

RNeasy® Mini プロトコールとトラブルシューティング

RNeasy Mini Kit

動物細胞、動物組織、バクテリア、酵母からの
トータルRNA精製およびRNAクリーンアップ用

RNeasy Protect Mini Kit

採取した動物組織からのRNAの迅速な安定化と続く
トータルRNA精製

RNeasy Plant Mini Kit

植物および糸状菌類からのトータルRNA精製用



目次

プロトコール

遠心法を用いた動物細胞からのトータルRNA精製	3
吸引法 / 遠心法を用いた動物細胞からのトータルRNA精製	9
採取した動物組織からのRNAの安定化	14
動物組織からのトータルRNA精製	17
酵母からのトータルRNA精製	23
植物細胞や組織、糸状菌類からのトータルRNA精製	30
RNAクリーンアップ	34
トラブルシューティング	36

プロトコール：遠心法を用いた動物細胞からのトータルRNA精製

このプロトコールにはRNeasy Mini Kitが必要です。

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。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
- RNeasy スピнкаラムのRNA結合容量（100 µg RNA）
- 効率的な溶解に必要なBuffer RLT容量（使用できるBuffer RLTの最大容量により、スタートサンプルの最大量は細胞数 1×10^7 個までに限定される）

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決定する方法について実例をあげて以下で説明します：

- COS細胞は高含有量のRNAを有しています（ 10^6 個の細胞当たり約35 µgのRNA）。RNeasyスピнка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 個の細胞当たり約15 µgのRNA）。RNeasyスピнка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細胞は低含有量のRNAを有しています（ 10^6 個の細胞当たり約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 19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、 $3 \sim 4 \times 10^6$ 個以下の細胞数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の収量および純度が顕著に低下するため、RNeasyスピнкаラム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細胞を数えることです。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。

表4. 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-well	0.32 ~ 0.6	4 ~ 5 × 10 ⁴
■ 48-well	1	1 × 10 ⁵
■ 24-well	2	2.5 × 10 ⁵
■ 12-well	4	5 × 10 ⁵
■ 6-well	9.5	1 × 10 ⁶
ディッシュ		
■ 35 mm	8	1 × 10 ⁶
■ 60 mm	21	2.5 × 10 ⁶
■ 100 mm	56	7 × 10 ⁶
■ 145 ~ 150 mm	145	2 × 10 ⁷
フラスコ		
■ 40 ~ 50 ml	25	3 × 10 ⁶
■ 250 ~ 300 ml	75	1 × 10 ⁷
■ 650 ~ 750 ml	162 ~ 175	2 × 10 ⁷

* 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。動物細胞の長さは10 ~ 30 μmで変動するために、細胞数も動物細胞の種類により異なります。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Kitを初めて使う際には、“Important Notes”(英語版Handbook 18ページ)をお読みください。
- RNAを初めて取り扱う方はAppendix A(英語版Handbook 63ページ)をまずお読みください。
- 細胞ペレットは後で使用するために-70 °Cで保存することも、またすぐに調製することも可能です。凍結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を少し解凍します。ステップ3でホモジナイズした細胞ライセートは数カ月間-70 °Cで保存できます。使用時には凍結したライセートを完全に解凍し、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、3000 ~ 5000 × 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を続けて行ないます。

- Buffer RLTは保存中に沈殿物を生じることがあります。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。
- Buffer RLTとBuffer RW1はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤などの消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版Handbook 8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で行なってください。調製中は迅速に操作を行なってください。
- 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2000rpm以下にならないように確認してください。

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、β-ME（β-mercaptoethanol）をBuffer RLTに添加することをお奨めします。1 mlのBuffer RLT当たり10 μlのβ-MEを添加してください。適切な保護着を着用し、ドラフト内で調製してください。β-MEを添加したBuffer RLTは室温で最高1ヶ月間保存できます。
- Buffer RPEは濃縮液でお届けします。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。
- カラム上でDNase分解を行なう場合には、Appendix Dの記載（英語版Handbook 69ページ）に従ってDNase Iストック溶液を調製します。

操作手順

1. ステップ1aあるいは1bに従って細胞を回収する。

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、溶解が阻害されたりライセートが希釈され、RNeasyメンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。これによりRNA収量が減少することがあります。

1b. 付着細胞（細胞は 1×10^7 個以上使用しない）：

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後細胞ペレットとして回収し溶解することができる。細胞培養フラスコの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メンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。これによりRNA収量が減少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製遠心チューブ（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メンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。これによりRNA収量が減少することがあります。

2. Buffer RLTを添加して細胞を破砕する。

ペレット化した細胞は指で軽く叩きルーズにする。適切な量のBuffer RLT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。

表5. 溶解した細胞ペレットに対するBuffer RLT量

ペレット化した細胞の数	Buffer RLT量 (μl)
<5 x 10 ⁶	350
5 x 10 ⁶ ~ 1 x 10 ⁷	600

付着細胞を直接溶解するためには、適切な容量のBuffer RLT（表6参照）をディッシュ内の細胞に添加する。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。

