

AllPrep[®] 96 DNA/RNA プロトコールとトラブルシューティング

動物およびヒトの細胞／組織からゲノムDNAとトータルRNAを96ウェルフォーマットで同時に分離精製

目次	ページ
プロトコール	
吸引／遠心法を用いて細胞からのDNAおよびRNAの同時精製	2
遠心法を用いて細胞からのDNAおよびRNAの同時精製	9
吸引／遠心法を用いて組織からのDNAおよびRNAの同時精製	14
遠心法を用いて組織からのDNAおよびRNAの同時精製	21
トラブルシューティング	27



プロトコール：吸引／遠心法を用いて細胞からのDNAおよびRNAの同時精製

実験を始める前の重要事項

- AllPrep 96 DNA/RNA Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 17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 52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 14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 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 16ページの“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 13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 22ページ）を参考に洗浄します。
- 細胞ペレットは使用時まで-70℃で保存することも、すぐに調製することもできます。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中の細胞ライセートは-70℃で数カ月保存できます。使用時に凍結したライセートが解凍し塩類が溶解するまで、37℃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。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取り除きます。その後即座に以下の操作のステップ1bに進みます。
- Buffer RLT、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は英語版 Handbook 7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℃以下に冷却されていないことを確認します。

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、 β -ME (β -mercaptoethanol)をBuffer RLTに添加することをお奨めします。1 mlのBuffer RLT当たり10 μ l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を含むBuffer RLTは室温(15~25℃)で1ヶ月間まで保存できます。あるいはBuffer RLT 1 ml当たり20 μ 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は室温で最高1ヶ月間保存できます。
- 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。
- Buffer RLTは保存中に沈澱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。
- 最適なDNA溶出を確実にこなうため、前もってBuffer EBを70℃に加熱してください。

操作手順

サンプルの溶解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(最高 1×10^6 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 μ lのBuffer RLT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 Microtube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、核酸精製の条件が変化します。この結果、核酸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の量を200 μ lに減らします。

1b. 浮遊細胞:

各サンプルから 1×10^6 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 μ lのBuffer RLT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 Microtube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、核酸精製の条件が変化します。この結果、核酸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の量を200 µlに減らします。

2. **Collection Microtubes (racked)** を最高速度で30秒間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。

オプション：ボルテックスの代わりに**TissueLyser**を用いてライセートをホモジナイズすると、最高のDNA収量が得られます：

- 各コレクションマイクロチューブにステンレス・スチール製のビーズ（平均直径5 mm）を1個入れ、**Collection Microtube Caps**でチューブを密封する。

- **TissueLyser Adapter Set 2 x 96**にチューブを入れる。

- **TissueLyser**にセットして20 Hzで1分間破碎する。アダプターセットを外して、チューブのラックを回転し、**TissueLyser**に一番近いチューブが一番遠くなるようにして、アダプターセットをもう一度組み立てる。**TissueLyser**にセットしを20 Hzでさらに1分間破碎する。

チューブの配置を換えることにより、均一なホモジナイゼーションが行なえます。

- ステップ3に進む。

3. 新しい**S-Block**上に**AllPrep 96 DNA 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**AllPrep 96 DNA 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. **AllPrep 96 DNA Plate**を**AirPore Tape Sheet**でシールする。**S-Block**と**AllPrep 96 DNA 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。

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. **AllPrep 96 DNA Plate**を**S-Block**（新品あるいは再使用も可）にセットし、後で行なうステップ17～22のDNA精製のために室温（15～25℃）あるいは4℃で保存しておく。ろ液の入った**S-Block**を保存し、ステップ7～16でRNA精製に使用する。

S-Blockを再使用する場合は、英語版 Handbook 22ページに記載されているように洗浄します。

注：メンブレンが乾燥するのでAllPrep 96 DNA Plateを長期間保存しないでください。プレートを冷凍しないでください。

トータルRNA精製

7. **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 Plate**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にしておく。

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 Plate**を吸引マニホールドにセットします。

8. ステップ6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 µl)**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の量を200 µlに減らした場合は、200 µlの70%エタノールを添加します。

9. **RNeasy 96 Plate**のウェルにサンプル（600 µl）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) で未使用のウェルを密封します。AllPrep 96 DNA/RNA 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。

10. **RNeasy 96 Plate**の各ウェルに**800 µl**の**Buffer RW1**を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。バッファー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9と同じ**Waste tray**に回収されます。

