

## RNeasy® Plus 96

### プロトコールとトラブルシューティング

gDNA Eliminator 96 Plate を用いて 96 ウェルフォーマットにより動物およびヒト細胞からトータルRNAを精製

目次	ページ
プロトコール	
吸引法／遠心法を用いて細胞からのトータルRNA精製	2
遠心法を用いて細胞からトータルRNA	7
トラブルシューティング	11



# プロトコール：吸引法／遠心法を用いて細胞からのトータルRNA精製

## 実験を始める前の重要事項

- RNeasy Plus 96 Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 14 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 28 ページ）をお読みください。
- 吸引ステップは全て QIAvac 96 吸引マニホールドで行ないます。マニホールドを初めて使用される場合は、英語版 Handbook 11 ページの“QIAvac 96 vacuum manifold”をご覧ください。
- すべての遠心ステップは、Plate Rotor 2 x 96 を装備した Centrifuge 4-15C あるいは Centrifuge 4K15C で行ないます。遠心機を初めて使用される場合は、英語版 Handbook 13 ページの“Centrifuge 4-15C and Centrifuge 4K15C”をご覧ください。
- マルチチャンネルピペットを使用することをお奨めします（英語版 Handbook 10 ページ）。マルチチャンネルピペット用のリザーバーにバッファおよび RNase フリー水を注ぎます。新しく開封したりザーバーを使用するか、S-Block に関しての洗浄方法（英語版 Handbook 16 ページ）を参考に洗浄します。
- 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、またすぐに調製することも可能です。凍結細胞のペレットは少し解凍してから操作を始めます。
- ステップ 2 の Buffer RLT Plus 中の細胞ライセートは -70℃ で数カ月保存できます。凍結ライセートは、使用時に完全に解凍し塩類が溶解するまで、37℃ の水浴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。ピペットで 3 回吸排出して混和してからステップ 3 に続きます。
- RNAprotect® Cell Reagent 中に保存した細胞もこの精製法に使用できます。RNAprotect Cell Reagent 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）の RNA 精製プロトコールにあるステップ 1 ~ 3 に記載されている方法で、細胞をペレット化し上清を注意深く取り除きます。300 µl の Buffer RLT Plus を各サンプルに添加し、サンプルを Collection Microtubes (racked) (Cat. no. 19560) に移します。Collection Microtube Caps (Cat. no. 19566) でチューブを密封し、ステップ 2 にすぐに続けます。
- Buffer RLT Plus と Buffer RW1 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。

- この実験の全てのステップは室温（15～25℃）で行なってください。操作は手早く進めてください。
- 全ての遠心ステップは20～25℃で行なってください。遠心機が20℃以下にならないように確認してください。

### 実験開始前の準備事項

- RNase含有量の多い細胞株からRNAを精製する際には、使用前にβ-ME（β-mercaptoethanol）をBuffer RLT Plusに添加することをお奨めします。1 mlのBuffer RLT Plusに10 μlのβ-MEを添加してください。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Buffer RLT Plusは室温（15～25℃）で1ヶ月間まで保存できます。あるいは1 mlのBuffer RLT Plusあたり20 μlの2 M dithiothreitol（DTT）を添加します。2 MのDTTストック溶液を水で新しく調製し、一回分ずつに分注し直ぐに使用するかあるいは凍結します。DTTを添加したBuffer RLT Plusは室温で最高1ヶ月間保存できます。
- Buffer RPEは濃縮液でお届けします。最初に使用する前に、ボトルに記載されているよう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が沈殿物を形成することがあります。必要な際は温めて沈殿物を溶かした後、室温で使用してください。

### 操作手順

#### 1. ステップ1aあるいは1bに従って細胞を収集する（最高1 x 10<sup>6</sup>個）。

##### 1a. 単層培養細胞：

ピペティングにより細胞培養液を完全に除去し、300 μlのBuffer RLT Plusを各ウェルに添加する。サンプルをCollection Microtubes (racked) (Cat. no. 19560)に移し、Collection Microtube Caps (Cat. no. 19566) でチューブを密封する。

