

RNeasy® Micro

プロトコールとトラブルシューティング

以下のような微量サンプルからのトータルRNA精製用

動物およびヒト細胞 ($\leq 5 \times 10^5$)

動物およびヒト組織 (≤ 5 mg)

繊維性組織 (≤ 5 mg)

マイクロダイセクション法により採取した凍結切片

およびRNAのクリーンアップと濃縮



目次

プロトコール

動物およびヒト細胞からのトータルRNA精製	3
動物およびヒト組織からのトータルRNA精製	10
繊維性組織からのトータルRNA精製	17
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トータルRNA精製	24
RNAのクリーンアップと濃縮	29
トラブルシューティング	32

プロトコール：動物およびヒト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。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
- 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の量

さらに細胞破片は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 11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、 5×10^5 個以下の細胞で実験を開始することを推奨します。

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 ²) *	細胞数†
マルチウェル・プレート		
■ 96ウェル	0.32~0.6	$4 \sim 5 \times 10^4$
■ 48ウェル	1	1×10^5
■ 24ウェル	2	2.5×10^5
■ 12ウェル	4	5×10^5
■ 6ウェル	9.5	$1 \times 10^{6\dagger}$
ディッシュ		
■ 35 mm	8	$1 \times 10^{6\dagger}$
フラスコ		
■ 40~50 ml	25	$3 \times 10^{6\dagger}$

* ウェルあたり。マルチウェル・プレートを使用する際は、メーカーによりわずかに変動します。

† 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）により変動します。

‡ この細胞数はRNeasy MinElute Spin Columnの最大結合許容量を超えています。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 5×10^6 個の細胞以下）をそれぞれRNeasy MinElute Spin Columnにロードします。

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、様々な容器の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

- RNeasy Micro Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 10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 50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°C 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 -70°C で数カ月間保存できます。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°C の水浴中でインキュベーションします。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分間遠心してください。上清を新しいRNaseフリーのガラス製あるいはポリプロピレン製のチューブに移し、ステップ4に進みます。
- RNAprotect® Cell Reagent中に保存した細胞もこの精製法に使用できます。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。 $5,000 \times g$ 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およびBuffer RW1はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含んだ殺菌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。
- この実験の全てのステップは室温（ $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）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 $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ で行なってください。遠心機は 20°C 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、 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あたり10 μ lの β -ME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を添加したBuffer RLTは室温(15~25 $^{\circ}$ C)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 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。
- 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 14ページの“Carrier RNA”を参照)。初めて使用する前にキャリアRNA(310 μ g)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 $^{\circ}$ Cで保存します。このストック溶液を用いて各RNAプレップごとに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 μ g/ml (= 310 ng/ μ l)です。10プレップ用のワーキング溶液(4 ng/ μ l)を調製するためには、5 μ lのストック溶液に34 μ lのBuffer RLTを添加し、ピペティングにより混和します。この希釈液6 μ lを54 μ lのBuffer RLTに添加すると、4 ng/ μ lのワーキング溶液になります。この溶液5 μ l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は濃縮液としてお届けします。キットを初めて使用する場合は、まずボトルに記載されているように4倍量のエタノール(96~100%)を添加し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。
- Buffer RLTは保存中に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。
- RNase-Free DNase Setを初めて使用する場合は、まずDNase Iストック溶液を準備します。DNase I(1,500 Knitz units)を付属のRNaseフリー水550 μ lで溶解します。DNase I溶液の飛散を避けるために、容器を開けないでください。RNaseフリーの注射針とシリンジを用いて容器にRNaseフリー水を注入します。容器を逆さにして、静かに溶かしてください。**ボルテックスで混和しないでください。**

溶解したDNase Iの長期保存にはガラス容器からストック溶液を取り出し、1回に使用する量を分注して、-20 $^{\circ}$ Cで最高9ヶ月保存できます。解凍した溶液は2~8 $^{\circ}$ Cで6週間まで保存できます。凍結融解は繰り返さないでください。

操作手順

1. ステップ 1a あるいは 1b に従って細胞を回収する。

- 1a. 浮遊細胞（細胞は 5×10^5 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）に取り、**300 x g** で 5 分間遠心操作しペレットにする。上清を注意深く完全に吸引除去してからステップ 2 に進む。

注：細胞培養液が完全に除去されていないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、RNeasy MinElute メンブレンへの RNA 結合条件が影響を受けます。この結果、RNA 収量が減少することがあります。

- 1b. 単層培養細胞（細胞は 5×10^5 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：細胞培養液が完全に除去されていないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、RNeasy MinElute メンブレンへの RNA 結合条件が影響を受けます。この結果、RNA 収量が減少するかもしれません。

