

QIAamp[®] RNA Blood Mini プロトコールとトラブルシューティング

全血からのトータルRNA精製用

目次	ページ
プロトコール	
ヒト全血からのトータル細胞RNA精製	2
組織からのトータルRNA精製	6
培養細胞からのトータルRNA精製	10
RNAクリーンアップ	14
トラブルシューティング	16



プロトコール：ヒト全血からのトータル細胞RNA精製

実験を始める前の注意事項

- QIAamp RNA Blood Mini Kitを初めてお使いになる方は、英語版 Handbookの“Important Notes”（11 ページ）をまずお読みください。
- RNAを初めて取り扱う方は、英語版 Handbookの“General Remarks for Handling RNA”（Appendix A、35 ページ）をまずお読みください。
- ヒトからの臨床検体は全て感染の疑いがありますので、血液や体液を扱う場合は十分に注意して適切な処理を行なってください。
- 本キットで調製可能なヒト全血の最大量（1.5 ml）は健康な成人の血液（1 μ l 当たり 4,000～7,000 個の白血球）により決定しました。白血球数がより多い血液を使用する場合には、使用量を減らしてください。このQIAamp スピニングカラムでは最高 1×10^7 個の白血球を調製可能です。
- 赤血球溶解後は本プロトコールの全てのステップをできるだけ迅速に室温（15～25℃）で行なってください。
- 細胞ライセート（Buffer RLT 中）は-70℃で数ヶ月保存可能です。凍結ライセートの調製は、すべての塩類が完全に溶解するまで37℃でインキュベートできます。RNA分解の原因になるので長時間のインキュベートは避けてください。ステップ7に進んでください。凍結した白血球ペレット（Buffer RLTを無添加の状態）の使用はお薦めしません。
- 凍結した全血は使用できません。

実験を始める前の準備

- Buffer RPEは濃縮状態でお届けします。使用前に4倍量のエタノール（96～100%）を添加してから使用してください。
- Buffer RLTは保存中に沈澱を形成することがあります。もし必要な場合には加温溶解してください。
- 使用前に β -メルカプトエタノール（ β -ME）を必ずBuffer RLTに添加してください。添加量はBuffer RLT 1 mlに対して β -ME 10 μ lです。Buffer RLTは β -ME添加後、室温（15～25℃）で1ヶ月安定です。
- カラム上でDNase分解を行なう場合には、Appendix Dの記載（英語版 Handbook 41 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. **ヒト全血 1 容量と Buffer EL 5 容量を適当な大きさのチューブ（別途準備）中でミックスする。**

最適な結果を得るためには、十分にミックスできる様に、血液と Buffer EL の全容量がチューブ容量の 3/4 を超えないようなチューブを使用してください。例；全血 1 ml に Buffer EL 5 ml を添加する場合には、8 ml 以上の容量のチューブ中で混和します。

注：全血は最適な量を使用してください。健康な成人の血液（1 μ l 当たり 4,000 ~ 7,000 個の白血球）の 1.5 ml までが本キットで調製可能です。白血球数がより多い血液を使用する場合には、血液量を減らしてください（その場合には、ステップ 6 での Buffer RL1 の量も調節してください）。

2. **氷上で 10 ~ 15 分間インキュベートする。インキュベーション中に 2 回ボルテックスする。**

赤血球の溶解につれて、インキュベーション中に混濁した懸濁液が透明になってきます。必要な場合には、インキュベーション時間を 20 分に延長してください。

3. **4°C、400 x g で 10 分間遠心分離後、上清を完全に除去する。**

遠心分離後白血球はペレットを形成します。上清を完全に除去したことを確認してください。赤血球の痕跡によりペレットが赤味を帯びている場合も、続いて行なう洗浄ステップにより、赤血球は通常除去されます。大量の赤血球が残留している場合には、16 ページのトラブルシューティングを参照してください。

4. **細胞ペレットに Buffer EL を添加し（ステップ 1 で使用した全血量に対して Buffer EL は 2 容量を使用）、軽くボルテックスし、細胞を懸濁する。**