11. **RNeasy 96 Plate**をセットした**QIAvac 96 top plate**を**QIAvac base**から持ち上げ、**Waste tray**に入っているろ液を棄て*、再度**QIAvac 96**吸引マニホールドを再びセットする。
12. **RNeasy 96 Plate**の各ウェルに**800 µl**の**Buffer RPE**を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。バッファー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）。
13. **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 22 ページに記載されているように洗浄します。
14. **800 µl**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℃**、**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。
15. **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、プレートを新しい**AirPore Tape Sheet**でシールする。室温で**1分間**インキュベートする（**15～25℃**）。**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。
16. **AirPore Tape Sheet**を剥がす。さらに**45～70 µl**の**RNaseフリー水**で**ステップ 15**を繰り返す。
注：RNAを完全に回収するためには**ステップ 15**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フリー水の量よりも約**15 µl**少なくなります（**15 µl**はメンブレンのテ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やBuffer RW1を含んだ廃液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 7ページをご覧ください。

ゲノムDNA精製

17. **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 **AllPrep 96 DNA Plate** (ステップ6から) 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 **AllPrep 96 DNA Plate** を吸引マニホールドにセットします。

18. **AllPrep 96 DNA Plate** の各ウェルに **800 µl** の **Buffer AW1** を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。バッファー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12と同じ **Waste tray** に回収されます*。

注： **Buffer AW1** は濃縮状態でお届けします。使用前にエタノールを **Buffer AW1** 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)。

19. **S-Block** (新品あるいは再使用も可) の上に **AllPrep 96 DNA Plate** を置く。

S-Block を再使用する場合は、英語版 **Handbook 22** ページに記載されているように洗浄します。

20. **800 µl** の **Buffer AW2** を **AllPrep 96 DNA 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 **AllPrep 96 DNA 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 **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、**AllPrep DNA** 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、DNA 溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。

注： **Buffer AW2** は濃縮状態でお届けします。使用前にエタノールを **Buffer AW2** 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)。

21. **AirPore Tape Sheet** を剥がす。**Elution Microtubes CL** の上に **AllPrep 96 DNA Plate** を置く。各ウェルに **50～100 µl** の **Buffer EB** (予め **70℃** に加熱) 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 **5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 **DNA** を溶出する。

注： **AllPrep DNA** メンブレン上に **Buffer EB** を直接ピペットで添加します。バッファーが **AllPrep 96 DNA Plate** の壁やリングに付着していると、溶出が不完全になります。

* **Buffer AW1** を含んだ廃液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 **Handbook 7** ページをご覧ください。

22. AirPore Tape Sheetを剥がす。さらに50～100 μ lのBuffer EBでステップ21を繰り返す。

注：DNAを完全に回収するためにはステップ21を繰り返す必要があります。
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。

プロトコール：遠心法を用いて細胞からのDNAおよびRNAの同時精製

実験を始める前の重要事項

- AllPrep 96 DNA/RNA Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 17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 52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 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 16ページの“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 13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 22ページ）を参考に洗浄します。
- 細胞ペレットは使用時まで-70℃で保存することも、すぐに調製することもできます。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中の細胞ライセートは-70℃で数カ月保存できます。使用時に凍結したライセートが解凍し塩類が溶解するまで、37℃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。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取り除きます。その後即座に以下の操作のステップ1bに進みます。
- Buffer RLT、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は英語版 Handbook 7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℃以下に冷却されていないことを確認します。

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、 β -ME (β -mercaptoethanol) をBuffer RLTに添加することをお奨めします。1 mlのBuffer RLT当たり10 μ l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を含むBuffer RLTは室温(15~25℃)で1ヶ月間まで保存できます。あるいはBuffer RLT 1 ml当たり20 μ 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は室温で最高1ヶ月間保存できます。
- 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。
- Buffer RLTは保存中に沈澱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。
- 最適なDNA溶出を確実にこなうため、前もってBuffer EBを70℃に加熱してください。

操作手順

サンプルの溶解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(最高 2×10^6 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 μ lのBuffer RLT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 Microtube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、核酸精製の条件が変化します。この結果、核酸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て操作中にクロスコンタミのリスクがある場合は、Buffer RLTの量を200 μ lに減らします。

1b. 浮遊細胞 :

各サンプルから 2×10^6 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 μ lのBuffer RLT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 Microtube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、核酸精製の条件が変化します。この結果、核酸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の量を200 µlに減らします。

2. **Collection Microtubes (racked)** を最高速度で30秒間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。