表6. 細胞の直接溶解に使用するBuffer RLT量

ディッシュの直径 (cm)	Buffer RLT量 (μl)*
<6	350
6 ~ 10	600

* 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記の量を添加します。

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に関しては、英語版 Handbook 20 ~ 23 ページの “ Disruption and homogenization of starting material ” を参照してください。 1×10^5 個以下の細胞を調製する場合には、細胞を 1 分間ボルテックスしてホモジナイズします。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 分間遠心操作する。ステップ 4 に進む。
- 3b. ローター/ステーター方式ホモジナイザー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. 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. 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。遠心操作は行わない。
- 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 μ l または 600 μ l よりも少なくなります。
- 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。
5. 最高 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 (添付) 中にセットした RNeasy スピнкаラムにアプライする。蓋を静かに閉めて、8000 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 6 で再使用します。
- サンプルが 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、ろ液を捨てます*。
- オプション：オプションでカラム上の DNase 分解 (英語版 Handbook 23 ページ “ Eliminating genomic DNA contamination ”) を行なう場合には、このステップ後に D1 から D4 (英語版 Handbook 69 ページ) 行ないます。
6. 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に 8000 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 7 で再使用します。

* Buffer RLT や Buffer RW1 を含んだろ過液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

注：遠心操作後、RNeasy スピнкаラムがろ液と接触しないように注意してカラムをコレクションチューブから取り出します。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。

オプションのカラム上での DNase 分解（英語版 Handbook 69 ページ）を行なう場合はこのステップは省略してください。

7. RNeasy スピнкаラムに 500 μ l の Buffer RPE 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 8000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。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：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）。

8. RNeasy スピнкаラムに 500 μ l の Buffer RPE を添加する。蓋を静かに閉め、RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥するため、8000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心操作する。

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、長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥します。残留エタノールはダウ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、RNeasy スピнкаラムがろ液と接触しないように注意して、カラムをコレクションチューブから取り除きます。これにより、エタノールのキャリアオーバーを防止することができます。

9. 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（添付）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。蓋を静かに閉めて、最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

Buffer RPE のキャリアオーバーの可能性を排除するため、あるいはステップ 8 の後 RNeasy スピнкаラムの外側にろ液が残っている場合はこのステップを行ないます。

10. RNeasy スピнкаラムを新しい 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 30 ~ 50 μ l を直接スピнкаラム・メンブレンに添加する。蓋を静かに閉め、8000 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。

11. 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 10 での溶出液を用いて（高濃度の RNA が必要な場合）ステップ 10 を再度行なう。ステップ 10 のコレクションチューブに溶出する。

ステップ 10 の溶出液を用いた場合の 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。RNA の最終濃度は高くなります。

プロトコール：吸引法 / 遠心法を用いた動物細胞からのトータルRNA精製

このプロトコールにはRNeasy Mini Kitが必要です。

スタートサンプル量の正確な測定

本誌3ページの“スタートサンプル量の正確な測定”を参照。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Kitを初めて使う際には、“Important Notes”(英語版 Handbook 18ページ)をお読みください。
- RNAを初めて取り扱う方はAppendix A(英語版 Handbook 63ページ)をまずお読みください。
- 細胞のペレットは-70 で保存することも、またすぐ実験に使用することも可能です。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 で数カ月間保存できます。使用時には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。不溶性物質が確認される場合には、3000 ~ 5000 x gで5分間遠心します。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チューブに移してステップ4を行なってください。
- Buffer RLTは保存中に沈殿物を生じることがあります。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。
- Buffer RLTとBuffer RW1はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤などの消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版 Handbook 8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で行なってください。調製中は迅速に操作を行なってください。
- 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。
- プレップあたり10°個以上の細胞は使用しないでください。吸引操作での流速が同等になる様、それぞれのプレップの細胞数はほぼ同じにしてください(最大と最少で2倍以上差が無いようにしてください)。
- ロ - ディングステップの間は吸引装置のスイッチを必ず切り、各サンプルの条件を一定に保つために常圧に戻してください。これは吸引装置と吸引マニホールドの間にVacuum Regulatorを設置することで可能です。
- 引圧状態の吸引マニホールドの近くで仕事をする場合には、安全メガネを着用してください。

- 吸引中はRNeasyスピンの蓋はいつも開けておいてください。
- それぞれの吸引ステップにおけるろ液は、QIAvac 24 Plus、QIAvac 24 baseあるいはQIAvac 6Sのwaste trayの中に集められます。各廃液トレイは24サンプルからの廃液を集めることができます。操作終了後、廃液を捨て、QIAvac 24 Plus HandbookまたはQIAvac Handbookに記述されているように、吸引マニホールドをきれいにしてください。他社の吸引マニホールドを使用する際はメーカーの説明書に従ってください。