例；ステップ 1 で用いた全血 1 ml に対して Buffer EL 2 ml を添加します。

5. **4°C、400 x g で 10 分間遠心分離後、上清を完全に除去する。**

注：上清の除去が完全でない場合、溶解および続く RNA の QIAamp スピンカラムへの RNA 結合が妨げられ、収量の低下に繋がります。

6. 以下の表に従って白血球ペレットに **Buffer RLT** を添加する。ピペッティングあるいはボルテックスで混和する。

健康な血液を使用しない場合は、白血球数を確認し、必要な Buffer RLT 量を決定してください。Buffer RLT は細胞を破壊します。ホモジナイズステップを行なう前に、細胞塊が観察される場合は、さらにピペッティングあるいはボルテックスで混和してください。

Buffer RLT* (µl)	健康な全血 (ml)	白血球数
350	0.5 まで	2×10^6 まで
600	0.5 ~ 1.5	$2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$

* β-メルカプトエタノール (β-ME) が Buffer RLT に添加されていることを確認する (実験を始める前の準備事項参照)。

7. 2 ml コレクションチューブ (添付) に設置した **QIAshredder** スピンカラムにライセートをピペットで移し、ホモジナイズするために最高速度で 2 分間遠心分離する。QIAshredder スピンカラムは除去し、ホモジナイズしたライセートを保存する。

エアゾール形成を避けるために、1 回で QIAshredder スピンカラムにライセートを添加できるように 750 µl 以上にピペットを合わせてください。

使用した細胞数が多すぎた場合、ホモジナイズ後にライセートの粘度が高くなりピペッティングが困難になります。このような場合には、16 ページのトラブルシューティングを参照してください。

8. ホモジナイズしたライセートに **70% エタノール** を 1 容量 (**350 µl** または **600 µl**) 添加し、ピペッティングで混和する。遠心操作は行なわない。

エタノール添加後に沈澱物が形成されることがありますが、QIAamp 調製には影響しません。

9. 沈澱物も含めた全てのサンプルをカラムの縁を濡らさないように注意して 2 ml コレクションチューブ (添付) 中の **QIAamp** スピンカラムにピペットで注入する。**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で 15 秒間遠心分離する。注入できる最大量は **700 µl** なので、それ以上の場合には、**QIAamp** スピンカラムに分注し、上記のように遠心分離を行なう。

ろ液* およびコレクションチューブは捨ててください。

オプション: オプションでカラム上の DNase 分解 (英語版 Handbook 41 ページ “DNase treatment” 参照) を行なう場合には、このステップ後に D1 ~ D4 (英語版 Handbook 42 ページ) 行ないます。

10. **QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml コレクションチューブ（添付）に移す。700 μ l の Buffer RW1 を QIAamp スピンカラムに注入し、洗浄のために 8,000 x g（10,000 rpm）以上で 15 秒間遠心分離する。**

ろ液 * およびコレクションチューブは捨ててください。

11. **QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml コレクションチューブ（添付）に移す。500 μ l の Buffer RPE を QIAamp スピンカラムに注入し、8,000 x g（10,000 rpm）以上で 15 秒間遠心分離する。**

ろ液 * およびコレクションチューブは捨ててください。

注： Buffer RPE にエタノールを添加したことを確認してください（実験を始める前の準備を参照）。

12. **注意深く QIAamp スピンカラムの蓋を開けて 500 μ l の Buffer RPE を添加する。蓋を閉め、最高速度（20,000 x g、14,000 rpm）で 3 分間遠心分離する。**

注：ローターによっては減速時に振動が起り、Buffer RPE を含むろ液が QIAamp スピンカラムに接触してしまふことがあります。QIAamp スピンカラムおよびコレクションチューブをローターから取り出す際にも、ろ液と接触することがありますのでご注意ください。