オプション：ボルテックスの代わりにTissueLyserを用いてライセートをホモジナイズすると、最高のDNA収量が得られます：

■ 各コレクションマイクロチューブにステンレス・スチール製のビーズ（平均直径5 mm）を1個入れ、Collection Microtube Capsでチューブを密封する。

■ TissueLyser Adapter Set 2 x 96にチューブを入れる。

■ TissueLyserにセットして20 Hzで1分間破碎する。アダプターセットを外して、チューブのラックを回転し、TissueLyserに一番近いチューブが一番遠くなるようにして、アダプターセットをもう一度組み立てる。TissueLyserにセットしを20 Hzでさらに1分間破碎する。

チューブの配置を換えることにより、均一なホモジナイゼーションが行なえます。

■ ステップ3に進む。

3. 新しいS-Block上にAllPrep 96 DNA 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AllPrep 96 DNA 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. AllPrep 96 DNA PlateをAirPore Tape Sheetでシールする。S-BlockとAllPrep 96 DNA 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。

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. AllPrep 96 DNA PlateをS-Block（新品あるいは再使用も可）にセットし、後で行なうステップ16～19のDNA精製のために室温（15～25℃）あるいは4℃で保存しておく。ろ液の入ったS-Blockを保存し、ステップ7～15でRNA精製に使用する。

S-Blockを再使用する場合は、英語版 Handbook 22ページに記載されているように洗浄します。

注：メンブレンが乾燥するのでAllPrep 96 DNA Plateを長期間保存しないでください。プレートを冷凍しないでください。

トータルRNA精製

7. **S-Block** (新しいものあるいは再使用) 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 22 ページに記載されているように洗浄します。
8. ステップ6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 µl)** 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の量を200 µlに減らした場合は、200 µlの70%エタノールを添加します。
9. **RNeasy 96 Plate** のウェルにサンプル (**600 µl**) 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。
10. **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°C、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。
11. **S-Block** 内のろ液* を棄て **AirPore Tape Sheet** を剥がす。**800 µl** 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°C、6,000 rpm (約5,600 x g)** で4分間遠心操作する。
12. **S-Block** 内のろ液を棄て ***AirPore Tape Sheet** を剥がす。**800 µl** 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°C、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)。
13. **S-Block** 内のろ液を棄て **AirPore Tape Sheet** を剥がす。**800 µl** 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°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。

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。
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、プレートを新しい **AirPore Tape Sheet** でシールする。室温 (**15~25°C**) で1分間インキュベートする。**20~25°C、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。

* Buffer RLTやBuffer RW1を含んだ廃液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 7ページをご覧ください。

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。溶出量は、メンブレンに添加したRNaseフリー水の量よりも約15 μl 少なくなります（15 μl はメンブレンのデッドボリウムに相当）。

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。

ゲノムDNA精製

16. 800 μl のBuffer AW1をステップ6からのAllPrep 96 DNA 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。

注：Buffer AW1は濃縮状態でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW1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）。

17. S-Block内のろ液を棄て*AirPore Tape Sheetを剥がす。800 μl のBuffer AW2をAllPrep 96 DNA 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、AllPrep DNA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、DNA溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。

注：Buffer AW2は濃縮状態でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW2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）。

18. AirPore Tape Sheetを剥がす。Elution Microtubes CLの上にAllPrep 96 DNA Plateを置く。各ウェルに50～100 μl のBuffer EB（予め70℃に加熱）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5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DNAを溶出する。

注：AllPrep DNAメンブレン上にBuffer EBを直接ピペットで添加します。バッファがAllPrep 96 DNA 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。

19. AirPore Tape Sheetを剥がす。さらに50～100 μl のBuffer EBでステップ18を繰り返す。

注：DNAを完全に回収するためにはステップ18を繰り返す必要があります。

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。

* Buffer AW1を含んだ廃液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版Handbook 7ページをご覧ください。