細胞のトリプシン処理および細胞の回収：

細胞数を数え、使用量を決定する。培養液を吸引除去し、PBS で細胞を洗浄する。PBS を吸引除去し、0.1 ~ 0.25 % 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 フリーのガラスあるいはポリプロピレン遠心チューブ（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、ステップ 2 に進む。

注：細胞培養液が完全に除去されていないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、RNeasy MinElute メンブレンへの RNA 結合条件が影響を受けます。この結果、RNA 収量が減少するかもしれません。

2. Buffer RLT 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 μ l** の Buffer RLT を添加する（ 1×10^5 個以下の細胞を処理する場合には、代わりに **75 μ l** の Buffer RLT を添加）。ボ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。

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 μ l** の Buffer RLT を細胞培養ディッシュに添加する（マルチウエル・プレートや細胞培養ディッシュで 1×10^5 以下の細胞を処理する場合には、代わりに **75 μ l** の Buffer RLT を添加する。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。

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 12 ページの “Disrupting and homogenizing starting material” を参照してください。1 x 10⁵ 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：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、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 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 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 のディスパーザブル・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 とディスパーザブル・プローブへの損傷を避けるため、プローブの先端をバッファーに必ず沈めてください。

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

4. ライセートに同容量の 70 % エタノールを添加し、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 5 に進む。

注：ホモジナイゼーション中のロスにより、ライセートは 350 μl よりも少なくなります。ステップ 2 で 75 μl の Buffer RLT を使用した場合には、このステップでも 75 μl の 70 % エタノールを添加します。

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。

5. 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。ろ液を棄てる*。

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 60 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 6 で再使用します。

* Buffer RLT 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。

6. **350 μ l**のBuffer RW1をRNeasy MinElute Spin Columnに添加する。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。ろ液を棄てる*。

コレクションチューブはステップ9で再使用します。

オプション：カラム上でのDNase処理が必要でない場合には、代わりに700 μ lのBuffer RW1を添加し、 $\geq 8,000 \times g$ で15秒間遠心操作します。ろ過画分とコレクションチューブを捨てます*。ステップ10に進みます。

7. **10 μ l**のDNase Iストック溶液を**70 μ l**のBuffer RDDに添加する。チューブを静かに転倒させて溶液を混和する。

注：DNase Iは物理的変性に特に敏感です。チューブを静かに上下して混和させます。ボルテックスで混和しないでください。

8. **DNase Iインキュベーション溶液 (80 μ l)**をRNeasy MinElute Spin Columnメンブレンにピペットで直接アプライし、室温で**(20~30 $^{\circ}$ C)** **15分間**静置する。

注：DNase Iインキュベーション反応液を直接RNeasy MinElute Spin Columnメンブレンにピペットで添加したことを確認してください。溶液の一部がスピncラムの壁やリングについていると、DNase分解は不完全になります。

9. **350 μ l**のBuffer RW1をRNeasy MinElute Spin Columnに添加する。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。ろ液とコレクションチューブを捨てる*。

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。RNeasyスピncラムにBuffer RPE **500 μ l**を添加する。カラムの蓋を静かに閉めて**8,000 x g (10,000 rpm)**で**15秒間**遠心操作を行ない、スピncラム・メンブレンを洗浄する。ろ液を捨てる。

コレクションチューブはステップ11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）。

11. RNeasy MinElute Spin Columnに**500 μ l**の**80%エタノール**を添加する。蓋を静かに閉め、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。ろ液画分と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。

* 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。

- 12. 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。ろ過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）。

残存エタノールがダウンストリームの反応を妨害することがあるため、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。

- 13. 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 μ 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 μ 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和できないため、10 μ 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のデッドボリュームは2 μ lです：14 μ lのRNase フリー水で溶出すると12 μ 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)。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)。

プロトコール：動物およびヒト組織からのトータルRNA精製

本プロトコールは動物やヒト組織からのRNA精製用です。繊維性組織からの精製は17ページのプロトコールに従って行ないます。

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24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。通常、最高5 mgの新鮮、あるいは凍結した組織、またはRNA^{later}®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。ほとんどの組織では、これらの組織の量はRNeasy MinElute Spin ColumnのRNA結合容量とBuffer RLTの溶解力を超えません。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 11ページ）。

脾臓、脳の一部、肺、胸腺などのいくつかの組織は、操作中に沈殿物を生じる傾向があります。しかし、この沈殿物はRNA精製には影響しません。

また、RNAの収量および純度が顕著に低下するため、RNeasy MinElute Spin Columnに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 mm³)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