13. **推奨： QIAamp スピンカラムを新しい 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は捨てる。最高速度で 1 分間遠心分離を行なう。**

このステップにより Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除することができます。

14. **QIAamp スピンカラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブ（添付）に移し、QIAamp メンブレンに RNase フリーの水（添付）30 ~ 50 μ l を直接ピペットで添加する。溶出のために、8,000 x g（10,000 rpm）以上で 1 分間遠心分離する。0.5 ml 以上の全血（あるいは 2×10^6 個以上の白血球）を調製した場合には本ステップを繰り返す。**

* Buffer RLT や 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 は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

プロトコール：組織からのトータルRNA精製

実験を始める前の注意事項

- 適切な組織量を用いてください（英語版 Handbook 13 ページ参照）。
- QIAamp RNA Blood Mini Kit を初めて使用する方は、英語版 Handbook 11 ページの “Important Notes” をお読みください。
- RNA を初めて取り扱う方は、“General Remarks for Handling RNA”（英語版 Handbook 35 ページ、Appendix A）をまずお読みください。
- 心臓、脾臓および脳等の組織ではホモジナイズが困難です。溶解バッファ一量の増加によりホモジナイズを促進し、収量の減少を避けることもできます。容量に関してはプロトコールを参照してください。
- 最適な結果を得るためには、組織を RNAlater® RNA Stabilization Reagent 中で即座に安定化します。RNAlater TissueProtect Tube で組織は 37℃ で最高 1 日、18～25℃ で 7 日間、2～8℃ で 4 週間、-20℃ あるいは -80℃ で長期の保管が可能です。RNAlater RNA Stabilization Reagent あるいは組織中の RNA 安定化に関する詳細は英語版 RNAlater Handbook をご覧ください。
- 新鮮な組織、凍結組織、RNAlater で安定化した組織が使用できます。長期保存のための組織凍結法は、液体窒素 * 中で急速凍結した後直ぐに -70℃ に移します。組織は数ヶ月安定です。Buffer RLT による破壊以前に凍結組織が解凍しないように（例えば重量測定中）注意してください。ホモジナイズした組織ライセート（Buffer RLT 中、ステップ 1）は -70℃ で数カ月間保存可能です。凍結組織を処理するには、室温（15～25℃）あるいは 37℃ の水浴中でライセートが完全に解凍し、溶解バッファ中の塩類が溶解するまでインキュベーションしてください。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 2 に進みます。
- 本プロトコールの全てのステップ（遠心分離も含む）はできるだけ迅速に、かつ室温（15～25℃）で行なってください。

実験を始める前の準備事項

- Buffer RLT は保存中に沈澱を形成することがあります。もし必要な場合には加温溶解してください。
- 使用前に β-メルカプトエタノール（β-ME）を必ず Buffer RLT に添加してください。添加量は Buffer RLT 1 ml に対して β-ME 10 μl です。Buffer RLT は β-ME 添加後室温（15～25℃）で 1 ヶ月安定です。
- Buffer RPE は濃縮状態でお届けします。使用前に 4 倍量のエタノール（96～100%）を添加し、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 D の記載（英語版 Handbook 41 ページ）に従って DNase I ストック溶液を調製します。

* 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 safety data sheet）をご覧ください。

操作手順

1. ステップ 1a、1b、1cに従って組織を破碎しライセートをホモジナイズする。

破碎およびホモジナイズ法に関する詳細は英語版 Handbook 14～16 ページの“Lysis and homogenization”を参照してください。

注：不完全な破碎およびホモジナイズは収量の減少および QIAamp スピンカラムの目詰まりの原因になります。TissueLyser、TissueRuptor あるいは同様のローター/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は、RNA 収量が他の方法よりも一般的に増加します。

注： β -メルカプトエタノール (β -ME) が Buffer RLT に添加されていることを確認してください (“実験を始める前の準備事項”参照)。

RNA^{later} RNA Stabilization Reagent で安定化した組織は新鮮あるいは解凍した組織に比べてわずかに固くなります。スタンダードな方法を用いた組織サンプルの破碎とホモジナイゼーションは通常問題ありません。600 μ l の Buffer RLT 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。