プロトコール：吸引／遠心法を用いて組織からのDNAおよびRNAの同時精製

実験を始める前の重要事項

- AllPrep 96 DNA/RNA Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 17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 52ページ）をお読みください。
- TissueRuptor™を使用する場合には、TissueRuptor User Manual（日本語版あり）およびTissueRuptor Handbook（英語版）を参照にして装置を使用してください。
- Tissuelyserを使用する場合には、Tissuelyser 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）参照にして装置を使用してください。
- 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 14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 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 16ページの“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 13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 22ページ）を参考に洗浄します。
- 最適な結果を得るには、採取した組織を即座にRNAlater® RNA Stabilization Reagent（RNAlater Handbook参照、日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）あるいはAllprotect Tissue Reagent（Allprotect Tissue Reagent Handbook参照、日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）中で安定化します。安定化試薬中で組織は37℃で最高1日、15～25℃で最高7日、あるいは2～8℃でRNAlaterでは最高4週間、Allprotectでは最高6ヶ月保存できます。あるいは-20℃か-80℃で組織を長期保存できます。
- 新鮮、凍結した組織、あるいはRNAlater/Allprotectで安定化した組織ともに使用できます。組織は-70℃で数ヶ月保存できます。液体窒素で瞬間凍結した組織は即座に-70℃に移します。Buffer RLT中で破碎するまで、凍結した組織を重量測定や取り扱いの際に解凍させないでください。ステップ2でのホモジナイズした組織ライセートも-70℃で数ヶ月保存できます。ステップ3を行なう前に、凍結したライセートは37℃の水浴中で完全に解凍し、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、長時間のインキュベートは避けてください。

- Buffer RLT、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 は英語版 Handbook 7 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℃以下に冷却されていないことを確認します。

実験開始前の準備事項

- β -ME (β -mercaptoethanol) は使用前に Buffer RLT に添加します。1 ml の Buffer RLT 当たり 10 μ l 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 を含む Buffer RLT は室温（15～25℃）で1ヶ月間まで保存できます。あるいは Buffer RLT 1 ml 当たり 20 μ 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 は室温で最高1ヶ月間保存できます。
- 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。
- Buffer RLT は保存中に沈澱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。
- 最適な DNA 溶出を確実にするため、前もって Buffer EB を 70℃ に加熱してください。

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を使用。サンプル組織の量を定める。5 mg 以上使用しない。すぐにステップ2に進む。

組織の重量測定がスタートサンプルを一番正確に定量できる方法です。必要に応じて、組織を清潔な台面上においてカットし、使用する切片の重量を測定します。

RNA_{later}あるいはAllProtectで安定化された組織：ピンセットで安定化試薬液から組織を取り出し、保存中に生じた結晶を確実に除去します。RNA_{later}あるいはAllprotectで安定化した組織内のRNAは、室温（15～25℃）でカットしたり、重量測定している間保護されています。従って氷上やドライアイスあるいは低温室で組織をカットする必要はありません。残った組織はRNA_{later} RNA Stabilization ReagentあるいはAllprotect Reagentに入れて保存します。既に安定化されている組織は安定化試薬無しでそのまま-80℃で保存できます。

安定化されていない新鮮な組織あるいは凍結組織：組織をRNA^{later}あるいはAllprotect Reagentで処理、瞬間凍結、あるいはステップ2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。凍結組織が操作中に解凍しないように注意してください。関連した操作はできるだけ迅速に行なってください。残った新鮮な組織はRNA安定化のためにRNA^{later} Reagent内で、あるいはDNA、RNA、タンパク質を安定化するためにAllprotect Tissue Reagent内で保存できます。しかし、既に凍結した組織ではこの試薬内での解凍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。

2. ステップ2a (TissueRuptor)、2b (TissueLyser) に従って組織を破碎し、Buffer RLT (5 mg以下の組織を使用) 中でライセートをホモジナイズする。低温条件で組織を破壊することも可能：この場合、Appendix Gのガイドライン (英語版 Handbook 66ページ) に従う。

注：使用前にβ-ME (あるいはDTT) 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)。

RNA^{later}あるいはAllprotect 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。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。

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およびRNeasy Plateの目詰まりの原因になります。TissueRuptorあるいはTissueLyserを用いたホモジナイゼーションの方が他の方法より核酸収量が一般的に増加します。しかしこれらのホモジナイザーを用いたホモジナイゼーションの時間が長いと、DNAの断片化が増加します。

2a. TissueRuptorを用いた破碎およびホモジナイゼーション：

- 組織を適切な大きさの容器に入れる。350 µlのBuffer RLTを添加する。

注：ホモジナイゼーション中に泡が生じる可能性があるため、十分な容量を持つ最適な大きさの容器を使用します。

一般的にコニカルチューブよりも丸底チューブの方が効率的に破碎やホモジナイズを行なえます。

- TissueRuptorのディスプレイザブル・プローブのチップを容器に入れて、ライセートが均一になるまでTissueRuptorを最高速度で操作する (通常30秒)。ステップ3に進む。

