ステップ 12 を再度行なう。ステップ 12 のコレクションチューブに溶出する。

ステップ 12 の溶出液を用いた場合、**RNA** 量は 2 度 **RNase** フリー水を用いて得られる量より **15 ~ 30 %** 少なくなります。最終濃度は高くなります。

ゲノムDNA精製

14. ステップ5からのAllPrep DNAスピncラムに500 µl Buffer AW1を添加する。カラムの蓋を静かに閉めて8000 x g (10,000 rpm)で15秒間遠心操作を行ない、スピncラム・メンブレンを洗浄する。ろ過液を捨てる。*

ステップ15でスピncラムを再使用します。

注：Buffer AW1は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW2に添加したかを確認します（“実験を始める前の注意事項”を参照）。

15. 500 µlのBuffer AW2をAllPrep DNAスピncラムに添加する。カラムの蓋を静かに閉めて、最高速度で2分間遠心操作し、スピncラム・メンブレンを洗浄する。

注：Buffer AW2は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW2に添加したかを確認します（“実験を始める前の注意事項”を参照）。

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

注：遠心操作後、コレクションチューブからAllPrep DNAスピncラムを注意して取り除いてください。カラムがろ過液と接触した場合には、コレクションチューブを空にしてスピncラムを最高速度で1分間、再度遠心操作します。

16. AllPrep DNAスピncラムを新しい1.5 mlのコレクションチューブ(付属品)に移す。Buffer EB 100 µlを直接スピncラム・メンブレンに添加し、カラムを静かに閉る。室温(15 ~ 25 °C)で1分間インキュベートし、8000 x g(10,000 rpm)以上で1分間遠心操作を行ない、DNAを溶出する。

17. ステップ16を繰り返し、さらにDNAを溶出する。

最初のDNA溶出液の希釈を防ぐには、新しい1.5 mlのコレクションチューブ(非付属品)を用いて2回目のDNA溶出液を回収します。1回目と2回目のDNA溶出液を一緒にする際には、ステップ16で用いてコレクションチューブを再利用します。

注：より高濃度のDNAを得るためには50 µlのBuffer EBで2回溶出します。この場合には最終DNA収量は低下します。

* Buffer RLT PlusやBuffer RW1を含んだろ過液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版Handbook 6ページをご覧ください。

プロトコール：動物組織からのゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製

スタート・サンプル量の正確な測定

最適な核酸の収量および純度を得るためには、正しいスタートサンプル量を使用することが重要です。一般的には、最高30 mgの新鮮、あるいは凍結した組織、またはRNA_{later}で安定化した組織15 ~ 20 mg（一部脱水されている）を調製できます。AllPrep DNA スピнкаラムのDNA結合容量、RNeasy スピнкаラムのRNA結合容量、Buffer RLT Plusの溶解容量は、ほとんどの組織では上限の重量まで処理できます。しかし、より少量のサンプルの方が効率良くDNAを除去できます。様々な組織からのRNA収量をTable 2に掲載しています（英語版 Handbook 14ページ）。

肝臓から最大のRNA収量を得るためには、このプロトコールのステップ5において70%エタノールの代わりに50%エタノールを使用します。

脾臓、胸腺のような組織は非常に多量のDNAを含んでいるため、AllPrep DNA スピнкаラムがオーバーロードになります（スタートサンプルとして5 mg以上の組織を使用した場合）。微量のDNAでも障害となる高感度なダウンストリームに溶出したRNAを使用する場合には、これらの組織ではRNeasy スピнкаラム・メンブレン上でDNase分解を行なうことを推奨します（詳細は英語版 Handbook 47ページ、Appendix Eを参照）。

骨格筋、心臓、皮膚のような繊維性組織からのRNA精製は、収縮性のタンパク質、結合組織、コラーゲンが豊富なため、RNA収量が低いことがあります。これらの組織からゲノムDNAおよびトータルRNAを精製するには、DNeasy Tissue KitとRNeasy Fibrous Tissue Kitのご利用を推奨します（英語版 Handbook 50ページのordering information参照）。

お客様のスタートサンプルの特性に関する情報がない場合には、10 mg以上の組織を使用しないことを推奨します。RNAの収量や純度によっては、調製に30 mgまでの組織を使用することも可能です。