- RNeasy Micro Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版Handbook 10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 50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）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RNA^{later} 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Allprotect Tissue Reagent 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。新鮮な組織は-70℃で数カ月保存できます。液体窒素で瞬間凍結させ直ちに-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3でホモジナイズした組織ライセートも数カ月間-70℃で保存できます。凍結したライセートは、ステップ4を行なう前に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およびBuffer RW1はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含んだ殺菌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。
- 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。遠心機は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

- β -ME (β -mercaptoethanol) は使用前に Buffer RLT に添加します。1 ml の Buffer RLT あたり 10 μ l の β -ME 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 を添加した 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 あたり 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。
- 約 2 μ g 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 14 ページの “Carrier RNA” を参照）。初めて使用する前にキャリア RNA（310 μ g）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。このストック溶液を用いて RNA プレップごとに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 μ g/ml (= 310 ng/ μ l) です。10 プレップ用のワーキング溶液（4 ng/ μ l）を調製するためには、5 μ l の RNA ストック溶液に 34 μ l の Buffer RLT を添加し、ピペッティングにより混和します。この希釈液 6 μ l を 54 μ l の Buffer RLT に添加すると、4 ng/ μ l のワーキング溶液になります。この溶液 5 μ l 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 を添加しないでください。
- Buffer RPE は濃縮液としてお届けします。キットを初めて使用する場合は、まずボトルに記載されているように4倍量のエタノール（96～100%）を添加し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。
- Buffer RLTは保存中に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。
- RNase-Free DNase Setを初めて使用する場合は、まずDNase Iストック溶液を準備します。DNase I (1,500 Knitz units) を付属のRNaseフリー水 550 µlで溶解します。DNase I溶液の飛散を避けるために、容器を開けないでください。RNase フリーの注射針とシリンジを用いて容器にRNase フリー水を注入します。容器を逆さにして、静かに溶かしてください。ボルテックスで混和しないでください。

溶解したDNase Iの長期保存にはガラス容器からストック溶液を取り出し、1回に使用する量を分注して、-20℃で最高9ヶ月保存できます。解凍した溶液は2~8℃で6週間まで保存できます。凍結融解は繰り返さないでください。

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の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で安定化した組織：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。

安定化していない新鮮な組織または凍結組織：組織をRNA/laterまたは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にすぎると、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（組織は5 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 12 ページの“Disrupting and homogenizing starting material”を参照ください。

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）。

注：2 μg 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/μl の溶液を5 μl）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 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、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RNA収量が一般的に増加します。

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ー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 μl の Buffer RLT を即座に添加する。

- **TissueLyser Adapter Set 2 x 24**にチューブを入れる。
 - **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る。**TissueLyser**にセットして**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。
 - **ステップ3**に進む。

ステンレススチール製ピースは再使用しないでください。
- 2c. 乳鉢と乳棒を用いて破碎した後にQIAshredderホモジナイザーあるいは注射針とシリンジを用いてホモジナイゼーション：**
- 重量測定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。
 - 粉末状の組織と液体窒素を、液体窒素で冷却済みのRNaseフリーの**2 ml**マイクロチューブに移す（別途準備）。液体窒素を蒸発させる。組織が解凍しないように注意する。
 - **350 μ l**のBuffer RLTを添加する。
 - **2 ml**のコレクションチューブにセットしたQIAshredderスピнкаラムにライセートを直接ピペットで添加し、最高スピードで**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。上清をピペット操作により注意深く新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）に移す。この上清（ライセート）のみを次のステップで使用する。**
- 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。
- 4. ホモジナイズしたライセートと同量の70%エタノール（通常**350 μ l**）を添加し、ピPETTINGにより十分に混和する。遠心操作は行なわない。すぐに**ステップ5**に進む。**
- 注：ホモジナイゼーション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 μ 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。

5. 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。ろ液を棄てる*。

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 60 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6で再使用します。

6. 350 μ l の Buffer RW1 を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。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。ろ液を棄てる*。

コレクションチューブはステップ9で再使用します。

オプション：カラム上でのDNase 処理が必要でない場合には、代わりに700 μ l の Buffer RW1 を添加し、 $\geq 8,000 \times g$ で15秒間遠心操作します。ろ過画分とコレクションチューブを捨てます*。ステップ10に進みます。

7. 10 μ l の DNase I ストック溶液を70 μ l の Buffer RDD に添加する。チューブを静かに転倒させて溶液を混和する。

注：DNase I は物理的変性に特に敏感です。チューブを静かに上下して混和させます。ボルテックスで混和しないでください。

8. DNase I インキュベーション溶液 (80 μ l) を RNeasy MinElute Spin Column メンブレンにピペットで直接アプライし、室温で (20 ~ 30°C) 15 分間静置する。

注：DNase I インキュベーション反応液を直接 RNeasy MinElute Spin Column メンブレンにピペットで添加したことを確認してください。溶液の一部がスピncラムの壁やリングについていると、DNase 分解は不完全になります。