注：操作中にTissueRuptorとディスプレイザブル・プローブへの損傷を避けるため、プローブの先端をバッファに必ず沈めてください。

ホモジナイゼーションの際に気泡が生じることがあります。気泡が形成した場合には、ホモジネートを室温で2～3分放置し、泡が消えてから次のプロトコールステップに進みます。

2b. TissueLyserを用いた破碎およびホモジナイゼーション:

- 直径5 mmのステンレススチール製ビーズ1個が入った**Collection Microtubes (racked) (Cat. no. 19560)**に組織を入れる。

新鮮あるいは凍結した組織サンプルを取り扱う際は、チューブをドライアイス上に置きます。

- チューブを室温にする。チューブ当たり**350 μ l**のBuffer RLTを即座に添加する。

- **Collection Microtube Caps (Cat. no. 19566)**を装着し、**TissueLyser Adapter Set 2 x 96**にチューブを入れる。

- **TissueLyser**にセットして**25 Hz**で**2分間**破碎する。

時間は組織により異なりますが、組織が完全にホモジナイズされるまで破碎を継続します。

- アダプターセットを外して、チューブのラックを回転し、**TissueLyser**に一番近いチューブが一番遠くなるようにして、アダプターセットをもう一度組み立てる。**TissueLyser**にセットしを**25 Hz**でさらに**2分間**破碎する。

チューブの配置を換えることにより、均一なホモジナイゼーションが行なえます。

- **ステップ3**に進む。

ステンレススチール製ビーズは再使用しないでください。

3. 新しい**S-Block**上に**AllPrep 96 DNA 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からのライセートを**20~25℃**、**6,000 rpm** (約**5,600 x g**)で**4分間**遠心操作する。ピペットで注意深く上清を採取し、**AllPrep 96 DNA 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. **AllPrep 96 DNA Plate**を**AirPore Tape Sheet**でシールする。**S-Block**と**AllPrep 96 DNA 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。

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. **AllPrep 96 DNA Plate**を**S-Block** (新品あるいは再使用も可)にセットし、後で行なう**ステップ17~22**のDNA精製のために室温 (**15~25℃**) あるいは**4℃**で保存しておく。ろ液の入った**S-Block**を保存し、**ステップ7~16**でRNA精製に使用する。

S-Blockを再使用する場合は、英語版 Handbook 22ページに記載されているように洗浄します。

注：メンブレンが乾燥するのでAllPrep 96 DNA Plateを長期間保存しないでください。プレートを冷凍しないでください。

トータルRNA精製

7. **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** をびったりと載せる。**QIAvac 96 top plate** の中に **RNeasy 96 Plate** 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にしておく。

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 Plate** を吸引マニホールドにセットします。

8. **ステップ6** のろ液が入った **S-Block** の各ウェルに等量の **70%エタノール (350 µl)** を添加する。ピペットで **3回** 吸排出してよく混和する。

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。

9. **RNeasy 96 Plate** のウェルにサンプル (**700 µl**) 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)** で未使用のウェルを密封します。AllPrep 96 DNA/RNA 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。

10. **RNeasy 96 Plate** の各ウェルに **800 µl** の **Buffer RW1** を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。バッファー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9** と同じ **Waste tray** に回収されます。

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

12. **RNeasy 96 Plate** の各ウェルに **800 µl** の **Buffer RPE** を添加し、吸引装置のスイッチを入れる。バッファー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。

* Buffer RLTやBuffer RW1を含んだ廃液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 7ページをご覧ください。

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）。

13. **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 22 ページに記載されているように洗浄します。

14. **800 µl**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℃**、**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。

15. **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の壁やリングに付着していると、溶出が不完全になります。

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

注：RNAを完全に回収するためにはステップ15を繰り返す必要があります。溶出量は、メンブレンに添加したRNaseフリー水の量よりも約**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。

ゲノムDNA精製

17. **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**AllPrep 96 DNA Plate**（ステップ6から）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にしておく。

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**AllPrep 96 DNA Plate**を吸引マニホールドにセットします。

18. **AllPrep 96 DNA Plate**の各ウェルに **800 µl**の **Buffer AW1**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12と同じWaste trayに回収されます*。

注：Buffer AW1は濃縮状態でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW1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）。

19. **S-Block**（新品あるいは再使用可）の上に **AllPrep 96 DNA Plate**を置く。

S-Blockを再使用する場合は、英語版 Handbook 22 ページに記載されているように洗浄します。

20. **800 µl**の **Buffer AW2**を **AllPrep 96 DNA 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 **AllPrep 96 DNA 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 **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、AllPrep DNA 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、DNA 溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。

注：Buffer AW2は濃縮状態でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW2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）。