RNAと共にDNAが精製される原因となるため、AllPrep DNA スピнкаラムにオーバーロードしないでください。RNAの収量および純度が顕著に低下するため、RNeasy スピнкаラムをオーバーロードしないでください。

実験を始める前の重要事項

- AllPrep DNA/RNA 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。
- 初めてRNAを調製する場合にはAppendix A (英語版 Handbook 38 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RNA^{later} RNA Stabilization Reagent 中で即座に安定化します (RNA^{later}のハンドブックを参照)。試薬中の組織は37 °C で最高1日、18 ~ 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RNA^{later}で安定化した組織を使用できます。液体窒素で瞬間凍結した組織は即座に-70 °C に移し、数カ月保存可能です。重量測定あるいはBuffer RLT Plus 中で破砕前のサンプル取り扱いの際に、凍結した組織を融解させないでください。ステップ3でのホモジナイズされた組織ライセートも-70 °C で数カ月保存できます。ステップ4を行なう前に、凍結したライセートは37 °C の水浴中で完全に融解し、塩類が溶解するまでインキュベートします。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。
- 必要に応じて、30 mg 以上の組織を調製開始時に破砕し、ホモジネートすることも可能です (組織量に合わせてBuffer RLT Plus 量も増加)。30 mg 以下に相当するホモジネート溶液をRNA精製用に一部使用し、残りを-80 °C で保存できます。
- 使用前にβ-メルカプトエタノール (β-ME) をBuffer RLT Plus に添加しなければなりません (1 ml Buffer RLT Plus 当たり 10 μl β-ME)。適切な保護着を着用し、ドラフト内で調製してください。β-MEを添加した後、Buffer RLT Plus は室温 (15 ~ 25 °C) で1ヶ月間安定です。
- Buffer RPE、Buffer AW1、Buffer AW2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。
- 保存中にBuffer RLT Plus は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、室温にして使用します。
- Buffer RLT Plus、Buffer RW1、Buffer AW1 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 に関しては英語版 Handbook 6 ページを参照ください。
- この実験の全てのステップは室温で行なってください。実験中は迅速に作業してください。
- 全ての遠心ステップは一般的なマイクロ遠心機を用いて20 ~ 25 °C で行なってください。遠心機が20 °C 以下に冷却されていないことを確認します。

操作手順

サンプルの破碎およびホモジナイゼーション

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。**RNAlater**で安定化した組織をピンセットを用いて溶液から取り出す。使用する組織量を決定する。使用する組織は**30 mg**以下とする。

組織サンプルの重量の測定が、組織量を決定する最も正確な方法です。

2. ステップ**2a**あるいはステップ**2b**に進む。

2a. **RNAlater**で安定化された組織：

組織全部を使用する場合には、組織を破碎とホモジナイゼーションのために適切なサイズの容器に移しステップ**3**に進む。

組織の一部だけを用いる場合には、清潔な台上でカットする。用いる組織片の重量を測定し、これをホモジナイゼーションのために適切なサイズの容器に入れ、ステップ**3**に続く。

RNAlaterで処理した組織内のRNAは、室温（18 ~ 25 °C）でカットしたり、重量測定している間保護されています。従って組織を氷上やドライアイス、低温室でカットする必要はありません。残った組織は**RNAlater RNA Stabilization Reagent**に入れて保存、既に安定化されている組織は溶液無しでそのまま-80 °Cで保存できます。

2b. 安定化されていない採取したばかりの組織あるいは凍結組織：

組織全部を使用する場合には、組織を破碎とホモジナイゼーションのために適切なサイズの容器に移しステップ**3**に進む。

組織の一部だけを用いる場合には、用いる組織片の重量を測定し、これを破碎とホモジナイゼーションのために適切なサイズの容器に入れ、即座にステップ**3**に続く。

組織を**RNAlater Reagent**処理するか、瞬間凍結、あるいはステップ**3**で破碎とホモジナイゼーションを行なうまでは、採取した組織中のRNAは保護されていません。凍結組織を取り扱い中に融解させないように、凍結組織を取り扱う操作はできるだけ迅速に行なってください。

注：残った新鮮な組織は**RNAlater Reagent**に入れRNAを安定化することができます（**RNAlater Handbook**を参照）。しかし、既に凍結した組織ではこの試薬内での融解がゆっくりすぎるため、試薬の組織への浸潤が迅速に行なわれず、RNA分解を十分に防止することができません。