9. 350 μ l の Buffer RW1 を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。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。ろ液とコレクションチューブを捨てる*。

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ラムに Buffer RPE 500 μ l 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。ろ液を棄てる。

コレクションチューブはステップ11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）。

* Buffer RLT や Buffer RW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

11. **RNeasy MinElute Spin Column**に500 μ lの80%エタノールを添加する。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分間遠心操作する。ろ液画分とコレクションチューブを捨てる。

エタノール (96 ~ 100%) とRNase フリー水 (添付) で80%エタノールを調製します。

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。

12. **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нкаラムの蓋を開け、最大速度で5分間遠心操作する。ろ過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нка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。

13. **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 μ lをスピнка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 μ 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нкаラム・メンブレンが十分に水和できないため、10 μ 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のデッドボリュームは2 μ lです：14 μ lのRNaseフリー水で溶出すると12 μ 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)。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)。

プロトコール：繊維性組織からのトータルRNA精製

本プロトコールは、骨格筋、心臓、皮膚組織などの繊維性組織からのRNA精製用にご利用ください。これらの組織性組織からの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困難です。本プロトコールは、動物やヒト組織からのRNA精製用プロトコール（10ページ）を改良したものです。RNA調製を妨害するタンパク質を除去するために、Proteinase K分解が含まれています。サンプルをBuffer RLTで溶解します。ライセート希釈後、サンプルをProteinase Kで処理します。デブリスは遠心操作によりペレット化します。その後清澄化ライセートにエタノールを添加し、RNAをRNeasy MinElute メンブレンに結合させます。RNAと一緒に分離される微量のDNAはRNeasy MinElute Spin Column上でのDNase処理によって除去されます。DNaseおよび夾雑物はすべて洗い流され、トータルRNAはRNaseフリー水中に溶出されます。

タンパク質が豊富な他の組織からRNAを精製する際は、本プロトコールと10ページのプロトコールを比較されることをお勧めします。Proteinase K分解を行なうためにRNaseを不活化するBuffer RLTを希釈しなければならないため、RNaseの豊富な組織（脾臓あるいは腸）ではこのプロトコールを使用しないでください。通常、他の組織には10ページのプロトコールが第一選択になります。

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。通常、最高5 mgの新鮮、あるいは凍結した組織、またはRNA_{later}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。

ほとんどの組織では、これらの組織の量はRNeasy MinElute Spin ColumnのRNA結合容量とBuffer RLTの溶解力を超えません。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 11ページ）。

また、RNAの収量および純度が顕著に低下するため、RNeasy MinElute Spin Columnに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 mm³）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

- RNeasy Micro Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版Handbook 10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 50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）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

(RNAlater 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。新鮮な組織は-70℃で数カ月保存できます。液体窒素で瞬間凍結させ直ちに-70℃に移します。Buffer RLT中で破砕するまで、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7でホモジナイズした組織ライセートは数カ月間-70℃で保存できます。凍結したライセートは、ステップ8を行なう前に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およびBuffer RW1はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含んだ殺菌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。
- 特別な表記がない限り、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。遠心機は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

- β -ME (β -mercaptoethanol) は使用前にBuffer RLTに添加します。1 mlのBuffer RLTあたり10 μ lの β -ME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を添加したBuffer RLTは室温(15～25℃)で1ヶ月間保存できます。あるいはBuffer RLT 1 mlあたり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。
- 約2 μ g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 14ページ、“Carrier RNA”を参照)。初めて使用する前にキャリアRNA(310 μ g)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。これを用いてRNAプレップごとに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 μ g/ml (= 310 ng/ μ l)です。10プレップ用のワーキング溶液(4 ng/ μ l)を調製するためには、5 μ lのRNAストック溶液に34 μ lのBuffer RLTを添加し、ピペッティングにより混和します。この希釈液6 μ lを54 μ lのBuffer RLTに添加すると、4 ng/ μ lのワーキング溶液になります。この溶液5 μ l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は濃縮液としてお届けします。キットを初めて使用する場合は、まず