21. **AirPore Tape Sheet**を剥がす。**Elution Microtubes CL**の上に **AllPrep 96 DNA Plate**を置く。各ウェルに **50～100 µl**の **Buffer EB**（予め **70℃**に加熱）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 **5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 **DNA**を溶出する。

注：AllPrep DNA メンブレン上にBuffer EBを直接ピペットで添加します。バッファがAllPrep 96 DNA 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。

22. **AirPore Tape Sheet**を剥がす。さらに **50～100 µl**の **Buffer EB**でステップ21を繰り返す。

注：DNAを完全に回収するためにはステップ21を繰り返す必要があります。

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。

* Buffer AW1を含んだ廃液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 7ページをご覧ください。

プロトコール：遠心法を用いて組織からのDNAおよびRNAの同時精製

実験を始める前の重要事項

- AllPrep 96 DNA/RNA Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 17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 52ページ）をお読みください。
- TissueRuptorを使用する場合には、TissueRuptor User Manual（日本語版あり）およびTissueRuptor Handbook（英語版）を参照にして装置を使用してください。
- Tissuelyserを使用する場合には、Tissuelyser 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）参照にして装置を使用してください。
- すべての遠心ステップは、Plate Rotor 2 x 96を装備したCentrifuge 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 16ページの“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 13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 22ページ）を参考に洗浄します。
- 最適な結果を得るには、採取した組織を即座にRNA_{later} RNA Stabilization Reagent（RNA_{later} Handbook参照、日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）あるいはAllprotect Tissue Reagent（Allprotect Tissue Reagent Handbook参照、日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）中で安定化します。安定化試薬中で組織は37℃で最高1日、15～25℃で最高7日、あるいは2～8℃でRNA_{later}では最高4週間、Allprotectでは最高6ヶ月保存できます。あるいは-20℃か-80℃で組織を長期保存できます。
- 新鮮、凍結した組織、あるいはRNA_{later}/Allprotectで安定化した組織ともに使用できます。組織は-70℃で数ヶ月保存できます。液体窒素で瞬間凍結した組織は即座に-70℃に移します。Buffer RLT中で破碎するまで、凍結した組織を重量測定や取り扱いの際に解凍させないでください。ステップ2でのホモジナイズした組織ライセートも-70℃で数カ月保存できます。ステップ3を行なう前に、凍結したライセートは37℃の水浴中で完全に解凍し、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、長時間のインキュベートは避けてください。
- Buffer RLT、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は英語版 Handbook 7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℃以下に冷却されていないことを確認します。

実験開始前の準備事項

- 1 mlのBuffer RLT当たり10 μ l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を含むBuffer RLTは室温（15～25℃）で1ヶ月間まで保存できます。あるいはBuffer RLT 1 ml当たり20 μ 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は室温で最高1ヶ月間保存できます。
- 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。
- Buffer RLTは保存中に沈澱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。
- 最適なDNA溶出を確実にこなうため、前もってBuffer EBを70℃に加熱してください。

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を使用。サンプル組織の量を定める。10 mg以上使用しない。すぐにステップ2に進む。

組織の重量測定がスタートサンプルを一番正確に定量できる方法です。必要に応じて、組織を清潔な台上に置いてカットし、使用する切片の重量を測定します。

RNA_{later}あるいはAllProtectで安定化された組織：ピンセットで安定化試薬液から組織を取り出し、保存中に生じた結晶を確実に除去します。RNA_{later}あるいはAllprotectで安定化した組織内のRNAは、室温（15～25℃）でカットしたり、重量測定している間保護されています。従って氷上やドライアイスあるいは低温室で組織をカットする必要はありません。残った組織はRNA_{later} RNA Stabilization ReagentあるいはAllprotect Reagentに入れて保存します。既に安定化されている組織は安定化試薬無しでそのまま-80℃で保存できます。

安定化されていない新鮮な組織あるいは凍結組織：組織をRNA_{later}あるいはAllprotect Reagentで処理、瞬間凍結、あるいはステップ2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。凍結組織が操作中に解凍しないように注意してください。関連した操作はできるだけ迅速に行なってください。残った新鮮な組織はRNA安定化のためにRNA_{later} Reagent内で、あるいはDNA、RNA、タンパク質を安定化するためにAllprotect Tissue Reagent内で保存できます。しかし、既に凍結した組織ではこの試薬内での解凍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。