3. **3a**、**3b**、**3c**あるいは**3d**に従って組織を破碎し、**Buffer RLT Plus**（組織は**30 mg**以下を使用）中でライセートをホモジナイズする。

破碎およびホモジナイゼーションに関する詳細は英語版 **Handbook** 16 ページの “ **Disrupting and homogenizing starting material** ” を参照ください。

注：使用前に **Buffer RLT Plus** に **-ME** を添加したかを確認します（“ **実験を始める前の注意事項** ” を参照）。

RNA^{later} Reagent 中で保存した組織は、新鮮 / 凍結組織より多少固くなっていることがあります。一般的な破碎 / ホモジナイゼーション方法を用いて問題なく処理できます。600 µl の Buffer RLT Plus を用いるとより簡単に破碎およびホモジナイゼーションが行なえます。

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、AllPrep DNA や RNeasy スピンカラムの目詰まりの原因になります。TissueLyser あるいはローター / ステーター方式ホモジナイザーを用いたホモジナイゼーションのほうが他の方法より RNA 収量が一般的に増加します。

表7. 組織破碎およびホモジナイゼーションに必要な Buffer RLT Plus 量

スタートサンプルの重量	Buffer RLT Plus 量
<20 mg	350 µl あるいは 600 µl*
20 ~ 30 mg	600 µl

* RNA^{later} Reagent 中で安定化した組織や溶解しにくい組織には 600 µl の Buffer RLT Plus を用います。

3a. ローター / ステーター方式ホモジナイザーを用いた破碎およびホモジナイゼーション：

重量を測定した組織（新鮮、凍結、RNA^{later} で安定化した）を適切な大きさの容器に入れ、対応する量の Buffer RLT Plus を添加する（表7参照）。即座にローター / ステーター方式ホモジナイザーを用いてライセートが均一になるまで組織を破碎、ホモジナイズする（通常 20 ~ 40 秒）。ステップ4に進む。

3b. 乳鉢と乳棒を用いて破碎した後に QIAshredder ホモジナイザーでホモジナイゼーション：

重量を測定した組織（新鮮、凍結、あるいは RNA^{later} で安定化した組織）を即座に液体窒素に入れ、乳鉢と乳棒を用いて完全にすり碎く。組織粉末および液体窒素を液体窒素で冷却した RNase フリーの 2 ml マイクロ遠心チューブ（非付属品）に入れる。液体窒素は蒸発させるが、組織が融解しないようにする。

適切な量の Buffer RLT Plus を添加する（表7参照）。ライセートを 2 ml のコレクションチューブにセットした QIAshredder スピンカラムに直接ピペットで添加し、最高スピードで 2 分間遠心操作する。ステップ4に進む。

3c. 乳鉢と乳棒を用いて破碎した後に注射針とシリンジを用いてホモジナイゼーション：

重量を測定した組織（新鮮、凍結、あるいは RNA^{later} で安定化した組織）を即座に液体窒素中に入れ、乳鉢と乳棒を用いて完全にすり碎く。組織粉末および液体窒素を液体窒素で冷却した RNase フリーの 2 ml マイクロ遠心チューブ（非付属品）に入れる。液体窒素は蒸発させるが、組織が融解しないようにする。

適切な量の Buffer RLT Plus を添加し（表7参照）、ライセートを RNase フリーのシリンジに取り付けた 20-G の注射針中を少なくとも 5 回通してホモジナイズする。ステップ4に進む。

3d. TissueLyser を用いた破碎およびホモジナイゼーション：

TissueLyser Handbook を参照する。ステップ4に進む。

4. ライセートを最高速度で3分間遠心する。ピペットで注意深く上清を採取し、**2 ml**のコレクションチューブ（付属品）にセットした**AllPrep DNA** スピんカラムに入れる。**8000 x g (10,000 rpm)** 以上で**30**秒間遠心する。

3分間の遠心操作後に微量の不溶物質が存在するために、ペレットが見えないサンプルもあります。

注：遠心操作後にカラムのメンブレン上に液体が残留していないことを確認します。必要に応じて、すべての液体がメンブレンを通過するまで同様に遠心操作を繰り返します。

5. **AllPrep DNA** スピんカラムを新しい**2 ml**のコレクションチューブ（付属品）にセットし、室温（**15 ~ 25**）に放置、あるいはステップ**14 ~ 17**の**DNA**精製を後で行なう場合は**4** で保存する。ステップ**6 ~ 13**の**RNA**精製にはろ過液を使用する。