ボトルに記載されているように4倍量のエタノール（96～100％）を添加し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。
- Buffer RLTは保存中に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。
- RNase-Free DNase Setを初めて使用する場合は、まずDNase Iストック溶液を準備します。DNase I（1,500 Knitz units）を付属のRNaseフリー水550 µlで溶解します。DNase I溶液の飛散を避けるために、容器を開けないでください。RNaseフリーの注射針とシリンジを用いて容器にRNaseフリー水を注入します。容器を逆さにして、静かに溶かしてください。**ボルテックスで混和しないでください。**

溶解したDNase Iの長期保存にはガラス容器からストック溶液を取り出し、1回に使用する量を分注して、-20℃で最高9ヶ月保存できます。解凍した溶液は2～8℃で6週間まで保存できます。凍結融解は繰り返さないでください。

操作手順

1. ステップ5で**Proteinase K**分解を行なうために、水浴あるいはヒーティングブロックを**55℃**にセットする。
2. 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3**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。

RNAlater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。RNAlater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RNAlater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RNAlaterあるいはAllprotect Reagentで処理、瞬間凍結、あるいはステップ3で破砕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RNAlater 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。

3. **3a、3b、3c**に従って**Buffer RLT**（組織は**5 mg**以下を使用）中で組織を破砕し、

ライセートをホモジナイズする。

破碎およびホモジナイゼーションに関する詳細は英語版 Handbook 12 ページの “Disrupting and homogenizing starting material” を参照ください。

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）。

注：2 μg 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/μl の溶液を 5 μl）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 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、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 RNA 収量が一般的に増加します。

3a. 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。150 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 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、プローブの先端をバッファー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。

3b. 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 150 μl の Buffer RLT を即座に添加する。
- TissueLyser Adapter Set 2 x 24 にチューブを入れる。

- **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る。**Tissuelyser** にセットして **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4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。

3c. 乳鉢と乳棒を用いて破碎した後に **QIAshredder** ホモジナイザーあるいは注射針とシリンジを用いてホモジナイゼーション：

- 重量測定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。

- 粉末状の組織と液体窒素を、液体窒素で冷却済みの **RNase フリー** の **2 ml** マイクロチューブに移す（別途準備）。液体窒素を蒸発させる。組織が解凍しないように注意する。

- **150 μ l** の **Buffer RLT** を添加する。

- **2 ml** のコレクションチューブにセットした **QIAshredder** スピンカ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4に進む。

4. **295 μ l** の **RNase フリー** 水をホモジネートに添加する。その後 **QIAGEN Proteinase K** 溶液を **5 μ l** 添加し、ピペッティングにより完全に混合する。

5. **55°C** で **10分間** インキュベートする。

6. 室温 (**15~25°C**)、**10,000 x g** で **3分間** 遠心操作する。

組織残屑の小さいペレットと共に上清の表面に薄膜あるいはフィルムが形成されることがあります。

7. 上清 (約 **450 μ l**) を新しいチューブ（別途準備）にピペットで移す。

ペレットが混入しないように気をつけます。少量のペレットが混入しても **RNeasy** 操作には影響しません。上清の表面に薄膜やフィルムが存在する場合には、薄膜の下にピペットチップを入れると、この層は通常ピペットチップの外側に付着し、混入することはありません。

8. 清澄化したライセートに半量の96～100%エタノール（通常225 µl）を添加し、ピペティングにより十分に混和する。遠心操作は行なわない。すぐにステップ9に進む。

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。

9. 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。ろ液を棄てる*。

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 60 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10で再使用します。

10. 350 µl の Buffer RW1 を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉め、スピнка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。ろ液を棄てる*。

コレクションチューブはステップ13で再使用します。

オプション：カラム上でのDNase処理が必要でない場合には、代わりに700 µl の Buffer RW1 を添加し、≥8,000 x g で15秒間遠心操作します。ろ過画分とコレクションチューブを捨てます*。ステップ14に進みます。

11. 10 µl の DNase I ストック溶液を70 µl の Buffer RDD に添加する。チューブを静かに転倒させて溶液を混和する。

注：DNase I は物理的変性に特に敏感です。チューブを静かに上下して混和させます。ボルテックスで混和しないでください。

12. DNase I インキュベーション溶液（80 µl）を RNeasy MinElute Spin Column メンブレンにピペットで直接アプライし、室温で（20～30℃）15分間静置する。

注：DNase I インキュベーション反応液を直接 RNeasy MinElute Spin Column メンブレンにピペットで添加したことを確認してください。溶液の一部がスピнкаラムの壁やリングについていると、DNase 分解は不完全になります。

13. 350 µl の Buffer RW1 を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉め、スピнка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。ろ液とコレクションチューブを捨てる*。

14. 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нкаラムに Buffer RPE 500 µl を添加する。蓋を静かに閉め、スピнка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。ろ液を棄てる。

