

## AllPrep<sup>®</sup> DNA/RNA Micro プロトコールとトラブルシューティング

同一の少量サンプルからゲノムDNAおよび  
トータルRNAを同時に分離精製

動物およびヒト細胞 ( $\leq 5 \times 10^5$ )

動物およびヒト組織 ( $\leq 5$  mg)

マイクロダイセクションで採取した凍結切片



# 目次

## プロトコール

動物およびヒト細胞からのゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製	3
動物およびヒト組織からのゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製	11
マイクロダイセクション法により採取した凍結切片からの ゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製	19
トラブルシューティング	24

# プロトコール：動物およびヒト細胞からのゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製

## スタートサンプル量の正確な測定

最高の核酸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。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
- AllPrep DNA Spin ColumnのDNA結合容量
- RNeasy® MinElute® Spin ColumnのRNA結合容量（45 µg RNA）
- 効率的な溶解に必要なBuffer RLT Plusの量

さらに細胞破片はAllPrep DNAおよびRNeasy MinElute Spin Columnの結合容量を低下することがあります。処理する細胞がTable 2（英語版Handbook 14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ない場合には、 $5 \times 10^5$ 個以下の細胞で実験を開始することを推奨します。

**RNAとともにDNAが精製される原因となるため、AllPrep DNA Spin Column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 MinElute Spin Columnをオーバーロードしないでください。**

スタートサンプル量を定量する最も正確な方法は細胞を数えることです。指標として、様々な容器中でコンフルエントになるまで培養したHeLa細胞の数を表4に記載しています。

## 実験を始める前の重要事項

- AllPrep DNA/RNA Micro 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。
- 初めてRNAを調製する場合にはAppendix A（英語版Handbook 44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）を参照して装置を使用してください。
- 細胞ペレットは使用時まで $-70$  で保存することも、直ぐに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。ステップ2でチューブを指で軽く叩いて細胞ペレットをルーズにするために、凍結した細胞ペレットは少し解凍します。ステップ3でホモジナイズした細胞ライセートは数ヶ月間 $-70$  で保存できます。使用する際は凍結したライセートを解凍し、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。溶解していない物質が存在する場合には、 $3,000 \sim 5,000 \times g$ で5分間遠心してください。上清を新しいRNeasy フリーのガラス製あるいはポリプロピレン製チューブに移し、ステップ4に進みます。

表4. 様々な容器で培養したHeLa細胞の数と培養面積

細胞培養容器	培養面積 (cm <sup>2</sup> )*	細胞数†
マルチウェル・プレート		
■ 96ウェル	0.32 ~ 0.6	4 ~ 5 × 10 <sup>4</sup>
■ 48ウェル	1	1 × 10 <sup>5</sup>
■ 24ウェル	2	2.5 × 10 <sup>5</sup>
■ 12ウェル	4	5 × 10 <sup>5</sup>
■ 6ウェル	9.5	1 × 10 <sup>6</sup> ‡
ディッシュ		
■ 35 mm	8	1 × 10 <sup>6</sup> ‡
フラスコ		
■ 40 ~ 50 ml	25	3 × 10 <sup>6</sup> ‡

\* マルチウェル・プレートを使用する場合のウェルあたりの数；メーカーによりわずかに変動する。

† HeLa細胞（長さ約 15 μm）をコンフルエントになるまで培養した場合の細胞数。細胞数は動物細胞やヒト細胞の種類（長さは 10 ~ 30 μm）により変動する。

‡ この細胞数はRNeasy MinElute Spin Columnの最大結合許容量を超えている。この多数の細胞を処理するには、適切に分割したライセート（各 5 × 10<sup>5</sup>個の細胞以下）をそれぞれAllPrep DNA Mini Spin Columnにロードする。

- RNeasy Protect<sup>®</sup> Cell Reagent中に保存した細胞もこの精製法に使用できます。保存容器の底に沈殿している物質も含めて全サンプルを遠心チューブに移します。5,000 × gで5分間遠心して細胞をペレットとし、ピペットで上清を除去（必要があれば遠心操作前にサンプルを解凍）します。すぐにステップ2に進みます。
- Buffer RLT Plus、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 °C）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一般的なマイクロ遠心機を用いて20 ~ 25 °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。

## 実験を始める前の準備事項

- 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 Buffer RLT Plus あたりβ-ME 10 μl を添加します。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 Plus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。
- 500個未満の細胞を処理する際、ホモジナイゼーション前にキャリアRNAをライセートに添加可能です(英語版 Handbook 17ページの“Carrier RNA”を参照)。初めて使用する前にキャリアRNA(310 μg)を1 mlのRNaseフリー水で溶解します。このストック溶液は-20℃で保存します。RNAプレップごとに、このストック溶液を用いて新しく希釈液を調製します。このストック溶液の濃度は310 μg/ml(=310 ng/μl)です。10プレップ用のワーキング溶液(4 ng/μl)を調製するためには、5 μlのRNAストック溶液に34 μlのBuffer RLT Plusを添加し、ピペティングにより混和します。この希釈液6 μlを54 μlのBuffer RLT Plusに添加すると、4 ng/μlのワーキング溶液になります。この溶液5 μlをステップ3でライセートに添加します。**oligo-dT**をベースにした増幅に精製RNAを用いる場合には、ライセートにキャリアRNAを添加しないでください。
- 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。
- 本キットを初めて使用する前に、まず24 mlのエタノール(96~100%)と6 mlのRNaseフリー水(添付)を混和して80%エタノールを調製します。本操作では70%エタノールも必要ですが、エタノール(96~100%)を蒸留水(別途準備)で希釈して調製できます。
- 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。
- 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. 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 $5 \times 10^5$ 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 x g** で 5 分間遠心操作を行ない、細胞をペレット化する。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。