注：AllPrep DNA スピんカラムを長期間室温あるいは**4** で放置しないでください。カラムを冷凍しないでください。

トータルRNA精製

6. ステップ5のろ過液に等量の**70 %**エタノール（通常**350 μ l**または**600 μ l**）を添加し、ピペットでよく混和する。遠心操作は行なわない。直ぐにステップ**7**に進む。

ホモジナイゼーションおよびDNA除去中にライセート量が減少した場合には、その量に応じてエタノール量を調節してください。

注：エタノール添加後に沈殿物を生じることがありますが、これは本調製法に影響はありません。

注：肝臓から最大限のRNA収量を得るには、**70 %**エタノールの代わりに**50 %**エタノールを使用します。

7. 最大**700 μ l**のサンプル（形成した沈殿物を含む）を**2 ml**コレクションチューブ（付属品）の中にセットした**RNeasy** スピんカラムにアプライする。カラムの蓋を静かに閉めて、**8000 x g (10,000 rpm)** 以上で**15**秒間遠心操作する。ろ過液を捨てる。*

ステップ8でコレクションチューブを再使用します。

サンプル量が**700 μ l**以上の場合には、残りのサンプルを続けて**RNeasy** スピんカラムにアプライし、上記の条件で遠心操作を行なってください。各遠心操作の後、ろ過液を捨てます。*

* Buffer RLT Plus や Buffer RW1 を含んだろ過液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

8. **700 µl**の **Buffer RW1** を **RNeasy** スピカラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピカラム洗浄のために **8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15** 秒間遠心する。ろ過液を捨てる。*

ステップ9でコレクションチューブを再使用します。

注：遠心操作後、RNeasy スピカラムがろ過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。コレクションチューブが完璧に空になっていることを確認します。

オプション：DNA含有量の高い組織からRNAを精製する場合や感度の高いダウストリーム・アプリケーションにRNAを使用する場合には、ステップ8の代わりにDNase分解をステップE1-E4（英語版Handbook 48ページ、Appendix E）に従って行なうことを推奨します。

9. **RNeasy** スピカラムへ **Buffer RPE 500 µl** を添加する。カラムの蓋を静かに閉め、洗浄のために **8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15** 秒間遠心操作する。ろ過液を捨てる。

ステップ10でコレクションチューブを再使用します。

注：Buffer RPEは濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer RPEに添加したかを確認します（“実験を始める前の注意事項”を参照）。

10. **RNeasy** スピカラムに **500 µl** の **Buffer RPE** を添加する。チューブを静かに閉め、**RNeasy** スピカラム・メンブレンを乾燥するため、**8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **2** 分間遠心操作する。

長時間の遠心操作でスピカラム・メンブレンを乾燥することにより、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します。残留エタノールはダウストリーム反応を妨害する事があります。

注：遠心操作後、カラムがろ過液に触れて、その結果エタノールのキャリア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RNeasyスピカラムを注意して取り除いてください。

11. オプション：**RNeasy** スピカラムを新しい **2 ml** コレクションチューブ（付属品）に移し、ろ過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** 分間遠心操作を行なう。

ステップ10の後RNeasyスピカラムの外側にろ過液が残っている場合は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。

12. **RNeasy** スピカラムを新しい **1.5 ml** のコレクションチューブ（付属品）に移す。**RNase** フリー水 **30 ~ 50 µl** を直接スピカラム・メンブレンに添加する。カラムの蓋を静かに閉め、**8000 x g (10,000 rpm)** 以上で **1** 分間遠心操作を行い、**RNA** を溶出する。

* Buffer RLT PlusやBuffer RW1を含んだろ過液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版Handbook 6ページをご覧ください。

13. 予想したRNA量が30 µg以上の場合には、新しいRNaseフリー水30 ~ 50 µlを用いて、あるいはステップ12での溶出液を用いて（高濃度のRNAが必要な場合）ステップ12を再度行なう。ステップ12のコレクションチューブに溶出。
ステップ12の溶出液を用いた場合、RNA量はRNaseフリー水を2回用いて得られる量より15 ~ 30%少なくなります、最終濃度は高くなります。