コレクションチューブはステップ15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）。

* Buffer RLT や Buffer RW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

15. **RNeasy MinElute Spin Column**に500 μ lの80%エタノールを添加する。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分間遠心操作する。ろ液画分と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。

16. **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нкаラムの蓋を開け、最大速度で5分間遠心操作する。ろ過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нка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。

17. **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 μ lをスピнка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 μ 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нкаラム・メンブレンが十分に水和できないため、10 μ 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 μ lです：14 μ lのRNase フリー水で溶出すると12 μ 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)。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)。

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トータルRNA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ホルマリン固定サンプルからのトータルRNA精製にはRNeasy FFPE Kit (Cat. no. 74404) 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が分解されることがあります。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するか、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) およびP.A.L.M. Microlaser Technologies (www.palm-mikrolaser.com) から入手できます。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Micro Kitを初めて使う際には、“Important Notes” (英語版 Handbook 10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 50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、サンプルの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4の組織ライセートは-70℃で数カ月間保存できます。ステップ5を行なう前に、凍結したライセートが完全に解凍し、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。
- Buffer RLTおよびBuffer RW1はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含んだ殺菌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。
- 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。遠心機は20℃以下にならないように確認してください。
- 以下の操作中、Leica AS LMD System (バッファ量を減らす必要性あり) は▲、他のレーザー・マイクロダイセクション・システムは●を参照してください。

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 あたり 10 μ l の β -ME 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 を添加した Buffer RLT は室温 (15 ~ 25 $^{\circ}$ C) 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 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。
- 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 14 ページの “Carrier RNA” を参照)。初めて使用する前にキャリア RNA (310 μ g) 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 $^{\circ}$ C で保存します。このストック溶液を用いて RNA プレップごとに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 μ g/ml (= 310 ng/ μ l) です。10 プレップ用のワーキング溶液 (4 ng/ μ l) を調製するためには、5 μ l の RNA ストック溶液に 34 μ l の Buffer RLT を添加し、ピペッティングにより混和します。この希釈液 6 μ l を 54 μ l の Buffer RLT に添加すると、4 ng/ μ l のワーキング溶液になります。この溶液 5 μ l 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 は濃縮液としてお届けします。キットを初めて使用する場合は、まずボトルに記載されているように 4 倍量のエタノール (96 ~ 100 %) を添加し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。
- Buffer RLT は保存中に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。
- RNase-Free DNase Set を初めて使用する場合は、まず DNase I ストック溶液を準備します。DNase I (1,500 Knitz units) を付属の RNase フリー水 550 μ l で溶解します。DNase I 溶液の飛散を避けるために、容器を開けないでください。RNase フリーの注射針とシリンジを用いて容器に RNase フリー水を注入します。容器を逆さにして、静かに溶かしてください。**ボルテックスで混和しないでください。**

溶解した DNase I の長期保存にはガラス容器からストック溶液を取り出し、1 回に使用する量を分注して、-20 $^{\circ}$ C で最高 9 ヶ月保存できます。解凍した溶液は 2 ~ 8 $^{\circ}$ C で 6 週間まで保存できます。凍結融解は繰り返さないでください。

操作手順

1. サンプルを適切な量のBuffer RLT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あるいは●300 µl以上使用しない）。
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）。
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。
Leica AS LMD Systemを使用した場合にはこのステップは通常必要ありません。
3. Buffer RLTでサンプル容量を▲75 µlあるいは●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”に記述されているようにキャリアRNAを準備します。
4. 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。
5. ホモジナイズされたライセートに同量の70%エタノールを添加し、ピペッティングにより、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中のロスにより、ライセートは▲75 µlあるいは●350 µlよりも少なくなります。
注：エタノールの添加後、沈殿物が見られることがあります。これは操作には影響しません。
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。ろ液を棄てる*。
コレクションチューブはステップ7で再使用します。
7. 350 µlのBuffer RW1をRNeasy MinElute Spin Columnに添加する。蓋を静かに閉め、スピンカラム・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。ろ液を棄てる*。
コレクションチューブはステップ10で再使用します。
オプション：カラム上でのDNase処理が必要でない場合には、代わりに700 µlのBuffer RW1を添加し、≥8,000 x gで15秒間遠心操作します。ろ過画分とコレクションチューブを捨てます*。ステップ11に進みます。
8. 10 µlのDNase Iストック溶液を70 µlのBuffer RDDに添加する。チューブを静かに転倒させて溶液を混和する。

* Buffer RLTやBuffer RW1を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 6ページをご覧ください。