##### 1b. 単層培養細胞（細胞は $5 \times 10^5$ 個以上使用しない）:

単層培養細胞は培養容器（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後、すぐにステップ 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、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。

##### 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、**0.10 ~ 0.25 %** トリプシンを含む **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** フリーのガラス製あるいはポリプロピレン製の遠心チューブ（別途準備）に移し、**300 x g** で 5 分間遠心する。上清を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、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。

#### 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き細胞ペレットをルーズにする。**350  $\mu$ l** の **Buffer RLT Plus** を添加する。ポルテックスあるいはピペットで混和して、ステップ 3 に進む。

$1 \times 10^5$  個以下の細胞を処理する場合には、代わりに 75  $\mu$ l の **Buffer RLT Plus** を添加できます。この操作でより小さなチューブ内で細胞のピペッティングが可能になります。ピペットで溶液を吸排出して細胞を溶解します。

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。

単層培養細胞の直接溶解には **350 µl** の **Buffer RLT Plus** を培養シャーレに添加する。ゴム製のポリスマンで細胞ライセートを回収する。ライセートをマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで入れる。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。

$1 \times 10^5$  個以下の細胞を処理する場合には、代わりに 75 µl の Buffer RLT Plus を添加できます。この操作はマルチウェルプレートあるいは培養シャーレが必要です。ピペットで溶液を吸排出して細胞を溶解します。

**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は、英語版 Handbook 15 ページの “ Disrupting and homogenizing starting material ” を参照してください。 $1 \times 10^5$  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：ステップ 2 で 75 µl の Buffer RLT Plus を使用した場合には、ライセートを新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに移し、Buffer RLT Plus を用いて最終量を 350 µl に調整します。1 分間ボルテックスしてホモジナイズし、ステップ 4 に進みます。

注：500 個未満の細胞を処理する際、ホモジナイゼーションの前にライセートに 20 ng のキャリア RNA（4 ng/µl の溶液を 5 µl）を添加可能です。“ 実験開始前の準備事項 ” に記述されているようにキャリア RNA を準備します。

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、AllPrep Spin Column および RNeasy MinElute Spin Column の目詰まりの原因になります。TissueRuptor や QIAshredder を用いたホモジナイゼーションは、シリンジと注射針を使った方法よりも核酸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 Spin Column（別途準備）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 分間遠心操作する。ステップ 4 に進む。**

**3b. TissueRuptor のディスポーザブル・プローブのチップをライセート中に入れ、ライセートが均一になるまで（通常 30 秒）TissueRuptor を最高速度で操作する。ステップ 4 に進む。**

注：操作中に TissueRuptor とディスポーザブル・プローブへの損傷を避けるため、プローブの先端を必ずバッファーに沈めてください。

**3c. RNase フリーのシリンジに取り付けた先の尖っていない注射針（20-G、直径 0.9 mm）にライセートを少なくとも 5 回通す。ステップ 4 に進む。**

**4. 2 ml のコレクションチューブ（添付）にセットした AllPrep DNA Spin Column にホモジナイズしたライセートを入れる。チューブの蓋を静かに閉めて、 $8,000 \times g$ （ $10,000 \text{ rpm}$ ）以上で 30 秒間遠心操作する。**

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、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。

5. **AllPrep DNA Spin Column**を新しい**2 ml**のコレクションチューブ(添付)にセットし、室温(**15 ~ 25** )に放置、あるいはステップ**13 ~ 16**の**DNA**精製を後で行なう場合は**4** で保存する。ステップ**6 ~ 12**の**RNA**精製にはろ液を使用する。

miRNAのようなsmall RNAを含むトータルRNAの精製が必要な場合には、本プロトコールのステップ6 ~ 12の代わりに、英語版 Handbook 51ページ、Appendix DのステップD1 ~ D6を行ないます。

注：AllPrep DNA Spin Columnを室温あるいは**4** で長期間放置しないでください。カラムを冷凍しないでください。

#### トータルRNA精製

6. ステップ5のろ液に等量の**70%**エタノール(通常**350  $\mu$ 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**7**に進む。

注：ホモジナイゼーションやDNA分離の際にライセート量が減少した場合には、添加する**70%**エタノールの量は**350  $\mu$ l**より少なくなります。

注：ある種の細胞株からの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。これは操作には影響しません。

7. 形成した沈殿物を含むサンプル全てを**2 ml**コレクションチューブ(添付)の中にセットした**RNeasy MinElute Spin Column**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**秒間遠心操作する。ろ液を捨てる\*。

オプション：タンパク質を回収したい場合には、ろ液を氷上で保存し、英語版 Handbook 53ページ、Appendix EのステップE1 ~ E5を行ないます。

コレクションチューブはステップ8で再使用します。

8. **700  $\mu$ l**の**Buffer RW1**を**RNeasy MinElute Spin Column**に添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために**8,000 x g (10,000 rpm)**以上で**15**秒間遠心操作する。ろ液を捨てる\*。

コレクションチューブはステップ9で再使用します。

注：遠心操作後、**RNeasy MinElute Spin Column**がろ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を完璧に空にします。

