

RNeasy® Plus Mini

プロトコールとトラブルシューティング

gDNA Eliminator カラムを用いた動物細胞および
溶解しやすい動物組織からのトータル RNA 精製

目次	ページ
プロトコール	
動物細胞からのトータル RNA 精製	2
動物組織からのトータル RNA 精製	8
トラブルシューティング	15



プロトコール：動物細胞からのトータル RNA 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
- gDNA Eliminator スピンカラムの DNA 除去のための結合容量
- RNeasy スピンカラムの 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 個の細胞あたり約 35 µg の RNA)。RNeasy スピンカラムの 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 個の細胞あたり約 15 µg の RNA)。RNeasy スピンカラムの 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 個の細胞あたり約 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 13 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無い場合には、 $3 \sim 4 \times 10^6$ 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 の精製の際に DNA が混入する原因となるため、gDNA Eliminator スピンカ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 スピンカラムをオーバーロードしないでください。

Table 3 (英語版 Handbook 14 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

- RNeasy Plus 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。
- RNA を初めて調製する場合には Appendix A（英語版 Handbook 34 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、 $3,000 \sim 5,000 \times g$ 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 を続いて行ないます。
- 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 あたり 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 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 4 倍容量のエタノール（96 \sim 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 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 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

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（別途準備）中で $300 \times g$ 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、DNA 除去や RNA 精製の条件が変化し、その結果、RNA 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、DNA 除去や RNA 精製の条件が変化し、その結果、RNA 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（別途準備）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、DNA 除去や RNA 精製の条件が変化し、その結果、RNA 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（表 5 参照）。ボルテックスあるいはピペットで混和し、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（3 ページの“実験を始める前の重要事項”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
$< 5 \times 10^6$	350 μ l
$5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	600 μ l

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収集し、マイクロ遠心チューブ (別途準備) 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和し、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 (3 ページの “実験を始める前の重要事項” 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 μ l
6 ~ 10 cm	600 μ l

* 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 15 ページの “Disruption and homogenization of starting material” を参照してください。 1×10^6 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нка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нка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 分間遠心する。ステップ 4 に進む。

3b. **TissueRuptor™** 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 (キットに同梱) にセットした **gDNA Eliminator** スピнкаラムに入れる。8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 30 秒間遠心する。カラムを捨てて、フロースルー液を保存する。

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. フロースルー液に同容量の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：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。

6. 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（キットに同梱）の中にセットした RNeasy スピнкаラムにアプライする。チューブの蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる*。

ステップ7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нка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、フロースルー液を棄てます*。

7. 700 μ l の Buffer RW1 を RNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗淨するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる*。

ステップ8でコレクションチューブを再使用します。

注：遠心操作後、RNeasy スピнкаラムがフロースルー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。

8. 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗淨するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる。

ステップ9でコレクションチューブを再使用します。

注：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（3 ページの“実験を始める前の重要事項”を参照）。

9. 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗淨するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心する。

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ア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、カラムがフロースルー液に触れて、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нкаラムを注意して取り除いてください。

* フロースルー液は Buffer RLT Plus あるいは Buffer RW1 を含んでいるので、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。

10. 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（キットに同梱）に移し、フロースルー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 分間遠心する。

ステップ 9 の後 RNeasy スピнкаラムの外側にフロースルー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。

11. RNeasy スピнкаラムを新しい 1.5 ml のコレクションチューブ（キットに同梱）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、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作を行ない、RNA を溶出する。

12. 予想した RNA 量が 30 μ g を越える場合には、新しい RNase フリー水 30 ~ 50 μ l を用いて、あるいはステップ 11 での溶出液を用いて（高濃度の RNA が必要な場合）ステップ 11 を再度行なう。ステップ 11 のコレクションチューブに溶出する。

ステップ 11 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。

プロトコール：動物組織からのトータル RNA 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、最高 30 mg の新鮮、あるいは凍結した組織、または RNAlater[®] または Allprotect 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。gDNA Eliminator スピнкаラムの DNA 除去容量、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 13 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%エタノールを使用すべきです。

脾臓、胸腺のような組織は DNA の含有量が高いため、gDNA Eliminator スピнкаラムがオーバーロードになります。これらの組織では RNase-Free DNase Set と組み合わせて RNeasy Mini Kit をご利用になることを推奨します（英語版 Handbook 49 ページの “ordering information” 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、収量が低いことがあります。Proteinase K 分解は RNeasy Plus Mini Kit と一緒に使用できません。これらの組織から最大量の RNA を精製するには RNeasy Fibrous Tissue Kit（英語版 Handbook 49 ページの “ordering information” を参照）のご利用を推奨します。

お客様のスタートサンプルの性質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 の精製の際に DNA が混入する原因となるため、gDNA Eliminator 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

- RNeasy Plus 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。
- RNA を初めて調製する場合には Appendix A（英語版 Handbook 34 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} または Allprotect Reagent 中で即座に安定化します（RNA_{later} または Allprotect Handbook を参照、日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）。試薬中の組織は 37℃ で最高 1 日、18 ~ 25℃ で 7 日間、2 ~ 8℃ で 4 週間、また -20℃ か -80℃ では長期保存できます。
- 新鮮、凍結、RNA_{later} あるいは Allprotect 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℃ 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℃ 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を 37℃ 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℃ 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 あたり 10 μl β-ME)。適切な保護着を着用して、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℃) で 1 ヶ月間安定です。
- Buffer RPE 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 4 倍容量のエタノール (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 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 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℃ 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。

操作手順

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**または**Allprotect**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**または**Allprotect**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**に進む。

RNAlaterまたは**Allprotect**で処理した組織内のRNAは、室温（18～25℃）でカットしたり、重量測定している間安定化されています。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**または**Allprotect Reagent**に入れて保存、既に安定化されている組織は溶液なしでそのまま-80℃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**に進む。