1a. QIAGEN TissueRuptor あるいはこれに相当するローター/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、凍結あるいは RNA^{later} で安定化）を適切なサイズ of のホモジナイザー用の容器に入れる。適切な量の Buffer RLT を添加する（表 3 参照）。TissueRuptor あるいはこれに相当するローター/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）。ライセートを最高速度で 3 分間遠心し、上清のみを使用する。ステップ 2 に進む。

いくつかのサンプルでは不溶性物質が存在するため、遠心操作の後、ペレットが見えないことがあります。

表 3. サンプル溶解に用いる Buffer RLT 量

スタートサンプルの重量	Buffer RLT の容量
20 mg まで	350 μ l
溶解困難な組織の場合は 20～30 mg	600 μ l

ほとんどの動物組織で、一辺が 3 mm の立方体 (27 mm³) の重さは 30～35 mg です。

1b. TissueLyser を用いた破碎およびホモジナイゼーション：

重量測定した組織（新鮮、凍結あるいはRNAlaterで安定化）を2 mlのマイクロ遠心チューブに入れる。適切な量のBuffer RLT（表3参照）を添加し、直径5 mmのステンレススチール製ビーズを入れる。ライセートをTissueLyserにセットして20 Hzで2分間ホモジナイズする。TissueLyserラックを回転し、20 Hzでさらに2分間ホモジナイズする。ライセートを最高速度で3分間遠心し、上清のみを使用する。ステップ2に進む。

注：ステップ1bの操作はおおよそのガイドラインとしてご使用ください。サンプルの種類やビーズミルの種類により変更する必要があります。TissueLyser Handbookを参照してください。

1c. 乳鉢と乳棒で破碎後、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RNAlaterで安定化）を迅速に液体窒素中に入れ、液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて細かい粉末にする。液体窒素で冷却したマイクロ遠心チューブ（RNase フリー、2 ml）に粉末状の組織と液体窒素を移す。液体窒素を蒸発させるが、組織が解凍しないように注意する。

600 μ lのBuffer RLTを添加する。2 mlのコレクションチューブにセットしたQIAshredder スピнкаラムにライセートを直接ピペットで添加し、最高速度で2分間遠心操作してサンプルをホモジナイズする。QIAshredder スピнкаラムを捨てて、上清のみを使用する。ステップ2に進む。

注：この方法では、TissueLyser、TissueRuptorあるいは同様のローター/ステーター方式ホモジナイザーを用いた場合よりも収量が少なくなることがあります（上記参照）。

2. 清澄化したライセートに同容量の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。

ホモジナイゼーション中にライセート量が減少した場合には、エタノール量もライセート量に応じて調節してください。エタノール添加後に生じる沈殿物は、QIAamp 操作に影響を与えません。

3. 2 ml コレクションチューブ（添付）の中にセットしたQIAamp スピнкаラムに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。スピнкаラムの縁を濡らさないように注意する。8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心操作する。サンプル量が700 μ lを超える場合は残りのサンプルを続けてQIAamp スピнкаラムにアプライし上記の条件で遠心操作を行なう。

ろ液* およびコレクションチューブを捨てます。

オプション：オプションでカラム上のDNase 分解（英語版 Handbook 41 ページ “DNase treatment”）を行なう場合には、このステップ後に英語版 Handbook 42 ページのD1～D4を行ないます。

4. **QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml のコレクションチューブ（添付）に移す。700 μ l の Buffer RW1 を QIAamp スピンカラムにピペットで添加し、洗浄のため 8,000 x g（10,000 rpm）以上で 15 秒間遠心操作する。**

ろ液 * およびコレクションチューブを捨てます。

5. **QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml のコレクションチューブ（添付）に移す。500 μ l の Buffer RPE を QIAamp スピンカラムにピペットで添加し、洗浄のため 8,000 x g（10,000 rpm）以上で 15 秒間遠心操作する。**