2. ステップ2a (TissueRuptor)、2b (TissueLyser) に従って組織を破碎し、Buffer RLT (10 mg以下の組織を使用) 中でライセートをホモジナイズする。低温条件下で組織を破壊することも可能：この場合、Appendix Gのガイドライン (英語版 Handbook 66 ページ) に従う。

注：使用前にβ-ME (あるいはDTT) 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)。

RNA later あるいは Allprotect 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。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。

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 および RNeasy Plate の目詰まりの原因になります。TissueRuptor あるいは TissueLyser を用いたホモジナイゼーションの方が他の方法より核酸収量が増加します。しかしこれらのホモジナイザーを用いたホモジナイゼーションの時間が長いと、DNA の断片化が増加します。

2a. TissueRuptor を用いた破碎およびホモジナイゼーション：

- 組織を適切な大きさの容器に入れる。350 μl の Buffer RLT を添加する。

注：ホモジナイゼーション中に泡が生じる可能性があるため、十分な容量を持つ最適な大きさの容器を使用します。

一般的にコニカルチューブよりも丸底チューブの方が効率的に破碎やホモジナイズを行なえます。

- TissueRuptor のディスプレイ・プローブのチップを容器に入れて、ライセートが均一になるまで TissueRuptor を最高速度で操作する (通常 30 秒)。ステップ3に進む。

注：操作中に TissueRuptor とディスプレイ・プローブへの損傷を避けるため、プローブの先端をバッファに必ず沈めてください。

ホモジナイゼーションの際に気泡が生じる場合があります。気泡が形成した場合には、ホモジネートを室温で 2~3 分放置し、泡が消えてから次のプロトコールステップに進みます。

2b. TissueLyser を用いた破碎およびホモジナイゼーション：

- 直径 5 mm のステンレススチール製ビーズ 1 個が入った Collection Microtubes (racked) (Cat. no. 19560) に組織を入れる。

新鮮あるいは凍結した組織サンプルを取り扱う際は、チューブをドライアイス上に置きます。

- チューブを室温にする。チューブ当たり 350 μl の Buffer RLT を即座に添加する。

- Collection Microtube Caps (Cat. no. 19566) を装着し、TissueLyser Adapter Set 2 x 96 にチューブを入れる。

■ **Tissuelyser** にセットして **25 Hz** で **2 分間** 破碎する。

時間は組織により異なりますが、組織が完全にホモジナイズされるまで破碎を継続します。

■ **アダプターセット** を外して、チューブのラックを回転し、**Tissuelyser** に一番近いチューブが一番遠くなるようにして、**アダプターセット** をもう一度組み立てる。**Tissuelyser** にセットしを **25 Hz** でさらに **2 分間** 破碎する。

チューブの配置を換えることにより、均一なホモジナイゼーションが行なえます。

■ **ステップ3** に進む。

ステンレススチール製ビーズは再使用しないでください。

3. 新しい **S-Block** 上に **AllPrep 96 DNA 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からのライセートを **20 ~ 25 °C**、**6,000 rpm** (約 **5,600 x g**) で4分間遠心操作する。ピペットで注意深く上清を採取し、**AllPrep 96 DNA 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. **AllPrep 96 DNA Plate** を **AirPore Tape Sheet** でシールする。**S-Block** と **AllPrep 96 DNA 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 °C**、**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。

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. **AllPrep 96 DNA Plate** を **S-Block** (新品あるいは再使用も可) にセットし、後で行なうステップ16 ~ 19のDNA精製のために室温 (**15 ~ 25 °C**) あるいは **4 °C** で保存しておく。ろ液の入った **S-Block** を保存し、ステップ7 ~ 15でRNA精製に使用する。

S-Block を再使用する場合は、英語版 Handbook 22 ページに記載されているように洗浄します。

注：メンブレンが乾燥するので **AllPrep 96 DNA Plate** を長期間保存しないでください。プレートを冷凍しないでください。

トータルRNA精製

7. **S-Block** (新しいものあるいは再使用) 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 22 ページに記載されているように洗浄します。

8. ステップ6のろ液が入ったS-Blockの各ウェルに等量の70%エタノール (350 μ l) を添加する。ピペットで3回吸排出してよく混和する。

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。

9. RNeasy 96 Plateのウェルにサンプル (700 μ 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。

10. 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。

密封したプレートで遠心することによりクロスコンタミを回避します。

11. S-Block内のろ液を棄て*AirPore Tape Sheetを剥がす。800 μ 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。

12. S-Block内のろ液を棄て*AirPore Tape Sheetを剥がす。800 μ 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)。

13. S-Block内のろ液を棄てAirPore Tape Sheetを剥がす。800 μ 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。

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 μ 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。