あるいはCollection Microtubesの代わりに、蓋つきの96ウェルプレートを使用できます。

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、DNA除去やRNA精製の条件が変化します。この結果RNA収量と純度が低下することがあります。

注：ウェルの容量が少なく操作中にクロスコンタミのリスクがある場合は、Buffer RLT Plusの量を200 μlに減らします。

## 1b. 浮遊細胞：

各サンプルから  $1 \times 10^6$  個の細胞を **Collection Microtubes (racked)** (Cat. no. 19560) に入れる。細胞を  $300 \times g$  で5分間遠心してペレット化する。ピペティングにより上清を完全に除去し、 $300 \mu\text{l}$  の **Buffer RLT Plus** を各チューブに添加する。**Collection Microtube Caps** (Cat. no. 19566) でチューブを密封する。

あるいは **Collection Microtubes** の代わりに、蓋つきの96ウェルプレートを使用できます。

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、DNA除去やRNA精製の条件が変化します。この結果RNA収量と純度が減少することがあります。

注：ウェルの容量が少なく操作中にクロスコンタミのリスクがある場合は、**Buffer RLT Plus** の量を  $200 \mu\text{l}$  に減らします。

2. **Collection Microtubes (racked)** を最高速度で30秒間以上ボルテックスすることによりライセートをホモジナイズする。
3. 新しい **S-Block** 上に **gDNA Eliminator 96 Plate** をセットする。後でサンプルを同定できるようにプレートに印をつける。
4. ステップ2のライセートを **gDNA Eliminator 96 Plate** のウェルに移す。

注：クロスコンタミを回避するために、ウェルの縁が濡れないようにします。

5. **gDNA Eliminator 96 Plate** を **AirPore Tape Sheet** でシールする。**S-Block** と **gDNA Eliminator 96 Plate** を金属ホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットにセットする。 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 、 $6,000 \text{ rpm}$  (約  $5,600 \times g$ ) で4分間遠心操作する。**gDNA Eliminator 96 Plate** を捨てて、ろ液を保存する。

密封したプレートを遠心することによりクロスコンタミを回避します。

注：遠心操作後に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、全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。

6. **QIAvac 96** 吸引マニホールドをセットする：まず **QIAvac base** の内部に **Waste tray** を設置後、**QIAvac base** の上に **QIAvac 96 top plate** をぴったりと載せる。**QIAvac 96 top plate** の中に **RNeasy 96** プレートを置き、プレートが密着しているか確認する。吸引マニホールドを吸引装置に接続する。吸引装置のスイッチをオフしておく。

注：斜めにカットされているプレートの角が常に右側に来るように **RNeasy 96** プレートを吸引マニホールドにセットします。

7. ステップ5のろ液が入った **S-Block** の各ウェルに等量の **70% エタノール ( $300 \mu\text{l}$ )** を添加する。ピペットで3回吸排出してよく混和する。

注：ステップ1で **Buffer RLT Plus** の量を  $200 \mu\text{l}$  に減らした場合は、 $200 \mu\text{l}$  の **70% エタノール** を添加する。

8. **RNeasy 96 プレートのウェルにサンプル (600  $\mu$ l) を入れ、吸引装置のスイッチを入れる。サンプルが完全にメンブレンを通過するまで吸引する (15~60 秒)。スイッチを切ってマニホールドの圧力を戻す。**

サンプルをアプライする前に QIAvac 96 吸引マニホールドが正確にセットされていることを確認します。ろ液は Waste tray に収集されます。

注：クロスコンタミを回避するために、ウェルの縁が濡れないようにします。

注：粘着テープか Tape Pads (Cat. no. 19570) で使用していないウェルを密封します。RNeasy Plus 96 Kit に添付されている AirPore Tape Sheet を使用しないでください。

注：各サンプルの条件を一定に保つために、ピペッティング・ステップごとに吸引スイッチを切り、マニホールドの圧力を戻します。

9. **RNeasy 96 プレートの各ウェルに 800  $\mu$ l の Buffer RW1 を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。バッファが完全にメンブレンを通過するまで吸引する (10~30 秒)。スイッチを切ってマニホールドの圧力を戻す。**