\* 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 7ページをご覧ください。

9. **RNeasy MinElute Spin Column**へ **Buffer RPE 500  $\mu$ l**を添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために **8,000 x g ( 10,000 rpm )** 以上で **15 秒**間遠心操作する。ろ液を捨てる。

コレクションチューブはステップ 10 で再使用します。

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 に添加したことを確認します（“ 実験を始める前の準備事項 ” を参照）。

10. **500  $\mu$ l** の **80 %**エタノールを **RNeasy MinElute Spin Column** に加える。チューブを静かに閉め、スピnc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**間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

エタノール (96 ~ 100 % )および添付のRNase フリー水を用いて80 %エタノール液を調製します。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column がろ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。接触した場合、エタノールのコンタミが起こります。

11. **RNeasy MinElute Spin Column** を新しい **2 ml** コレクションチューブ ( 添付 ) にセットする。スピncラムの蓋を開け、最大速度で **5 分**間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

蓋の損傷を避けるために、遠心の際にはカラムを少なくとも一つ置きにセットしてください。遠心ローターの回転方向と反対の方向に向けて蓋をセットします（例えば、ローターが時計方向に回転する場合には、時計方向と反対方向に向けてます）。

残存エタノールはダウストリームの反応を妨害することがあるために、スピncラム・メンブレンを乾燥させることは重要です。蓋を開いて遠心することにより、RNA 溶出の際にエタノールがキャリアオーバーしません。

12. **RNeasy MinElute Spin Column** を新しい **1.5 ml** コレクションチューブ ( 添付 ) にセットする。**RNase** フリー水 **14  $\mu$ l** をスピncラム・メンブレンの中央に直接添加する。蓋を静かに閉めて最高速度で **1 分**間遠心操作し、**RNA** を溶出する。

より高濃度のRNAが必要な場合には、10  $\mu$ l のRNase フリー水を使用できますが、収量は約 20 % 低下します。スピncラム・メンブレンが十分に水合できないため、10  $\mu$ l 以下のRNase フリー水でRNAを溶出ししないでください。

RNeasy MinElute Spin Column のデッドボリウムは 2  $\mu$ l です：14  $\mu$ l のRNase フリー水で溶出すると 12  $\mu$ l の溶出液が得られます。

精製したRNAを用いたRT-PCR やリアルタイム RT-PCR には、特異性や感度の高い結果を実現する至適化済みで即使用可能な幅広いキットを提供しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください ( [www.qiagen.com/PCR](http://www.qiagen.com/PCR) )。限られた量のRNAからの全トランスクリプトーム増幅 ( WTA ) には QuantiTect® Whole Transcriptome Kit を推奨します。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください ( [www.qiagen.com/goto/WTA](http://www.qiagen.com/goto/WTA) )。

## ゲノムDNA精製

13. ステップ5からのAllPrep DNA Spin Columnに500 µlのBuffer AW1を添加する。蓋を静かに閉め、スピncラム・メンブレン洗浄のために8,000 x g (10,000 rpm)以上で15秒間遠心する。ろ液を捨てる\*。

ステップ14でスピncラムを再使用します。

注：Buffer AW1は濃縮液でお届けします。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）。

14. 500 µlのBuffer AW2をAllPrep DNA Spin Columnに添加する。蓋を静かに閉め、最高速度で2分間遠心操作し、スピncラム・メンブレンを洗浄する。

注：Buffer AW2は濃縮液でお届けします。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）。

長時間の遠心操作でスピncラム・メンブレンを乾燥させることにより、DNA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、コレクションチューブからAllPrep DNA Spin Columnを注意して取り除いてください。カラムがろ液と接触した場合には、コレクションチューブを空にしてスピncラムを最高速度で1分間、再度遠心操作します。

15. AllPrep DNA Spin Columnを新しい1.5 mlのコレクションチューブ（添付）に移す。50 µlのBuffer EB（70 に前もって加熱）を直接スピncラム・メンブレンに添加し、カラムの蓋を静かに閉める。室温（15 ~ 25 °C）で2分間インキュベートし、8,000 x g (10,000 rpm)以上で1分間遠心操作してDNAを溶出する。

16. ステップ15を繰り返し、さらにDNAを溶出する。

最初のDNA溶出液の希釈を防ぐには、新しい1.5 mlのコレクションチューブ（別途準備）を用いて2回目のDNA溶出液を回収します。1回目と2回目のDNA溶出液を一緒にする際には、ステップ15で用いたコレクションチューブを再利用します。

注：より高濃度のDNAを得るためには30 µlのBuffer EBで2回溶出します。この場合には最終DNA収量は低下します。

精製したDNAを用いたPCRやリアルタイムPCRには、特異性や感度の高い結果を実現する至適化済みで即使用可能な幅広いキットを提供しています。詳細は弊社ウェブサイト [www.qiagen.com/PCR](http://www.qiagen.com/PCR) をご覧ください。限られた量のDNAの全ゲノム増幅を実現するQIAGENキットも販売しています。詳細は弊社ウェブサイト [www.qiagen.com/WGA](http://www.qiagen.com/WGA) をご覧ください。

\* Buffer AW1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 7ページをご覧ください。

# プロトコール：動物およびヒト組織からのゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製

本プロトコールは溶解が容易な動物やヒト組織からのトータルRNA精製用です。マイクロダイセクションにより採取した凍結組織切片からのトータルRNA精製に関しては19ページを参照してください。