注：DNase Iは物理的変性に特に敏感です。チューブを静かに上下して混和させます。ボルテックスで混和しないでください。

9. **DNase Iインキュベーション溶液 (80 μ l) をRNeasy MinElute Spin Column メンブレンにピペットで直接アプライし、室温で (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) 15 分間静置する。**

注：DNase Iインキュベーション反応液を直接RNeasy MinElute Spin Column メンブレンにピペットで添加したことを確認してください。溶液の一部がスピncラムの壁やOリングについていると、DNase 分解は不完全になります。

10. **350 μ l のBuffer RW1 をRNeasy MinElute Spin Column に添加する。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。ろ液とコレクションチューブを捨てる[†]。**

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ラムにBuffer RPE 500 μ l 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。ろ液を棄てる。**

コレクションチューブはステップ12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)。

12. **RNeasy MinElute Spin Column に500 μ l の80 %エタノールを添加する。蓋を静かに閉め、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。ろ液画分と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。

13. **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。ろ過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。

[†] 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. 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 μ lをスピнка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 μ 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нкаラム・メンブレンが十分に水和できないため、10 μ 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のデッドボリュームは2 μ lです：14 μ lのRNaseフリー水で溶出すると12 μ 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)。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)。

プロトコール：RNAのクリーンアップと濃縮

RNeasy Micro Kitは異なる方法で分離されたRNA、ラベリングやDNase分解など酵素反応液からのRNAのクリーンアップと濃縮に使用できます。PAXgene® Blood RNA Kitを用いた細胞トータルRNAの濃縮に関しては、RNeasy MinElute Cleanup Kit (Cat. no. 74204) を使用することをお奨めします。

スタートサンプル量の正確な測定

容量が200 µlまでの溶液で最高45 µgのRNAがこのプロトコールでクリーンアップ可能です。この量はRNeasy MinElute Spin Columnの結合容量に相当します。

実験を始める前の重要事項

- 初めてRNAを調製する場合にはAppendix A（英語版Handbook 50ページ）をお読みください。
- RNeasy MinElute シリカメンブレン・テクノロジーによりほとんどのDNAを効果的に除去するので、DNase処理は通常必要ではありません。しかし非常に微量のDNAにも敏感なある種のRNAアプリケーション（例；コピー数の少ないターゲットを用いたTaqMan® RT-PCR）にはDNA除去処理を追加する必要があります。このような場合、RNAクリーンアップを開始する前にDNAはDNase分解による除去が可能です（英語Handbook 59ページのAppendix D参照）。
- Buffer RLTおよびBuffer RW1はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含んだ殺菌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。
- 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。遠心機は20℃以下にならないように確認してください。
- 以下の操作でスタートサンプル量が100 µl以下の場合は▲、100～200 µlの場合は●を参照してください。

実験開始前の準備事項

- Buffer RPEは濃縮液としてお届けします。キットを初めて使用する場合は、まずボトルに記載されているように4倍量のエタノール（96～100%）を添加し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。
- Buffer RLTは保存中に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（15～25℃）にして使用します。

- オプション：夾雑物を含むRNA プレップ（塩析後など）や、RNase 含有量の多いサンプルをクリーンアップする場合は、使用前に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 あたり 10 μl の β-ME 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 を添加した Buffer RLT は室温で最高 1 ヶ月間保存できます。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 は室温で最高 1 ヶ月間保存できます。

操作手順

1. RNase フリー水を用いてサンプルを▲ 100 μl あるいは● 200 μl に調整する。▲ 350 μl あるいは● 700 μl の Buffer RLT を添加して十分に混和する。

RNA ペレットから始める場合には、Buffer RLT を添加する前にペレットが RNase フリー水（添付）で完全に溶解されていることを確認してください。

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

2. 希釈した RNA に▲ 250 μl あるいは● 500 μl の 96～100% エタノールを添加し、ピペティングにより完全に混和する。遠心操作は行なわない。すぐにステップ 3 に進む。

3. 2 ml コレクションチューブ（添付）にセッティングした RNeasy MinElute Spin Column にサンプル（700 μl）をアプライする。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。ろ液を棄てる*。

● 700 μl 以上のサンプルでは、残ったサンプルをアプライし（700 μl まで）、遠心操作を繰り返す。ろ液を棄てる*。

4. オプション：700 μl の Buffer RW1 を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉め、スピнка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。ろ液とコレクションチューブを捨てる*。

5. 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нкаラムに Buffer RPE 500 μl を添加する。蓋を静かに閉め、スピнка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。ろ液を棄てる。

コレクションチューブはステップ 6 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）。

* Buffer RLT や Buffer RW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

6. **RNeasy MinElute Spin Column**に500 μ lの80%エタノールを添加する。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分間遠心操作する。ろ液画分と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。