* Buffer RL1やBuffer RW1を含んだ廃液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 7ページをご覧ください。

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フリー水の量よりも約15 μl 少なくなります（15 μl はメンブレンのテッドボリュウムに相当）。

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。

ゲノムDNA精製

16. 800 μl のBuffer AW1をステップ6からのAllPrep 96 DNA 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。

注：Buffer AW1は濃縮状態でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW1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）。

17. S-Block内のろ液を棄て*AirPore Tape Sheetを剥がす。800 μl のBuffer AW2をAllPrep 96 DNA 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、AllPrep DNA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、DNA溶出の際に溶出液にエタノールが混入しません。

注：Buffer AW2は濃縮状態でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW2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）。

18. AirPore Tape Sheetを剥がす。Elution Microtubes CLの上にAllPrep 96 DNA Plateを置く。各ウェルに50～100 μl のBuffer EB（予め70℃に加熱）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5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DNAを溶出する。

注：AllPrep DNAメンブレン上にBuffer EBを直接ピペットで添加します。バッファがAllPrep 96 DNA Plateの壁やリングに付着していると、溶出が不完全になります。

19. AirPore Tape Sheetを剥がす。さらに50～100 μl のBuffer EBでステップ18を繰り返す。

注：DNAを完全に回収するためにはステップ18を繰り返す必要があります。

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。

* Buffer AW1を含んだ廃液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版Handbook 7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) 不完全な破碎および／
あるいはホモジナイ
ゼーション
- 破碎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 Handbook 20 ページ）を参照する。
- 吸引と遠心を組み合わせたプロトコールの代わりに遠心プロトコールを使用する。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 17 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) スタート材料が
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 17 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 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。このような場合には遠心機を 25℃に設定する。AllPrep 96 DNA Plate にライセートを入れる前に、ライセートを 37℃で温める。

核酸収量が低い

- a) 不完全な破碎と
ホモジナイゼーション
- 破碎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 Handbook 20 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（英語版 Handbook 17 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) スタート材料が
多すぎる
- AllPrep 96 DNA Plate へのオーバーロードは核酸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 の 17 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。

コメント

- d) DNAが AllPrep 96 DNA Plate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 (70℃) を AllPrep 96 DNA Plateに入れて実験台上で10分間インキュベートする。
次の調製には、サンプルをさらに完全にホモジナイズする（英語版 Handbook 22ページの“Effect of homogenization on DNA yield and integrity” 参照）。
- e) エタノールの混入
Buffer RPEによる二回目の洗浄中および Buffer AW2での洗浄中は、6,000 x g（約 5,600 rpm）で10分間（20～25℃）遠心操作し、RNeasy 96 Plateおよび AllPrep 96 DNA Plateのメンブレンを乾燥させる。
- f) 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、9ページ、プロトコール参照）。

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 54 ページ、Appendix B 参照）。

DNA に RNA が混入している

- a) AllPrep 96 DNA Plate に入れたライセートがエタノールを含む
AllPrep 96 DNA plate 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性あるいは酸性でないことを確認し、Buffer RLТ を添加する前に過剰の細胞培養液あるいは安定化試薬は取り除く。

DNA が RNA に混入し、ダウンストリーム実験に影響する

- a) スタート材料が多すぎる
ある種の細胞および組織タイプでは、処理する量が多すぎると AllPrep 96 DNA Plate 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、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 AllPrep 96 DNA Plate は効果的に DNA を結合しない。

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 52 ページ），“Handling and storage of starting material”（英語版 Handbook 19 ページ）および各プロトコルの“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。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 52 ページ、Appendix A を参照する。

DNAの断片化

- 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（例えばローター/ステーター方式ホモジナイザーの代わりに QIAshredder ホモジナイザーを使用；しかし英語版 Handbook 22 ページの“Effect of homogenization on DNA yield and integrity”を参照すること）。

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ーオーバー バッファーは必ず 20 ~ 30 °C 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) エタノールの混入 Buffer RPE による二回目の洗浄中および Buffer AW2 での洗浄中は、6,000 x g（約 5,600 rpm）で 10 分間（20 ~ 25 °C）遠心操作し、RNeasy 96 Plate および AllPrep 96 DNA Plate のメンブレンを乾燥させる。

Trademarks: QIAGEN®, AllPrep®, RNAprotect®, RNeasy®, TissueRuptor™ (QIAGEN Group).

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

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

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