## スタートサンプル量の正確な測定

最高の収量および純度の核酸を得るためには、正しいスタートサンプル量を使用することが重要です。通常、最高5 mgの新鮮、あるいは凍結した組織、またはRNAlaterやAllprotectで安定化した組織2 ~ 3 mg（一部脱水されている）を調製できます。これらの量はほとんどの組織で、AllPrep DNA Spin ColumnのDNA結合容量、RNeasy MinElute Spin ColumnのRNA結合容量やBuffer RLT Plusの溶解容量を超えません。様々な組織からの一般的なDNAおよびRNA収量をTable 2に掲載しています（英語版 Handbook 14 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る必要があります。

脾臓や胸腺のような組織は非常に多量のDNAを含んでいるため、RNAに微量のDNAと一緒に精製されることがあります。微量のDNAでも障害となる高感度なダウンストリームに溶出したRNAを使用する場合には、これらの組織ではRNeasy MinElute Spin Columnメンブレン上でDNase分解を行なうことを推奨します（詳細は英語版 Handbook 54 ページ、Appendix Fを参照）。

骨格筋、心臓、皮膚のような組織は、収縮性のタンパク質、結合組織、コラーゲンが豊富なため、RNA収量が低いことがあります。これらの組織からゲノムDNAおよびトータルRNAを精製するには、DNeasy® Blood & Tissue KitとRNeasy Fibrous Tissue Mini Kitをそれぞれ使用されることを推奨します（英語版 Handbook 56 ページのordering information参照）。

**RNAとともにDNAが精製される原因となるため、AllPrep DNA Spin Column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 MinElute Spin Columnをオーバーロードしないでください。**

スタートサンプル量を定量する最も正確な方法は組織重量を測定することです。一般的に、一辺が1.5 mmの立方体(3.4 mm<sup>3</sup>)の動物組織の重量は3.5 ~ 4.5 mgです。

## 実験を始める前の重要事項

- AllPrep DNA/RNA Micro 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。
- 初めてRNAを調製する場合にはAppendix A（英語版 Handbook 44 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（英語版）を参照にして装置を使用してください。
- 最適な結果には、採取した組織を即座にRNA/later RNA Stabilization Reagent（RNA/later Handbook参照）あるいはAllprotect Tissue Reagent（Allprotect Tissue Reagent Handbook参照）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。重量測定あるいはBuffer RLT Plus中で破砕するまで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 Plus、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。

#### 実験を始める前の準備事項

- 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β-ME 10 μlを添加します。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 Plusは室温（15～25℃）で1ヶ月間まで保存できます。あるいはBuffer RLT Plus 1 ml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。
- 約2 μg以下の組織を処理する際には、ホモジナイゼーション前にキャリアRNAをライセートに添加します（英語版Handbook 17ページの“Carrier RNA”を参照）。初めて使用する前にキャリアRNA（310 μg）を1 mlのRNaseフリー水で溶解します。このストック溶液は-20℃で保存します。RNAプレップごとに、このストック溶液を用いて新しく希釈液を調製します。このストック溶液の濃度は310 μg/ml（= 310 ng/μl）です。10プレップ用のワーキング溶液（4 ng/μl）を調製するためには、5 μlのRNAストック溶液に34 μlのBuffer RLT Plusを添加し、ピペティングにより混和します。この希釈液6 μlを54 μlのBuffer RLT Plusに添加すると、4 ng/μlのワーキング溶液になります。この溶液5 μlをス

ステップ2でライセートに添加します。**oligo-dT**をベースにした増幅に精製RNAを用いる場合には、ライセートにキャリアRNAを添加しないでください。

- 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。
- 本キットを初めて使用する前に、まず24 mlのエタノール（96～100%）と6 mlのRNaseフリー水（添付）を混和して80%エタノールを調製します。本操作では70%エタノールも必要ですが、エタノール（96～100%）を蒸留水（別途準備）で希釈して調製できます。
- 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。
- 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。使用する組織量を決定する。**5 mg**以上使用しない。すぐにステップ2に進む。

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。必要に応じて、組織を清潔な台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<sub>later</sub>**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<sub>later</sub>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<sub>later</sub> 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<sub>later</sub>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<sub>later</sub> 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、2b、2cに従って組織を破碎し、**Buffer RLT Plus (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。

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  $\beta$ -ME (あるいは DTT) を Buffer RLT Plus 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)。

注：2  $\mu$ g 未満の組織を処理する場合には、ホモジナイゼーションの前にライセートに 20 ng のキャリア RNA (4 ng/ $\mu$ l の溶液を 5  $\mu$ l) を添加します。“実験開始前の準備事項” に記述されているようにキャリア RNA を準備します。

RNA/ater 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。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。

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 Spin Column および RNeasy MinElute Spin Column 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ゼーション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  $\mu$ l の **Buffer RLT Plus** 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** のディスポーザブル・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 とディスポーザブル・プローブへの損傷を避けるため、プローブの先端を必ずバッファーに沈めてください。

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 2 ml のマイクロ遠心チューブに組織を入れる。

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。チューブあたり **350  $\mu$ l** の **Buffer RLT Plus** を即座に添加する。
- **TissueLyser Adapter Set 2 x 24** にチューブをセットする。
- **TissueLyser** にセットして **20 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。
- 内側のコレクションチューブを外側に、外側のチューブを内側に置き換えます。**TissueLyser** にセットし **20 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。
- ライセートを新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで静かに入れる。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。