ゲノムDNA精製

14. ステップ5からのAllPrep DNAスピнкаラムに500 µl Buffer AW1を添加する。カラムの蓋を静かに閉めて8000 x g (10,000 rpm)で15秒間遠心操作を行ない、スピнкаラム・メンブレンを洗浄する。ろ過液を捨てる。*

ステップ15でスピнкаラムを再使用します。

注：Buffer AW1は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW1に添加したかを確認します（“実験を始める前の注意事項”を参照）。

15. 500 µlのBuffer AW2をAllPrep DNAスピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、最高速度で2分間遠心操作し、スピнкаラム・メンブレンを洗浄する。

注：Buffer AW2は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW2に添加したかを確認します（“実験を始める前の注意事項”を参照）。

長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥することにより、DNA溶出中にエタノールがキャリーオーバーしないようにします。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、コレクションチューブからAllPrep DNAスピнкаラムを注意して取り除いてください。カラムがろ過液と接触した場合には、コレクションチューブを空にしてスピнкаラムを最高速度で1分間、再度遠心操作します。

16. AllPrep DNAスピнкаラムを新しい1.5 mlのコレクションチューブ（付属品）に移す。Buffer EB 100 µlを直接スピнкаラム・メンブレンに添加し、カラムの蓋を静かに閉る。室温（15 ~ 25 °C）で1分間インキュベートし、8000 x g (10,000 rpm)以上で1分間遠心操作を行ない、DNAを溶出する。

17. ステップ16を繰り返し、さらにDNAを溶出する。

最初のDNA溶出液の希釈を防ぐには、新しい1.5 mlのコレクションチューブ（非付属品）を用いて2回目のDNA溶出液を回収します。1回目と2回目のDNA溶出液を一緒にする際には、ステップ16で用いたコレクションチューブを再利用します。

注：より高濃度のDNAを得るためには50 µlのBuffer EBで2回溶出します。この場合には最終DNA収量は低下します。

* Buffer RW1を含んだろ過液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版Handbook 6ページをご覧ください。

トラブルシューティングガイド

コメント

AllPrep DNAあるいはRNeasy スピнкаラムが目詰まり

- a) 破砕、ホモジナイゼーションが不十分 破砕およびホモジナイゼーション法の詳細は“Disrupting and homogenizing starting material”(英語版 Handbook16ページ)を参照する。
必要に応じて遠心速度および遠心時間を増加する。
次回の調製ではスタート・サンプル量を減らす(2および9ページ、プロトコール参照)。またはホモジナイゼーション時間を延長する。
- 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。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12ページ参照)。
- c) 遠心操作時の温度が低すぎる 遠心温度は20~25とする。20に設定しても遠心時に20以下になる遠心機もある。これがスピнкаラムの目詰りをおこす沈殿物を形成する原因となる。低温になった場合には遠心機を25に設定する。AllPrep DNAスピнкаラムにライセートを入れる前に、37でライセート温める。

核酸収量が低い

- a) 破砕、ホモジナイゼーションが不十分 破砕およびホモジナイゼーション法の詳細は“Disrupting and homogenizing starting material”(英語版 Handbook16ページ)を参照する。
次回の調製ではスタート・サンプル量を減らす(2および9ページ、プロトコール参照)。または溶解バッファを増やしホモジナイゼーション時間を延長する。
- b) スタート・サンプル量が多すぎる スピнкаラムへのオーバーロードは核酸収量を顕著に低下する。スタート・サンプル量を減らす(英語版 Handbookの12ページ参照)。
- c) RNAがRNeasyスピнкаラムにまだ結合 RNA溶出を再度行なうが、RNaseフリー水をRNeasyスピнкаラムに入れ、遠心操作前に実験台上で10分間インキュベートする。

コメント

- d) DNAがAllPrep DNA スピнкаラムにまだ結合している
DNA 溶出を再度行なうが、遠心操作前に Buffer EB を AllPrep DNA スピнкаラムに入れて実験台上で 10 分間インキュベートする。
または、DNA 溶出前に Buffer EB を 70 °C に加熱する。
- e) エタノールがキャリーオーバー
Buffer RPE で二回目の洗浄を行なう際に、RNeasy スピнкаラム・メンブレンが乾燥するように 8000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間 (20 ~ 25 秒) 必ず遠心する。
カラムの外側にろ過液が付着している場合には、必ずオプションの遠心操作を行ない、RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥させる (プロトコールのステップ 11)。
- f) 細胞培養液の除去が不完全 (細胞サンプルの場合)
培養細胞を調製する際は、細胞回収後に培養液を完全に除去する (2 ページ、プロトコール参照)。

