

October 2002

マイクロダイセクション用特別プロトコール

マイクロダイセクションにより採取した 組織サンプルから RNeasy[®] Mini Kit を用いた RNA 分離

本プロトコールは RNeasy Mini Kit あるいは RNeasy Protect Mini Kit を用いてマイクロダイセクションにより採取した組織サンプルから RNA を分離するためにデザインされました。

RNeasy Mini ハンドブック（日本語版）に掲載されている、“動物組織からのトータル RNA 分離用 RNeasy Mini プロトコール” を実験を始める前によくお読みください。

イントロダクション

レーザーマイクロダイセクションにより採取したサンプルからの核酸精製は、サンプル量が微量であるために分子生物学的な解析が非常に困難です。さらに、固定ステップや染色ステップにより RNA が分解していないという保証はなく、これらの問題を最小限に抑えるために、固定プロトコルを改良、あるいは瞬間凍結したサンプルから凍結切片を使用する必要性が生じます。

Leica では切片作製、染色、マイクロダイセクションのための様々な装置および消耗品を提供しています (www.leica-microsystems.com)。

RNeasy システムを用いて高純度な RNA を効率的に回収できます。凍結切片およびホルマリン固定組織からの（後者では Proteinase K による追加分解を推奨）RNA 分離に RNeasy システムを使用するためのガイドラインを記載します。

実験を始める前の重要事項

- RNA 分解を最小限に抑えるために、固定あるいは RNA/ater[®] RNA Stabilization Reagent* による RNA 安定化、液体窒素による瞬間凍結の前にサンプルを室温で長時間保存することを避けます。
- * 組織学研究のために RNA/ater 中に保存された組織の調製用改良プロトコルは弊社テクニカルサポートから入手できますので、お問い合わせください。

プロトコール：マイクロダイセクションにより採取した凍結切片からの RNA 分離

1. 適当量の Buffer RLT の中に直接サンプルを採取する（容量はマイクロダイセクションに使用した採取容器によるが、350 μ l 以下にする）。
2. 必要があれば、サンプルと Buffer RLT をより大きな容量の容器に移す（例えば 1.5 ml あるいは 2.0 ml のマイクロ遠心チューブ）。
3. Buffer RLT で最終容量が 350 μ l になるようにサンプルを調整する。
4. サンプルを 30 秒間ボルテックスする。

この後のホモジナイゼーション・ステップは必要ありません。

注：細胞ライセートを RNeasy スピнкаラム・メンブレンにロードする前に、ライセートにキャリア RNA を 20 ng 添加することを推奨します。キャリア RNA は細胞中の RNA と共に精製されるため、キャリア RNA が RT-PCR のようなダウンストリーム解析に影響しないことを確認してください。tRNA および 200 nt 未満の RNA 以外はほとんど全てキャリア RNA として使用できます。これらの小さい RNA は RNeasy メンブレンに結合しません。キャリアとして poly(C) の使用を推奨します（例；Amersham Biosciences, cat. no. 27-4220-02）。

5. 日本語版 RNeasy Mini ハンドブックに掲載されている“動物組織からのトータル RNA 分離用 RNeasy Mini プロトコール”のステップ 6 から続ける。
6. 30 μ l の RNase フリー水で RNA を溶出する。

さらに高濃度の RNA を得るためには、最初の溶出液を RNeasy カラムに再びアプライし、2 回目の溶出ステップを行なう。

注：この調製法で分離した RNA を用いて RT-PCR を行なう場合には、少量の RNA (50 ng 以下) での高感度な逆転写反応用に特別にデザインされた QIAGEN Sensiscript® RT を使用することを推奨します。リアルタイム定量 RT-PCR には、QIAGEN QuantiTect® RT-PCR Kit を推奨します。

Trademarks: QIAGEN®, RNeasy®, Sensiscript®, QuantiTect® (QIAGEN Group).

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

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。

また、製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更する場合がございます。予めご了承ください。

最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては www.qiagen.com の "Trademarks and Disclaimers" をご覧ください。
QIAGEN キットの Handbook および User Manual は www.qiagen.com から入手可能です。

© 2016 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.com

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