**2c.** 乳鉢と乳棒を用いて破碎後、**QIAshredder** ホモジナイザーあるいは注射針とシリンジを用いたホモジナイゼーション：

- 計量した組織を迅速に液体窒素の中に入れて、乳鉢と乳棒を用いて細かい粉末にする。
- 液体窒素で冷却済みの **RNase** フリーの **2 ml** マイクロ遠心チューブ（別途準備）に粉末状組織と液体窒素をデカントにより入れる。液体窒素は蒸発させるが、組織が融解しないようにする。
- **350  $\mu$ l** の **Buffer RLT Plus** 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 Spin Column** 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** 遠心操作する。あるいは **RNase** フリーのシリンジに取り付けた先端が尖っていない注射針（**20-G**）にライセートを最低 **5** 回出し入れする。ステップ**3**に進む。

**3.** 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（添付）にセットした **AllPrep DNA Spin Column** に入れる。チューブの蓋を静かに閉めて、**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **30** 秒間遠心操作する。

いくつかの調製では、3分間の遠心操作後に非常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、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。

4. **AllPrep DNA Spin Column** を新しい **2 ml** のコレクションチューブ (添付) にセットし、後で行なうステップ **12 ~ 15** の **DNA** 精製のために室温 (**15 ~ 25** ) あるいは **4** で保存しておく。ステップ **5 ~ 11** の **RNA** 精製にはろ液を使用する。

注: AllPrep DNA Spin Column を室温あるいは **4** で長期間放置しないでください。カラムを冷凍しないでください。

#### トータル **RNA** 精製

5. ステップ **4** のろ液に等量の **70 %** エタノール (通常 **350  $\mu$ 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。

注: ホモジナイゼーションや DNA 分離の際にライセート量が減少した場合には、添加する **70 %** エタノールの量は **350  $\mu$ l** より少なくなります。

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. 形成した沈殿物を含むサンプル全てを、**2 ml** コレクションチューブ (添付) の中にセットした **RNeasy MinElute Spin Column** 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** 秒間遠心操作する。ろ液を捨てる\*。

オプション: タンパク質を回収したい場合には、ろ液を氷上で保存し、英語版 Handbook 53 ページ、Appendix E のステップ E1 ~ E5 を行ないます。

コレクションチューブはステップ **7** で再使用します。

7. **700  $\mu$ l** の **Buffer RW1** を **RNeasy MinElute Spin Column** に添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために **8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15** 秒間遠心操作する。ろ液を捨てる\*。

コレクションチューブはステップ **8** で再使用します。

注: 遠心操作後、**RNeasy MinElute Spin Column** がろ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を完璧に空にします。

オプション: DNA 含量の高い組織から RNA を精製する場合や感度の高いダウンストリームで RNA を使用する場合は、ステップ **7** の代わりに、ステップ **F1 ~ F4** (英語版 Handbook 54 ページ、Appendix F) の **DNase** 分解を行なうことを推奨します。

\* 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 7 ページをご覧ください。

8. **RNeasy MinElute Spin Column**へBuffer RPE 500  $\mu$ lを添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために8,000 x g ( 10,000 rpm ) 以上で15秒間遠心操作する。ろ液を捨てる。

コレクションチューブはステップ9で再使用します。

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に添加したことを確認します(“ 実験を始める前の準備事項 ” を参照)。

9. **500  $\mu$ l**の80%エタノールを**RNeasy MinElute Spin Column**に加える。チューブを静かに閉め、スピnc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分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

エタノール(96 ~ 100%)および添付のRNaseフリー水を用いて80%エタノール液を調製します。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Columnがろ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。接触した場合、エタノールのコンタミが起こります。

10. **RNeasy MinElute Spin Column**を新しい**2 ml**コレクションチューブ(添付)にセットする。スピncラムの蓋を開け、最大速度で5分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

蓋の損傷を避けるために、遠心の際にはカラムを少なくとも一つおきにセットしてください。遠心ローターの回転方向と反対の方向に向けて蓋をセットします(例えば、ローターが時計方向に回転する場合には、時計方向と反対方向に向けてます)。

残存エタノールはダウンストリームの反応を妨害することがあるために、スピncラム・メンブレンを乾燥することは重要です。蓋を開いて遠心することにより、RNA溶出の際にエタノールがキャリアオーバーしません。

11. **RNeasy MinElute Spin Column**を新しい**1.5 ml**コレクションチューブ(添付)にセットする。**RNase**フリー水**14  $\mu$ l**をスピncラム・メンブレンの中央に直接添加する。蓋を静かに閉めて最高速度で1分間遠心操作し、**RNA**を溶出する。

より高濃度のRNAが必要な場合には、10  $\mu$ lのRNaseフリー水を使用できませんが、収量は約20%低下します。スピncラム・メンブレンが十分に水合できないため、10  $\mu$ l以下のRNaseフリー水でRNAを溶出ししないでください。

RNeasy MinElute Spin Columnのデッドボリュームは2  $\mu$ lです：14  $\mu$ lのRNaseフリー水で溶出すると12  $\mu$ lの溶出液が得られます。

精製したRNAを用いたRT-PCRやリアルタイムRT-PCRには、特異性や感度の高い結果を実現する至適化済みで即使用可能な幅広いキットを提供しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください( [www.qiagen.com/PCR](http://www.qiagen.com/PCR) )。限られた量のRNAからの全トランスクリプトーム増幅(WTA)にはQuantiTect Whole Transcriptome Kitを推奨します。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください( [www.qiagen.com/goto/WTA](http://www.qiagen.com/goto/WTA) )。