ろ液 * およびコレクションチューブを捨てます。

注：使用前にエタノールを Buffer RPE に添加したことを確認します（“実験を始める前の準備事項” を参照）。

6. **注意深く QIAamp スピンカラムを開き、500 μ l の Buffer RPE を添加する。蓋を開けて最高速度（20,000 x g、14,000 rpm）で 3 分間遠心分離する。**

注：ある種の遠心ローターは減速の際に振動するため、Buffer RPE を含むろ液が QIAamp スピンカラムに接触することがあります。また、QIAamp スピンカラムとコレクションチューブをローターから取り出す際に、ろ液が QIAamp スピンカラムと接触することもあります。

7. **推奨：QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml コレクションチューブ（別途準備）にのせ、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。最高速度で 1 分間遠心操作を行なう。**

このステップにより Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除することができます。

8. **QIAamp スピンカラムを 1.5 ml のマイクロ遠心チューブ（添付）にセットし、30 ~ 50 μ l の RNase フリー水（添付）を QIAamp メンブレンに直接ピペットで入れる。8,000 x g 以上（10,000 rpm 以上）で 1 分間遠心操作を行ない溶出する。予想される RNA 収量が 30 μ g 以上の場合には、もう一度繰り返す。**

2 回目の溶出ステップを行なう場合は、さらに 30 ~ 50 μ l の RNase フリー水を用いて、同じチューブに溶出します。

* Buffer RLT や 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 は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

プロトコール：培養細胞からのトータルRNA精製

実験を始める前の重要事項

- 適切な細胞数をご使用ください（英語版 Handbook 13 ページ参照）。
- QIAamp RNA Blood Mini Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 11 ページ）をお読みください。
- 初めて RNA を調製する際には英語版 Handbook 35 ページ、“Appendix A : General Remarks on Handling RNA”をお読みください。
- 遠心操作を含むプロトコールのすべてのステップは室温（15～25℃）で行ないます。操作は手早く進めてください。
- 細胞収集後すべての遠心操作はマイクロ遠心機で 15℃～25℃で行なってください。
- 細胞ペレットは後で使用するために -70℃ で保存することも、すぐに調製することも可能です。凍結する前に細胞数を測定します。凍結細胞のペレットは少し解凍してから、指で叩いてルーズにしてください（ステップ 2）。ホモジナイズした細胞ライセート（Buffer RLT 中、ステップ 2）は -70℃ で数カ月保存できます。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℃）あるいは 37℃ 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℃ 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 3 に進んでください。

実験開始前の準備事項

- Buffer RLT は保存中に沈殿物を生じることがあります。必要に応じて加温して溶かしてから使用してください。
- β-メルカプトエタノール（β-ME）を使用前に Buffer RLT に添加してください。1 ml の Buffer RLT あたり 10 μl の β-ME を添加します。この溶液は室温（15～25℃）で 1 ヶ月安定です。
- Buffer RPE は濃縮液としてお届けします。キットを初めて使用する場合は、4 倍量のエタノール（96～100%）を添加し、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 D の記載（英語版 Handbook 41 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に取り、300 x g で 5 分間遠心操作しペレットにする。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：細胞培養液が完全に除去されていないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、QIAampメンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。この結果、RNA収量が減少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）：

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。

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：細胞培養液が完全に除去されていないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、QIAampメンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。これによりRNA収量が減少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%のトリプシンが入ったPBS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に入れ $300 \times g$ 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：細胞培養液が完全に除去されていないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、QIAampメンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。これによりRNA収量が減少することがあります。

2. Buffer RLTを添加して細胞を破碎する。

注：使用前にβ-MEをBuffer RLTに添加したことを確認します（実験を始める前の準備事項を参照）。

チューブを指で軽く叩いて細胞ペレットをルーズにし、Buffer RLTを添加する（下の表に従う）。ボルテックスあるいはピペットで混和する。細胞塊がないことを確認してからステップ3に進む。