7. **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нкаラムの蓋を開け、最大速度で5分間遠心操作する。ろ過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нка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。

8. **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 μ lをスピнка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 μ 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нкаラム・メンブレンが十分に水和できないため、10 μ 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 μ lです：14 μ lのRNase フリー水で溶出すると12 μ 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)。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)。

トラブルシューティングガイド

コメント

RNeasy MinElute Spin Columnの目詰まり

- a) 破碎、ホモジナイゼーションが不十分
- 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 12 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。
- タンパク質が豊富な組織を調製する場合には、10 ページのプロトコルよりも繊維性組織からのトータルRNAのプロトコル（17 ページ）を使用する方が良い結果が得られることがある。
- 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（各プロトコルを参照）。正確なサンプル量で実験を始めることが重要である。
- 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。RNeasy MinElute Spin Column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) 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 12 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ーの量とホモジナイゼーション時間を増やす。
- タンパク質が豊富な組織を調製する場合には、10 ページのプロトコルよりも繊維性組織からのトータルRNAのプロトコル（17 ページ）を使用する方が良い結果が得られることがある。

コメント

- b) スタート・サンプル量が多すぎる 次回の調製ではスタートサンプル量を減らす（各プロトコルを参照）。正確なサンプル量で実験を始めることが重要である。
- c) RNAがスピнкаラム・メンブレン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) 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 を乾燥す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こる。
- e) 80%エタノールを RNase フリー水で調製していない RNeasy MinElute Spin Column の洗浄に使用する80%エタノールは必ずRNase フリー水で調製しなければならない。各プロトコルの“実験開始前の準備事項”に記述されているようにエタノール（96～100%）とキット添付のRNase フリー水を用いて80%エタノールを調製する。

RNA 収量が低いあるいは皆無

- a) RNase フリー水の添加が不適切 RNeasy MinElute Spin Column メンブレンの中央にRNase フリー水をピペットでアプライし、完全にメンブレンを覆うようにする。
- 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 を乾燥す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こる。
- c) 80%エタノールを RNase フリー水で調製していない RNeasy MinElute Spin Column の洗浄に使用する80%エタノールは必ずRNase フリー水で調製しなければならない。各プロトコルの“実験開始前の準備事項”に記述されているようにエタノール（96～100%）とキット添付のRNase フリー水を用いて80%エタノールを調製する。

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 52 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 RNAlater RNA Stabilization Reagent あるいは Allprotect Tissue 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°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)。

Appendix A (英語版 Handbook 50 ページ) および “Handling and storage of starting material” (英語版 Handbook 11 ページ) を参照。

- b) RNase の混入

全ての 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 50 ページ、Appendix A を参照する。

RNase 処理を行なった DNA 調製の際に使用した真空乾燥機や遠心機に RNA サンプルを入れない。

- c) 80% エタノールを
RNase フリー水で調製
していない

RNeasy MinElute Spin Column の洗浄に使用する 80% エタノールは必ず RNase フリー水で調製しなければならない。各プロトコルの “実験開始前の準備事項” に記述されているようにエタノール (96~100%) とキット添付の RNase フリー水を用いて 80% エタノールを調製する。

コメント

ダウンストリーム実験でDNAが混入

DNase処理していない プロトコールに記載されているように、カラム上でのDNase分解を行なったことを確認。

RNAを用いたダウンストリーム実験で最適な結果が得られない

- a) エタノールのキャリアーオーバー 80%エタノールで洗浄した後、RNeasy MinElute Spin Columnを乾燥す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こる。
- b) 溶出の際に塩類がキャリアーオーバー 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。
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。
- c) 非常に微量のRNAを逆転写反応に使用した 非常に微量のRNAで逆転写酵素反応を行なう場合には、50 ng以下のRNAからのcDNA合成用に特別にデザインされたSensiscript® RT Kitを使用することを推奨する。リアルタイムPCRに使用するcDNAの合成には、幅広いRNA量（10 pg~1 µg）に対応するQuantiTect Reverse Transcription Kit、あるいはわずか1 ngのRNAから全トランスクリプトーム増幅を実現するQuantiTect Whole Transcriptome Kitを推奨する。英語版 Handbook 61 ページのオーダーインフォメーションを参照。

Trademarks: QIAGEN®, MinElute®, QuantiTect®, RNAprotect®, RNeasy®, SensiScript®, TissueRuptor™ (QIAGEN Group); Leica® (Leica Microsystems GmbH); TaqMan® (Roche Group); PAXgene® (PreAnalytiX 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。

© 2003–2007 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