## ゲノムDNA精製

12. ステップ4からのAllPrep DNA Spin Columnに500 µl Buffer AW1を添加する。チューブの蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm)以上で15秒間遠心操作する。ろ液を捨てる\*。

ステップ13でスピncラムを再使用します。

注：Buffer AW1は濃縮液でお届けします。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）。

13. 500 µlのBuffer AW2をAllPrep DNA Spin Columnに添加する。蓋を静かに閉め、最高速度で2分間遠心操作し、スピncラム・メンブレンを洗浄する。

注：Buffer AW2は濃縮液でお届けします。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）。

長時間の遠心操作でスピncラム・メンブレンを乾燥することにより、DNA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、コレクションチューブからAllPrep DNA Spin Columnを注意して取り除いてください。カラムがろ液と接触した場合には、コレクションチューブを空にしてスピncラムを最高速度で1分間、再度遠心操作します。

14. AllPrep DNA Spin Columnを新しい1.5 mlのコレクションチューブ（添付）に移す。Buffer EB（70 にもって加熱）50 µlを直接スピncラム・メンブレンに添加し、カラムの蓋を静かに閉める。室温（15 ~ 25 ）で2分間インキュベートし、8,000 x g (10,000 rpm)以上で1分間遠心操作してDNAを溶出する。

15. ステップ14を繰り返し、さらにDNAを溶出する。

最初のDNA溶出液の希釈を防ぐには、新しい1.5 mlのコレクションチューブ（別途準備）を用いて2回目のDNA溶出液を回収します。1回目と2回目のDNA溶出液を一緒にする際には、ステップ14で用いたコレクションチューブを再利用します。

注：より高濃度のDNAを得るためには30 µlのBuffer EBで2回溶出します。この場合には最終DNA収量は低下します。

精製したDNAを用いたPCRやリアルタイムPCRには、特異性や感度の高い結果を実現する至適化済みで即使用可能な幅広いキットを提供しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください（[www.qiagen.com/PCR](http://www.qiagen.com/PCR)）。限られた量のDNAの全ゲノム増幅を実現するQIAGENキットも販売しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください（[www.qiagen.com/WGA](http://www.qiagen.com/WGA)）。

\* Buffer AW1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 7ページをご覧ください。

# プロトコール：マイクロダイセクション法により採取した凍結切片からのゲノムDNAとトータルRNAの同時分離精製

本プロトコールはマイクロダイセクション法により採取した動物やヒトの凍結組織からのゲノムDNAとトータルRNAの精製用です。マイクロダイセクションで採取したホルマリン固定組織からのRNA精製にはRNeasy FFPE Kitを推奨します。

非常に微量のスタートサンプルから核酸を精製しなければならないために、レーザーマイクロダイセクションにより採取した組織標本からの核酸分離は研究者にとって大きな課題です。さらに固定と染色ステップにおいてRNAは分解され、この問題を最低限に抑えるために固定化プロトコールを改良したり、あるいは瞬間凍結標本から切片作製する必要性が生じることがあります。

標本からの切片作製、染色、マイクロダイセクション用の様々な機器および消耗品はLeica® ([www.leica-microsystems.co.jp](http://www.leica-microsystems.co.jp)) およびP.A.L.M. Microlaser Technologies ([www.palm-mikrolaser.com](http://www.palm-mikrolaser.com)) から入手できます。

## 実験を始める前の重要事項

- AllPrep DNA/RNA Micro 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。
- 初めてRNAを調製する場合にはAppendix A(英語版 Handbook 44ページ)をお読みください。
- RNA分解を最低限に抑えるために、室温での保存は避けてください。組織中のRNAは液体窒素中で瞬間凍結を行なうまで保護されていません。
- ステップ3でホモジナイズした組織ライセートは-70℃で数ヶ月間保存できます。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 Plus、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。

## 実験を始める前の準備事項

- 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 β-ME 10 μl を添加します。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 Plus は室温 (15 ~ 25 °C) で1ヶ月間まで保存できます。あるいは Buffer RLT Plus 1 ml 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。
- 500 個未満の細胞を処理する際、ホモジナイゼーション前にキャリア RNA をライセートに添加可能です (英語版 Handbook 17 ページの “Carrier RNA” を参照)。初めて使用する前にキャリア RNA (310 μg) を 1 ml の RNase フリー水で溶解します。このストック溶液は -20 °C で保存します。RNA プレップごとに、このストック溶液を用いて新しく希釈液を調製します。このストック溶液の濃度は 310 μg/ml (= 310 ng/μl) です。10 プレップ用のワーキング溶液 (4 ng/μl) を調製するためには、5 μl の RNA ストック溶液に 34 μl の Buffer RLT Plus を添加し、ピペティングにより混和します。この希釈液 6 μl を 54 μl の Buffer RLT Plus に添加すると、4 ng/μl のワーキング溶液になります。この溶液 5 μl をステップ 2 でライセートに添加します。**oligo-dT** をベースにした増幅に精製 RNA を用いる場合には、ライセートにキャリア RNA 添加してはいけません。
- 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。
- 本キットを初めて使用する前に、まず 24 ml のエタノール (96 ~ 100 %) と 6 ml の RNase フリー水 (添付) を混和して 80 % エタノールを調製します。本操作では 70 % エタノールも必要ですが、エタノール (96 ~ 100 %) を蒸留水 (別途準備) で希釈して調製できます。
- 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。
- 最適な DNA 溶出を確実にこなうため、前もって Buffer EB を 70 °C 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. サンプルを適切な量の **Buffer RLT Plus** に直接採取する (容量はマイクロダイセクションに使用した収集容器によるが、**65 μl** [Leica の装置] あるいは **300 μl** [その他の装置] 以上使用しない)。