組織を**RNAlater**または**Allprotect Reagent**処理、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**または**Allprotect Reagent**に入れRNAを安定化することができます（**RNAlater**または**Allprotect Handbook**を参照、日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）。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** 15 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 β -ME を添加したかを確認します（9 ページの “実験を始める前の重要事項” を参照）。

RNA_{later} または 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。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、RNeasy スピнкаラムの目詰まりの原因になります。Tissuelyser やローター／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方が他の方法より RNA 収量が増加します。

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} または Allprotect 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. TissueRuptor 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}、Allprotect 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）；TissueRuptor 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）。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} または Allprotect 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（別途準備）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нка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、*RNAlater* または *Allprotect* 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（別途準備）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 II* あるいは *Tissuelyser LT* を用いた破碎およびホモジナイゼーション：
Tissuelyser Handbook あるいは *Tissuelyser LT Handbook* を参照する（日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）。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（キットに同梱）にセットした *gDNA Eliminator* スピнкаラムに入れる。8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 30 秒間遠心する。カラムを捨てて、フロースルー液を保存する。

最初の遠心ステップは *gDNA Eliminator* スピнкаラムの目詰りや DNA 除去を妨害する原因となる不要物を除去するための重要なステップです。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. フロースルー液に同容量の 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。すぐにステップ 6 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。

6. 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（キットに同梱）の中にセットした RNeasy スピнкаラムにアプライする。チューブの蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる*。

ステップ7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нка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、フロースルー液を棄てます。

7. 700 μ l の Buffer RW1 を RNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗浄するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる*。

ステップ8でコレクションチューブを再使用します。

注：遠心操作後、RNeasy スピнкаラムがフロースルー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。

8. 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗浄するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる。

ステップ9でコレクションチューブを再使用します。

注：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（9 ページの“実験を始める前の重要事項”を参照）。

9. 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗浄するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心する。

長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥し、RNA 溶出中に絶対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阻害することがあります。

注：遠心操作後、カラムがフロースルー液に触れて、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注意して RNeasy スピнкаラムを取り除いてください。

10. 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（キットに同梱）に移し、フロースルー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 分間遠心する。

ステップ9の後 RNeasy スピнкаラムの外側にフロースルー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。

* フロースルー液は Buffer RLT Plus あるいは Buffer RW1 を含んでいるので、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。

11. RNeasy スピンカラムを新しい 1.5 ml のコレクションチューブ (キットに同梱) に移す。RNase フリー水 30 ~ 50 μ l を直接スピンカラム・メンブレンに添加する。チューブを静かに閉め、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 1 分間遠心操作を行ない、RNA を溶出する。
12. 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 11 での溶出液を用いて (高濃度の RNA が必要な場合) ステップ 11 を再度行なう。ステップ 11 のコレクションチューブに溶出する。

ステップ 11 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。

トラブルシューティング

コメント

gDNA Eliminator スピнкаラムが目詰まり

- a) 破砕および／あるいは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 Handbook 15 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 8 ページ、プロトコル参照）。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 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 gDNA Eliminator スピнкаラムの目詰りを起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。gDNA Eliminator スピнкаラムにライセートを入れる前に、37℃でライセートを温める。

RNA 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 Handbook 15 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 8 ページ、プロトコル参照）、または溶解バッファー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
- RNeasy スピнкаラム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 12 ページ参照）。
- c) DNA 除去前にライセートにエタノールを添加
- ライセートにエタノールを添加する前にライセートの gDNA Eliminator スピнкаラム処理を行なう。
- d) RNA がスピнкаラム・メンブレンに結合したまま
- RNA 溶出を再度行なうか、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

- e) エタノールが
キャリアオーバー
- Buffer RPE で二回目の洗浄を行なう際に、RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥させるために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間 (20 ~ 25 °C) 必ず遠心する。
- カラムの外側にフロースルー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 10)。
- 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)。

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 36 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_{later} または Allprotect 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。RNeasy 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 34 ページの Appendix A および "Handling and storing starting material" (英語版 Handbook 15 ページ) を参照する。
- b) RNase の混入
- すべての RNeasy バッファーは試験済みで RNase フリーであることが保証されているが、RNase は使用中に混入することがある。RNeasy 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 34 ページの Appendix A を参照する。

* 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 safety data sheet) をご覧ください。

ダウンストリーム実験で DNA が混入

- a) 細胞数が多すぎる ある種の細胞タイプでは、細胞数が多すぎると DNA 除去の効率が低下することがある（ゲノム DNA を 20 µg 以上含む）。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 gDNA Eliminator スピнкаラムは効果的に作用しない。
- c) 組織の DNA 含有量が高い DNA 含量の非常に高いある種の組織（例；脾臓）では DNA が完璧に除去されないことがある。サンプル量を減らして再度行なうか（ゲノム DNA を 20 µg 以下に）、溶出した RNA を DNase 分解し、その後 RNA をクリーンアップする。

RNA 濃度が低すぎる

溶出量が多すぎた RNA を 2 x 50 µl より少量の水で溶出する。1 x 30 µl 以下の水は使用しないこと。2 x 50 µl 以下の水で溶出すると RNA 濃度は増加するが、RNA 収量は低下することがある。

RNA 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 Buffer RPE は必ず 20 ~ 30°C で使用する。
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フロースルー液を除去する。
- b) 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、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間 (20 ~ 25°C) 遠心し、必ず RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥させる。遠心操作後、カラムがフロースルー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ーオーバーを防止する。
カラムの外側にフロースルー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 10）。

Trademarks: QIAGEN®, RNeasy®, TissueRuptor™ (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 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。

© 2010 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