ろ液は、ステップ 8 と同じ Waste tray に回収されます。

10. **RNeasy 96 プレートをセットした QIAvac 96 top plate を QIAvac 96 base から持ち上げ、Waste tray に入っているろ液を棄て\*、QIAvac 96 吸引マニホールドを再びセットする。**

11. **RNeasy 96 プレートの各ウェルに 800  $\mu$ l の Buffer RPE を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。バッファが完全にメンブレンを通過するまで吸引する (10~30 秒)。スイッチを切ってマニホールドの圧力を戻す。**

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 に添加したことを確認します (“実験を始める前の準備事項” を参照)。

12. **S-Block (新品あるいは再使用可) の上に RNeasy 96 プレートを置く。後でサンプルを同定できるようにプレートに印をつける。**

S-Block を再使用する場合は、英語版 Handbook 16 ページに記載されているように洗浄します。

13. **800  $\mu$ l の Buffer RPE を RNeasy 96 Plate の各ウェルに入れ、プレートを AirPore Tape Sheet で密封する。S-Block と RNeasy 96 Plate を金属ホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットにセットする。20~25  $^{\circ}$ C、6,000 rpm (約 5,600 x g) で 10 分間遠心操作してメンブレンを乾燥させる。**

密封したプレートを遠心することによりクロスコンタミを回避します。

残留しているエタノールは、続いて行なう反応を阻害することがあるため、RNeasy メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。10 分間の遠心操作は、残留している微量塩類を確実に除去し、RNA 溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。

\* Buffer RLT Plus 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。

- 14. AirPore Tape Sheet**を剥がす。**Elution Microtubes CL**の上に**RNeasy 96 Plate**を置く。各ウェルに**45～70 µl**の**RNase フリー水**を添加し、プレート新しい**AirPore Tape Sheet**でシールする。室温（**15～25℃**）で**1分間**インキュベートする。**20～25℃**、**6,000 rpm**（約**5,600 x g**）で**4分間**遠心操作して**RNA**を溶出する。

注：RNeasy メンブレンに直接RNase フリー水をピペットで注入します。水がRNeasy 96 プレートの壁やOリングに付着していると、溶出が不完全になります。

- 15. AirPore Tape Sheet**を剥がす。さらに**45～70 µl**の**RNase フリー水**で**ステップ14**を繰り返す。

注：RNA を完全に回収するためには**ステップ14**を繰り返す必要があります。溶出液量はメンブレンに添加したRNase フリー水よりも約**15 µl**少なくなります（**15 µl**はメンブレンのデッドボリュームに相当）。

保存するためにマイクロチューブを密封する際は、添付のキャップを用いてください。RNAは**-20℃**あるいは**-70℃**で保存します。

# プロトコール：遠心法を用いて細胞からトータルRNAを精製

## 実験を始める前の重要事項

- RNeasy Plus 96 Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 14 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 28 ページ）をお読みください。
- すべての遠心ステップは、Plate Rotor 2 x 96を装備したCentrifuge 4-15CあるいはCentrifuge 4K15Cで行ないます。遠心機を初めて使用される場合は、英語版 Handbook 13 ページの“Centrifuge 4-15C and Centrifuge 4K15C”をご覧ください。
- マルチチャンネルピペットを使用することをお奨めします（英語版 Handbook 10 ページ）。マルチチャンネルピペット用のリザーバーにバッファーおよびRNase フリー水を注ぎます。新しく開封したリザーバーを使用するか、S-Block に関しての洗浄方法（英語版 Handbook 16 ページ）を参考に洗浄します。
- 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、またすぐに調製することも可能です。凍結細胞のペレットは少し解凍してから操作を始めます。
- ステップ2のBuffer RLT Plus中の細胞ライセートは-70℃で数カ月保存できます。凍結ライセートは、使用時に完全に解凍し塩類が溶解するまで、37℃の水浴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。ピペットで3回吸排出して混和してからステップ3に続きます。
- RNAprotect Cell Reagent中に保存した細胞もこの精製法に使用できます。RNAprotect Cell Reagent 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）のRNA精製プロトコールにあるステップ1～3に記載されている方法で、細胞をペレット化し上清を注意深く取り除きます。300 µlのBuffer RLT Plusを各サンプルに添加し、サンプルをCollection Microtubes（racked）（Cat. no. 19560）に移します。Collection Microtube Caps（Cat. no. 19566）でチューブを密封し、ステップ2にすぐに続けます。
- Buffer RLT PlusとBuffer RW1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。
- この実験の全てのステップは室温（15～25℃）で行なってください。操作は手早く進めてください。
- 全ての遠心ステップは20～25℃で行なってください。遠心機が20℃以下にならないように確認してください。