注: 使用前に β-ME (あるいは DTT) を Buffer RLT Plus 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. 必要に応じてサンプルとバッファーを大きい容器 (例えば **1.5** か **2 ml** のチューブ) に移す。**Buffer RLT Plus** で最終容量を **350 μl** に調整する。

注：500個未満の細胞を処理する際、ホモジナイゼーションの前にライセートに20 ngのキャリアRNA（4 ng/μlの溶液を5 μl）を添加可能です。“実験開始前の準備事項”に記載されているようにキャリアRNAを準備します。

3. サンプルを**30秒間**ボルテックスする。  
追加のホモジナイゼーションは不要です。
4. サンプルを**2 ml**のコレクションチューブ（添付）にセットした**AllPrep DNA Spin Column**に入れる。チューブの蓋を静かに閉めて、**8,000 x g（10,000 rpm）**以上で**30秒間**遠心操作する。

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、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。

5. **AllPrep DNA Spin Column**を新しい**2 ml**のコレクションチューブ（添付）にセットし、後で行なう**DNA精製（ステップ13～16）**のために室温（**15～25**）あるいは場合は**4**で保存する。ステップ**6～12**の**RNA精製**にはろ液を使用する。

注：AllPrep DNA Spin Columnを室温あるいは**4**で長期間放置しないでください。カラムを冷凍しないでください。

#### トータルRNA精製

6. ステップ**5**のろ液に等量の**70%エタノール（通常350 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。すぐにステップ**7**に進む。

注：ホモジナイゼーションやDNA分離の際にライセート量が減少した場合は、添加する**70%エタノール**の量は**350 μl**より少なくなります。

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。

7. 形成した沈殿物を含むサンプル全てを**2 ml**コレクションチューブ（添付）の中にセットした**RNeasy MinElute Spin Column**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**遠心操作する。ろ液を捨てる\*。

コレクションチューブはステップ**8**で再使用します。

8. **700 μl**の**Buffer RW1**を**RNeasy MinElute Spin Column**に添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために**8,000 x g（10,000 rpm）**以上で**15秒間**遠心操作する。ろ液を捨てる\*。

コレクションチューブはステップ**9**で再使用します。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Columnがろ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を完璧に空にします。

\* 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 7ページをご覧ください。

9. **RNeasy MinElute Spin Column**へ**Buffer RPE 500  $\mu$ l**を添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために**8,000 x g ( 10,000 rpm )**以上で**15秒間**遠心操作する。ろ液を捨てる。

コレクションチューブはステップ10で再使用します。

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に添加したことを確認します（“ 実験を始める前の準備事項 ” を参照）。

10. **500  $\mu$ l**の**80 %**エタノールを**RNeasy MinElute Spin Column**に加える。チューブを静かに閉め、スピncラム・メンブレンを乾燥させるため、**8,000 x g ( 10,000 rpm )**以上で**2分間**遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

エタノール( 96 ~ 100 % )および添付のRNaseフリー水を用いて80 %エタノール液を調製します。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Columnがろ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。接触した場合、エタノールのコンタミが起ります。

11. **RNeasy MinElute Spin Column**を新しい**2 ml**コレクションチューブ( 添付 )にセットする。スピncラムの蓋を開け、最大速度で**5分間**遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

蓋の損傷を避けるために、遠心の際にはカラムを少なくとも一つ置きにセットしてください。遠心ローターの回転方向と反対の方向に向けて蓋をセットします（例えば、ローターが時計方向に回転する場合には、時計方向と反対方向に向けてます）。

残存エタノールはダウストリームの反応を妨害することがあるために、スピncラム・メンブレンを乾燥させることは重要です。蓋を開いて遠心することにより、RNA溶出の際にエタノールがキャリアオーバーしません。

12. **RNeasy MinElute Spin Column**を新しい**1.5 ml**コレクションチューブ( 添付 )にセットする。**RNaseフリー水 14  $\mu$ l**をスピncラム・メンブレンの中央に直接添加する。蓋を静かに閉めて最高速度で**1分間**遠心操作し、**RNA**を溶出する。

より高濃度のRNAが必要な場合には、10  $\mu$ lのRNaseフリー水を使用できますが、収量は約20 %低下します。スピncラム・メンブレンが十分に水和できないため、10  $\mu$ l以下のRNaseフリー水でRNAを溶出しないでください。

RNeasy MinElute Spin Columnのデッドボリウムは2  $\mu$ lです：14  $\mu$ lのRNaseフリー水で溶出すると12  $\mu$ lの溶出液が得られます。

精製したRNAを用いたRT-PCRやリアルタイムRT-PCRには、特異性や感度高い結果を実現する至適化済みで即使用可能な幅広いキットを提供しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください（[www.qiagen.com/PCR](http://www.qiagen.com/PCR)）。限られた量のRNAからの全トランスクリプトーム増幅（WTA）にはQuantiTect Whole Transcriptome Kitを推奨します。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください（[www.qiagen.com/goto/WTA](http://www.qiagen.com/goto/WTA)）。

## ゲノムDNA精製

13. ステップ5からのAllPrep DNA Spin Columnに500 µl Buffer AW1を添加する。チューブの蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm)以上で15秒間遠心操作する。ろ液を捨てる\*。