DNA に RNA が混入している

- a) AllPrep DNA スピнкаラムに入れたライセートがエタノールを含む
AllPrep DNA スピнкаラムを通過させた後にライセートにエタノールを添加する
- b) サンプルがホモジネート溶液の pH に影響
最終的なホモジネート溶液の pH は 7 であるべきである。サンプルが極端にアルカリあるいは酸性でないことを確認する。

DNA を混入する RNA がダウンストリーム実験に影響する

- a) 細胞数が多すぎる
ある種の細胞タイプでは、処理する細胞数が多すぎると AllPrep DNA スピнкаラムへの DNA 結合効率が低下することがある。溶出した RNA に DNA が混入している場合には、細胞数を減らして調製してみる。
- b) 細胞培養液あるいは安定化試薬の除去が不完全
細胞培養液あるいは安定化試薬が完全に除去され、溶解バッファーが希釈されていないことを確認する。溶解バッファーが希釈されると AllPrep DNA スピнкаラムは効果的に DNA を結合しない。
- c) 組織が多量 DNA を含む
DNA 含量の非常に高いある種の組織 (例えば脾臓) では DNA が AllPrep DNA スピнкаラムを通過することがある。サンプル量を減らして再度行なう。あるいは、RNeasy スピнкаラム・メンブレン上で DNase 分解を行なう (英語版 Handbook 47 ページ、Appendix E 参照) あるいは溶出した RNA の DNase 分解後、続いて RNA クリーンアップする。

RNA 溶出液の A_{260}/A_{280} 値が低い

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 40 ページ、Appendix B 参照)。

RNA が分解

a) スタート・サンプルの不適切な取り扱い

組織サンプルが適切に安定化され、RNA/ater RNA Stabilization Reagent 中で保存されたかを確認する。

凍結細胞ペレットあるいは凍結組織サンプルは、液体窒素中で瞬間凍結し、 -70°C で保存する。AllPrep DNA/RNA 操作は迅速に行なう (特に最初の数ステップは重要)。

英語版 Handbook 38 ページ、Appendix A あるいは英語版 Handbook 16 ページの “ Handling and storing starting material ” を参照する。

b) RNase の混入

全ての AllPrep バッファは試験済みで RNase フリーである事が保証されているが、RNase は使用中に混入することがある。AllPrep DNA/RNA での操作および後の取り扱いの際に 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事項は英語版 Handbook 38 ページ、Appendix A を参照する。

DNA の切断化

ホモジナイゼーション条件が激しすぎる

精製 DNA の長さ (一般的には 15 ~ 30 kb) はホモジナイゼーション条件に依存する。より長い DNA フラグメントが必要な際は、できる限りホモジナイゼーション時間を短くし、緩和な条件を使用する (例 ; ローター・スターター・ホモジナイザーの代わりに QIAshredder ホモジナイザーを使用)。

核酸濃度が低すぎる

溶出量が多すぎた

より少量で核酸を溶出する。AllPrep DNA スピンカラムでは 50 μl の Buffer EB、RNeasy スピンカラムでは 1 \times 30 μl 以下の水は使用しないこと。より少量で溶出すると核酸濃度は増加するが、収量は低下することがある。

化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当する MSDS (material safty data sheet) をご覧ください。

コメント

精製した核酸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
- バッファは必ず 20 ~ 30 使用する。
操作中の各ステップで正しいバッファを使用したことを確認する。
洗浄ステップ中にコレクションチューブを再利用する際は、きれいなペーパータオル上でチューブを叩き、チューブの縁に付着した残りのろ過液を除去する。
- b) エタノールのキャリア
オーバー
- Buffer RPE による二回目の洗浄では、8000 x g (10,000 rpm) 以上で2分間 (20 ~ 25) 遠心操作し、必ず RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥させる。遠心操作後、カラムがろ過液に接触しないようにコレクションチューブからカラムを注意深く取り除き、エタノールのキャリアオーバーを防止する。
カラムの外側にろ過液が付着している場合には、必ずオプションの遠心操作を行ない、RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥させる (プロトコールのステップ11)。

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