細胞ペレットの細胞数	Buffer RLTの容量 (μl)
5×10^6 まで	350
$5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ まで	600

単層培養細胞では以下の表に従って **Buffer RLT** を細胞に添加する。ゴム製のセルスクレイパーで細胞ライセートを回収する。ボルテックスあるいはピペットで混和する。細胞塊がないことを確認してからステップ3に進む。

ディッシュの直径 (cm) *	Buffer RLTの容量 (µl)
6 cm まで	350
6 ~ 10 cm まで	600

* 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。

- 2 ml** のコレクションチューブ (添付) にセットした **QIAshredder** スピンカラムに直接ピペットでライセートを添加し、最高速度で2分間ホモジナイズする。**QIAshredder** スピンカラムを廃棄し、ホモジナイズしたライセートを保管する。
エアゾール形成を避けるために、1回で **QIAshredder** スピンカラムにライセートを添加できるように750 µl以上にピペットを合わせてください。
使用した細胞数が多すぎると、ホモジナイズ後にライセートの粘性が高くなり、ピペット操作が難しくなります。このような場合には16ページのトラブルシューティングを参照してください。
- ホモジナイズしたライセートに同容量の**70%エタノール** (通常**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。
もしホモジナイゼーションの間にライセート量が減少した場合には、エタノール量もライセート量に応じて調整してください。エタノール添加後に生じる沈殿物は、**QIAamp** 操作に影響を与えません。
- 2 ml** コレクションチューブ (添付) の中にセットした **QIAamp** スピンカラムにサンプル (形成した沈殿物を含む) をピペットでアプライする。スピンカラムの縁を濡らさないように注意する。**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で**15秒間**遠心操作する。カラムにアプライする最大容量は**700 µl** である。サンプル量が**700 µl** を超える場合は残りのサンプルを続けて **QIAamp** スピンカラムにアプライし、上記の条件で遠心操作を行なう。
ろ液[†] およびコレクションチューブを捨てます。
オプション：オプションでカラム上のDNase分解 (英語版 Handbook 41 ページ “DNase treatment”) を行なう場合には、このステップ後に英語版 Handbook 42 ページのD1 ~ D4を行ないます。
- QIAamp** スピンカラムを新しい**2 ml** のコレクションチューブ (添付) に移す。**700 µl** の **Buffer RW1** を **QIAamp** スピンカラムにピペットで添加し、洗浄のため **8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で**15秒間**遠心操作する。
ろ液[†] およびコレクションチューブを捨てます。

[†] Buffer RLTや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は英語版 Handbook 6ページをご覧ください。

7. **QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml のコレクションチューブ（添付）に移す。500 μ l の Buffer RPE を QIAamp スピンカラムにピペットで添加し、洗浄のため 8,000 x g（10,000 rpm）以上で 15 秒間遠心操作する。**

ろ液[†]は捨てます。

注：使用前にエタノールを Buffer RPE に添加したことを確認します（“実験を始める前の準備事項”を参照）。

8. **注意深く QIAamp スピンカラムを開き、500 μ l の Buffer RPE を添加する。蓋を開けて最高速度（20,000 x g、14,000 rpm）で 3 分間遠心分離する。**

注：ある種の遠心ローターは減速の際に振動するため、Buffer RPE を含むフロースルーが QIAamp スピンカラムに接触することがあります。また、QIAamp スピンカラムとコレクションチューブをローターから取り出す際に、ろ液が QIAamp スピンカラムと接触することもあります。

9. **推奨：QIAamp スピンカラムを新しい 2 ml コレクションチューブ（別途準備）にのせ、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。最高速度で 1 分間遠心操作を行なう。**

このステップにより Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除することができます。

10. **QIAamp スピンカラムを 1.5 ml のコレクション・チューブ（添付）にセットし、QIAamp メンブレンに 30～50 μ l の RNase フリー水（添付）をピペットで入れる。8,000 x g 以上（10,000 rpm 以上）で 1 分間遠心操作を行ない溶出する。予想される RNA 収量が 30 μ l 以上の場合には、もう一度繰り返す。**