ステップ14でスピнкаラムを再使用します。

注：Buffer AW1は濃縮液でお届けします。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）。

14. 500 µlのBuffer AW2をAllPrep DNA Spin Columnに添加する。蓋を静かに閉め、最高速度で2分間遠心操作し、スピнкаラム・メンブレンを洗浄する。

注：Buffer AW2は濃縮液でお届けします。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）。

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、DNA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、コレクションチューブからAllPrep DNA Spin Columnを注意して取り除いてください。カラムがろ液と接触した場合には、コレクションチューブを空にしてスピнкаラムを最高速度で1分間、再度遠心操作します。

15. AllPrep DNA Spin Columnを新しい1.5 mlのコレクションチューブ（添付）に移す。50 µlのBuffer EB（70℃に前もって加熱）を直接スピнкаラム・メンブレンに添加し、カラムの蓋を静かに閉める。室温（15～25℃）で1分間インキュベートし、8,000 x g（10,000 rpm）以上で2分間遠心操作してDNAを溶出する。

16. ステップ15を繰り返し、さらにDNAを溶出する。

最初のDNA溶出液の希釈を防ぐには、新しい1.5 mlのコレクションチューブ（別途準備）を用いて2回目のDNA溶出液を回収します。1回目と2回目のDNA溶出液を一緒にする際には、ステップ15で用いたコレクションチューブを再利用します。

注：より高濃度のDNAを得るためには30 µlのBuffer EBで2回溶出します。この場合には最終DNA収量は低下します。

精製したDNAを用いたPCRやリアルタイムPCRには、特異性や感度の高い結果を実現する至適化済みで即使用可能な幅広いキットを提供しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください（[www.qiagen.com/PCR](http://www.qiagen.com/PCR)）。限られた量のDNAの全ゲノム増幅を実現するQIAGENキットも販売しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください（[www.qiagen.com/WGA](http://www.qiagen.com/WGA)）。

\* Buffer AW1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 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

### AllPrep DNA あるいは RNeasy MinElute Spin Column 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に関しては “ Disrupting and homogenizing starting materials ” (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。  
次の調製にはスタートサンプル量を減らす (各プロトコルを参照) あるいはホモジナイゼーションの時間を増やす。
- 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。このような場合には遠心機を 25 に設定する。AllPrep DNA Spin Column にライセートを入れる前に、37 でライセートを温める。

### 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に関しては “ Disrupting and homogenizing starting materials ” (英語版 Handbook 15 ページ) を参照する。  
今回の調製ではスタートサンプル量を減らす (各プロトコル参照) または溶解バッファ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  
スピнкаラム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 (各プロトコルを参照)。
- c) RNA が RNeasy MinElute Spin Column にまだ結合している  
RNA 溶出を再度行なうが、RNase フリー水を RNeasy MinElute Spin Column 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。
- d) DNA が AllPrep DNA Spin Column 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 を AllPrep DNA Spin Column に入れて実験台上で 10 分間インキュベートする。

## コメント

- e) エタノールのキャリーオーバー 80%エタノールで洗浄した後、RNeasy MinElute Spin Columnを乾燥させるために最高速度で5分間遠心操作を必ず行なう。  
遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Columnがろ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く。接触した場合、エタノールのコンタミが起る。
- 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（3ページ、プロトコール参照）。

### DNAにRNAが混入している

- a) AllPrep DNA Spin Columnに入れたライセートがエタノールを含む AllPrep DNA Spin Column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する。

### DNAがRNAに混入し、ダウンストリーム実験に影響する

- a) 細胞数が多すぎる ある種の細胞タイプでは、処理する細胞数が多すぎるとAllPrep DNA Spin Column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、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 DNA Spin Columnは効果的にDNAを結合しない。
- c) 組織が多量のDNAを含む DNA含量の非常に高いある種の組織（例；脾臓）では微量のDNAがAllPrep DNA Spin Columnを通過することがある。サンプル量を減らして再度行なう。あるいはRNeasy MinElute Spin Columnのメンブレン上でDNase分解を行なう（英語版Handbook 54ページ、Appendix F）。

**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 46 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 Allprotect Tissue Reagent あるいは、RNA later RNA Stabilization Reagent 中で適切に安定化され、保存されたことを確認する。

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、 $-70^{\circ}\text{C}$  で適切に保存されていたことを確認する。AllPrep DNA/RNA 操作は迅速に行なう (特に最初の数ステップは重要)。

Appendix A (英語版 Handbook 44 ページ) および “Handling and storage of starting material” (英語版 Handbook 14 ページ) を参照。

b) RNase の混入

全ての AllPrep 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。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 44 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; 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)。

\* 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。

核酸濃度が低すぎる

溶出量が多すぎた

より少量で核酸を溶出する。AllPrep DNA Spin Columnでは30 µl以下のBuffer EB、RNeasyスピнкаラムでは12 µl以下のRNaseフリー水では溶ししない。より少量で溶出すると核酸濃度は増加するが、収量は低下することがある。

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) 塩が溶出液に混入

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。

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ろ液を除去する。

b) エタノールのキャリーオーバー

80%エタノールで洗浄した後、RNeasy MinElute Spin Columnを乾燥させるために最高速度で5分間遠心操作を必ず行なう。

遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Columnがろ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く。接触した場合、エタノールのコンタミが起る。

QIAGEN®, AllPrep®, DNeasy®, MinElute®, QuantiTect®, RNAprotect®, RNeasy® (QIAGEN Group);  
Leica® (Leica Microsystems GmbH).

"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製品は全て研究用です。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。

© 2007 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