## 実験開始前の準備事項

- RNase 含有量の多い細胞株から RNA を精製する際には、使用前に  $\beta$ -ME ( $\beta$ -mercaptoethanol) を Buffer RLT Plus に添加することをお奨めします。1 ml の Buffer RLT Plus に 10  $\mu$ l の  $\beta$ -ME を添加してください。適切な保護着を着用し、ドラフト内で調製してください。 $\beta$ -ME を添加した Buffer RLT Plus は室温 (15 ~ 25  $^{\circ}$ C) で 1 ヶ月間まで保存できます。あるいは 1 ml の Buffer RLT Plus あたり 20  $\mu$ l の 2 M dithiothreitol (DTT) を添加します。2 M の DTT ストック溶液を水で新しく調製し、一回分ずつに分注し直ぐに使用するかあるいは凍結します。DTT を添加した Buffer RLT Plus は室温で最高 1 ヶ月間保存できます。
- Buffer RPE は濃縮液でお届けします。最初に使用する前に、ボトルに記載されているよう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 が沈殿物を形成することがあります。必要な際は温めて沈殿物を溶かした後、室温で使用してください。

## 操作手順

1. ステップ 1a あるいは 1b に従って細胞を収集する (最高  $2 \times 10^6$  個)。

### 1a. 単層培養細胞 :

ピペティングにより細胞培養液を完全に除去し、300  $\mu$ l の Buffer RLT Plus を各ウェルに添加する。サンプルを Collection Microtubes (racked) (Cat. no. 19560) に移し、Collection Microtube Caps (Cat. no. 19566) でチューブを密封する。

あるいは Collection Microtubes の代わりに、蓋つきの 96 ウェルプレートを使用できます。

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、DNA 除去や RNA 精製の条件が変化します。この結果 RNA 収量と純度が減少することがあります。

注 : ウェルの容量が少なく操作中にクロスコンタミのリスクがある場合は、Buffer RLT Plus の量を 200  $\mu$ l に減らします。

### 1b. 浮遊細胞 :

各サンプルから  $2 \times 10^6$  個の細胞を Collection Microtubes (racked) (Cat. no. 19560) に入れる。細胞を 300 x g で 5 分間遠心してペレット化する。ピペティングにより上清を完全に除去し、300  $\mu$ l の Buffer RLT Plus を各チューブに添加する。Collection Microtube Caps (Cat. no. 19566) でチューブを密封する。

あるいは Collection Microtubes の代わりに、蓋つきの 96 ウェルプレートを使用できます。

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、DNA除去やRNA精製の条件が変化します。この結果RNA収量と純度が減少することがあります。

注：ウェルの容量が少なく操作中にクロスコンタミのリスクがある場合は、Buffer RLT Plusの量を200  $\mu$ lに減らします。

2. **Collection Microtubes (racked)** を最高速度で30秒間以上ボルテックスすることによりライセートをホモジナイズする。

3. 新しい**S-Block**上に**gDNA Eliminator 96 Plate**をセットする。後でサンプルを同定できるようにプレートに印をつける。

4. ステップ2のライセートを**gDNA Eliminator 96 Plate**のウェルに移す。

注：クロスコンタミを回避するために、ウェルの縁が濡れないようにします。

5. **gDNA Eliminator 96 Plate**を**AirPore Tape Sheet**でシールする。**S-Block**と**gDNA Eliminator 96 Plate**を金属ホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットにセットする。20~25℃、6,000 rpm (約5,600 x g)で4分間遠心操作する。**gDNA Eliminator 96 Plate**を捨てて、ろ液を保存する。