2 回目の溶出ステップを行なう場合は、さらに 30～50 μ l の RNase フリー水を用いて、同じチューブに溶出します。

プロトコール：RNAクリーンアップ

実験を始める前の重要事項

- QIAamp スピンカラムの結合容量（100 µg）を超えないでください。

実験開始前の準備事項

- Buffer RLTは保存中に沈殿物を生じることがあります。必要に応じて加温して溶かしてから使用してください。
- β-メルカプトエタノール（β-ME）を使用前にBuffer RLTに添加してください。1 mlのBuffer RLTあたり10 µlのβ-MEを添加します。β-MEを添加したBuffer RLTは1ヶ月間安定です。
- Buffer RPEは濃縮液としてお届けします。キットを初めて使用する場合は、4倍量のエタノール（96～100%）を添加し、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 Dの記載（英語版 Handbook 41 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. **RNase フリー水（添付）でサンプル容量を100 µlに調節した後、350 µlのBuffer RLTをサンプルに添加、完全に混和する。**
注：使用前にβ-MEをBuffer RLTに添加したことを確認します（“実験を始める前の準備事項”を参照）。
2. **250 µlのエタノール（96～100%）をライセートに添加し、ピペットでよく混和する。遠心操作は行なわない。**
3. **縁を濡らさないように注意して、2 mlコレクションチューブ（添付）にセットしたQIAamp スピンカラムにサンプル（700 µl）をピペットで入れる。8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心分離する。**
ろ液* およびコレクションチューブを捨てます。
オプション：オプションでカラム上のDNase分解（英語版 Handbook 41 ページ “DNase treatment”）を行なう場合には、このステップ後に英語版 Handbook 42 ページのD1～D4を行ないます。
4. **QIAamp スピンカラムを新しい2 mlコレクションチューブ（添付）に移し、500 µlのBuffer RPEを添加し、8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心分離する。**
ろ液およびコレクションチューブを捨てます。
注：エタノールをBuffer RPEに添加したことを確認します（“実験を始める前の準備事項”を参照）。

* Buffer RLTや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は英語版 Handbook 6ページをご覧ください。

5. 注意深く QIAamp スピнкаラムを開き、500 μ l の Buffer RPE を添加する。蓋を開けて最高速度 (20,000 x g、14,000 rpm) で 3 分間遠心分離する。

注：ある種の遠心ローターは減速の際に振動するため、Buffer RPE を含むフロースルーが QIAamp スピнкаラムに接触することがあります。また、QIAamp スピнкаラムとコレクションチューブをローターから取り出す際に、ろ液が QIAamp スピнкаラムと接触することもあります。

6. 推奨：QIAamp 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）にのせ、ろ液の入っているコレクションチューブは捨てる。最高速度で 1 分間遠心操作を行なう。

このステップにより Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除することができます。

7. QIAamp 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）にセットし、QIAamp メンブレンに 30 ~ 50 μ l の RNase フリー水（添付）をピペットで入れる。8,000 x g 以上 (10,000 rpm 以上) で 1 分間遠心操作を行ない溶出する。予想される RNA 収量が 30 μ g 以上の場合には、もう一度繰り返す。

予想した RNA 量が 30 μ g 以上の場合には、さらに 30 ~ 50 μ l の RNase フリー水で溶出ステップをもう一度行ない、同じコレクションチューブに溶出します。

トラブルシューティングガイド

コメント

赤血球の溶解が不完全

- a) ステップ2で濁った懸濁液が透明にならない
氷上で20分間までインキュベーション時間を延長する。
- b) ステップ3のペレットが赤い
白血球ペレットは白いので、赤血球が微量残存していることが考えられる。赤血球の溶解が不完全な場合には、白いペレットは観察されずに、大量の赤血球が赤いペレットを形成する。このような場合には、ステップ4でのBuffer EL添加後、氷上でさらに5～10分間インキュベートする。