密封したプレートを遠心することによりクロスコンタミを回避します。

注：遠心操作後に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、全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返します。

6. **S-Block** (新品あるいは再使用も可) の上に**RNeasy 96 Plate**を置く。後でサンプルを同定できるようにプレートに印をつける。

S-Blockを再使用する場合は、英語版 Handbook 16ページに記載されているように洗浄します。

7. ステップ5のろ液が入った**S-Block**の各ウェルに等量の70%エタノール(300  $\mu$ l)を添加する。ピペットで3回吸排出してよく混和する。

注：ステップ1でBuffer RLT Plusの量を200  $\mu$ lに減らした場合は、200  $\mu$ lの70%エタノールを添加します。

8. **RNeasy 96 Plate**のウェルにサンプル(600  $\mu$ l)を入れる。

注：クロスコンタミを回避するために、ウェルの縁が濡れないようにします。

9. **RNeasy 96 Plate**を**AirPore Tape Sheet**でシールする。**S-Block**と**RNeasy 96 Plate**を金属ホルダーの中に入れ、これを遠心機のローターバケットにセットする。20~25℃、6,000 rpm (約5,600 x g)で4分間遠心操作する。

密封したプレートを遠心することによりクロスコンタミを回避します。

10. S-Block内のろ液を棄て \*AirPore Tape Sheetを剥がす。800  $\mu$ lのBuffer RW1をRNeasy 96 plateの各ウェルに入れ、プレートをAirPore Tape Sheetで密封する。20～25℃、6,000 rpm (約5,600 x g) で4分間遠心操作する。

11. S-Block内のろ液を棄て \*AirPore Tape Sheetを剥がす。800  $\mu$ lのBuffer RPEをRNeasy 96 Plateの各ウェルに入れ、プレートを新しいAirPore Tape Sheetで密封する。20～25℃、6,000 rpm (約5,600 x g) で4分間遠心操作する。

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に添加したことを確認します（“実験を始める前の準備事項”を参照）。

12. S-Block内のろ液を棄て AirPore Tape Sheetを剥がす。800  $\mu$ lのBuffer RPEをRNeasy 96 Plateの各ウェルに入れ、プレートを新しいAirPore Tape Sheetで密封する。20～25℃、6,000 rpm (約5,600 x g) で10分間遠心操作してメンブレンを乾燥させる。

残留しているエタノールは、続いて行なう反応を阻害することがあるため、RNeasy メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。10分間の遠心操作は、残留している微量塩類を確実に除去し、RNA 溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。

13. AirPore Tape Sheetを剥がす。Elution Microtubes CLの上にRNeasy 96 プレートを置く。各ウェルに45～70  $\mu$ lのRNase フリー水を添加し、プレートを新しいAirPore Tape Sheetでシールする。室温（15～25℃）で1分間インキュベートする。20～25℃、6,000 rpm (約5,600 x g) で4分間遠心操作してRNAを溶出する。

注：RNeasy メンブレンに直接RNase フリー水をピペットで注入します。水がRNeasy 96 Plateの壁やOリングに付着していると、溶出が不完全になります。

14. AirPore Tape Sheetを剥がす。さらに45～70  $\mu$ lのRNase フリー水でステップ13を繰り返す。

注：RNAを完全に回収するためにはステップ13を繰り返す必要があります。溶出液量はメンブレンに添加したRNase フリー水よりも約15  $\mu$ l少なくなります（15  $\mu$ lはメンブレンのデッドボリュームに相当）。