QIAshredderでのホモジナイズ後、ライセートの粘度が非常に高い

サンプル使用量が多すぎる場合には、QIAshredderでのホモジナイズ後、ライセートの粘度が高すぎてピペティングが困難になる。このような場合には、サンプルを2回に分け、それぞれのサンプルをBuffer RLTで600 µlに調整する。QIAshredderおよびQIAamp スピнкаラムをそれぞれ2個用いてプロトコールのステップ7（血液）、ステップ1b（組織）あるいはステップ2（培養細胞）に進む。

QIAamp スピнкаラムが目詰まり

スタートサンプル量が多すぎる
溶解およびホモジナイゼーションが不完全。遠心力と遠心時間を増やす。次の調製にはスタートサンプル量を減らす（英語版 Handbook 13 ページ）および/あるいはBuffer RLTの量を増やす。

溶出したRNAが少ないあるいは皆無

- a) 血液：赤血球のキャリアオーバー
上記の“赤血球の溶解が不完全”を参照。
- b) 全てのサンプル：スタートサンプル量が多すぎる
溶解およびホモジナイゼーションが不完全。次の調製にはスタートサンプル量を減らす（英語版 Handbook 13 ページ）および/あるいはBuffer RLTの量を増やす。
- c) 全てのサンプル：RNAがメンブレンに残留
溶出を繰り返す。遠心分離の前にQIAamp スピнкаラムにRNase フリー水を注入し、室温（15～25℃）で10分間インキュベートする。

コメント

RANが分解

- a) **血液**：血液の保存期間 長期間保存した血液サンプルをRNA精製に使用詳細は、英語版 Handbook 11 ページ “Important Notes” を参照。
- b) **組織**：破碎、ホモジナイゼーションが不十分 ローター・ステーター方式のホモジナイザーあるいは TissueLyser をスタートサンプルの破碎とホモジナイゼーションに使用する。
- c) **全てのサンプル**：スタートサンプルの品質 精製過程以前のサンプル取り扱いの際にRNAが分解した（例；組織摘出など）。下記（d）を参照。
- d) **全てのサンプル**：取り扱い プロトコールの特に初めの数ステップを迅速に行なったかを確認する。英語版 Handbook 35 ページ、Appendix A “General Remarks for Handling RNA” を参照。
- e) **全てのサンプル**：溶解バッファーにβ-MEが混入 使用前にβ-MEを Buffer RLT に添加したことを確認する。
- f) **全てのサンプル**：RNaseの混入 バッファーにRNaseが混入していないかチェックする。調製中あるいは、その後の解析の際、取り扱い中にRNaseが混入しないように注意する。英語版 Handbook 35 ページ、Appendix A “General Remarks for Handling RNA” を参照。

DNAが残存

RNAを含む溶出液をDNaseで分解する（英語版 Handbook 43 ページ参照）。DNaseの熱処理による不活性後、またはQIAamp RNA MiniのRNAクリーンアップ用プロトコールでRNAを再精製後、RNAを次の実験に直接使用する（英語版 Handbook 17 ページ “DNase treatment” 参照）。

QIAamp 調製中に一緒に精製されたDNAを完全に除去するために、QIAGEN RNase-Free DNase Digest Set を使用することも可能（英語版 Handbook 17 ページ “DNase treatment” 参照）。

コメント

A_{260}/A_{280} 比が低い

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 38 ページ、Appendix B “Purity of RNA” 参照）。

RNA が続けて行なう実験で最適に作用しない

- a) 溶出の際に塩類が
キャリアオーバー Buffer RPE は必ず室温（15～25℃）で使用する。
- b) エタノールの
キャリアオーバー 溶出前に微量のエタノールを除去するために、プロトコルで推奨されている遠心ステップを行なう。

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp® (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。

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.co.jp 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.co.jp から入手可能です。

© 2011 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