保存するためにマイクロチューブを密封する際は、添付のキャップを用いてください。RNAは-20℃あるいは-70℃で保存します。

\* Buffer RLT Plus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。

# トラブルシューティングガイド

## コメント

### プレートのウェルが目詰まり

- a) 破碎および／あるいはホモジナイゼーションが不十分 吸引と遠心を組み合わせたプロトコルの代わりに遠心プロトコルを使用する。必要に応じて遠心速度と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（英語版 Handbook 14 ページの “Determining the amount of starting material” 参照）、および／あるいはホモジナイゼーション時間を増やす。
- 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。正確なスタートサンプル量で実験を始めることが重要である（英語版 Handbook 14 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℃ に設定する。20℃ に設定しても機械は 20℃ 以下になっている場合もある。これが 96 ウェルプレートの目詰りをおこす沈殿物を形成する原因となる。このような場合は遠心温度を 25℃ に設定する。gDNA Eliminator 96 Plate にライセートを入れる前に、ライセートを 37℃ で温める。

### RNA 収量が低い

- a) 破碎、ホモジナイゼーションが不十分 次回の調製ではスタートサンプル量を減らす（英語版 Handbook 14 ページの “Determining the amount of starting material” 参照）、および／あるいは溶解バッファアの量とホモジナイゼーション時間を増やす。
- b) スタートサンプル量が多すぎる gDNA Eliminator 96 Plate へのオーバーロードは RNA 収量を顕著に低下させる。スタートサンプル量を減らす（英語版 Handbook 14 ページ参照）。
- c) RNeasy 96 plate メンブレンに RNA が結合したまま RNA 溶出を再度行なうが、まず遠心操作前に RNase フリー水を RNeasy 96 Plate に入れ、実験台上で 10 分間インキュベートする。
- d) エタノールのキャリーオーバー Buffer RPE による二回目の洗浄では、6,000 x g (約 5,600 rpm) で 10 分間 (20～25℃) 遠心操作し、RNeasy 96 Plate メンブレンを乾燥させる。
- e) 細胞の培養液の除去が不完全 細胞回収後に培養液を完全に除去する（2、7 ページのプロトコル参照）。

## コメント

---

### 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 30 ページ、Appendix B 参照）。

### DNA が RNA に混入し、ダウンストリーム実験に影響する

- a) スタートサンプル量が  
多すぎる ある種の細胞タイプでは、処理する量が多すぎると gDNA Eliminator 96 Plate による DNA 除去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、サンプル量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 細胞培養液また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 gDNA Eliminator 96 Plate が効果的に DNA を除去しない。

### RNA が分解

- a) スタートサンプルの  
不適切な取り扱い サンプルを最適な方法で取り扱ったか、また、プロトコールを中断することなく行なったかの確認をする。詳細は Appendix A（英語版 Handbook 28 ページ）、“Handling and storage of starting material”（英語版 Handbook 16 ページ）および各プロトコールの“実験を始める前の重要事項”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。RNeasy Plus 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 28 ページ、Appendix A を参照する。

## コメント

---

**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
- バッファーは必ず20～30℃で使用する。  
操作中の各ステップで正しいバッファーを使用したことを確認する。  
プロトコールの各ステップで全溶液がメンブレンを完全に通過したことを確認する。  
洗浄ステップ中にS-Blockを再利用する際は、きれいなペーパータオル上でブロックを叩き、縁に付着した残りのろ液を除去する。
- 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、6,000 x g (約5,600 rpm) で10分間 (20～25℃) 遠心操作し、RNeasy 96 Plate メンブレンを乾燥させる。





Trademarks: QIAGEN®, RNAprotect®, RNeasy® (QIAGEN Group).

The Plate Rotor 2 x 96 is available exclusively from QIAGEN and its distributors. Under the current liability and warranty conditions, the rotor may only be used in Centrifuges 4-15C and 4K15C from QIAGEN, and freely programmable models of centrifuges 4-15, 4K15, 6-10, 6K10, 6-15, and 6K15 from Sigma Laborzentrifugen GmbH.

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。

© 2008 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.co.jp](http://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