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を精製するには、β-ME (β-mercaptoethanol) をBuffer RLTに添加することをお奨めします。1 mlのBuffer RLT当たり10 μlのβ-MEを添加してください。適切な保護着を着用し、ドラフト内で調製してください。β-MEを添加したBuffer RLTは室温で最高1ヶ月間保存できます。
- Buffer RPEは濃縮液でお届けします。キットを始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。
- カラム上でDNase分解を行なう場合には、Appendix Dの記載(英語版Handbook 69ページ)に従ってDNase Iストック溶液を調製します。
- メーカーの説明書に従って吸引マニホールドをセットアップします。QIAvac Plus 24を使用する際はQIAvac 24 Plus Handbookを参照してください。QIAvac 24あるいはQIAvac 6Sを使用する際はQIAvac Handbookを参照してください。ルアーコネクタに各RNeasyミニカラムを挿入します。

操作手順

1. ステップ1aあるいは1bに従って細胞を回収する。
 - 1a. 浮遊細胞(細胞は 1×10^6 個以上使用しない):

細胞数を決める。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メンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。これによりRNA収量が減少することがあります。
 - 1b. 付着細胞(細胞は 1×10^6 個以上使用しない):

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後細胞ペレットとして回収し溶解することができる。細胞培養フラスコの細胞は必ずトリプシン処理を行なう。

直接細胞溶解:

細胞数を決める。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メンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。これによりRNA収量が減少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。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。

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メンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。これによりRNA収量が減少することがあります。

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指で軽く叩きルーズにする。350 µlのBuffer RLTを添加する。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、RNA収量が低下します。

付着細胞の直接溶解には350 µlのBuffer RLTを細胞培養ディッシュに添加する（350 µlで培養ディッシュを覆えない場合は、代わりに600 µlのBuffer RLTを添加；この場合、ステップ4で600 µlの70%エタノールを使用する）。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に関しては、英語版 Handbook 20～23ページの“Disruption and homogenization of 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分間ボルテックスしてホモジナイズします。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分間遠心操作する。ステップ4に進む。
- 3b. ローター/ステーター方式ホモジナイザー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. 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. 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、ピペティングによりよく混和する。遠心操作は行わない。

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または600 µlよりも少なくなります。

注：ある種の細胞株からのRNA精製では、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. ステップ4からのサンプル（形成した沈澱も含む）700 µlを吸引マニホールド上のRNeasyカラムにアプライする。

6. 吸引装置のスイッチを入れる。完全に流出するまで吸引する。吸引装置のスイッチを切って、吸引マニホールドの圧力を戻す。

サンプルを注入する前に、吸引マニホールドが正しく設置されているかを確認してください。ろ液はQIAvac 24 Plus、QIAvac 24 baseあるいはQIAvac 6Sのwaste trayの中に集められます*。万スピンカラムが詰まった時はポンプを切り、常圧に戻してから、もう一度行なってください。まだ目詰まりしている場合には、3ページのプロトコール“遠心法を用いた動物細胞からのトータルRNA精製”で実験を続けてください。

注：各サンプルの条件を一定に保つために、吸引装置のスイッチを必ず切り、ピペティングステップ中のマニホールドを常圧に戻してください。

7. 必要な場合には、残ったサンプル（約500 µl）でステップ5と6を繰り返す。

ろ液はQIAvac 24 Plus、QIAvac 24 baseあるいはQIAvac 6Sのwaste trayの中に集められます*。

8. 700 µlのBuffer RW1をRNeasyスピンカラムに添加する。

9. 吸引装置のスイッチを入れる。完全に流出するまで吸引する。吸引装置のスイッチを切って、吸引マニホールドの圧力を戻す。

ろ液はQIAvac 24 Plus、QIAvac 24 baseあるいはQIAvac 6Sのwaste trayの中に集められます*。

10. 各RNeasyスピンカラムに500 µlのBuffer RPEを添加する。

注：Buffer RPEは濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer RPEに添加したことを確認します（“実験を始める前の準備事項”を参照）。

11. 吸引装置のスイッチを入れる。完全に流出するまで吸引する。吸引装置のスイッチを切って、吸引マニホールドの圧力を戻す。

ろ液はQIAvac 24 Plus、QIAvac 24 baseあるいはQIAvac 6Sのwaste trayの中に集められます。

12. 各RNeasyスピンカラムに500 µlのBuffer RPEを添加する。

* 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 8ページをご覧ください。

13. 吸引装置のスイッチを入れる。完全に流出するまで吸引する。吸引装置のスイッチを切って、吸引マニホールドの圧力を戻す。
ろ液はQIAvac 24 Plus、QIAvac 24 baseあるいはQIAvac 6Sのwaste trayの中に集められます。
14. 吸入マニホールドからRNeasyスピнкаラムをはずし、2 mlコレクションチューブ（添付）の中に入れる。蓋を静かに閉めて、最高スピードで1分間遠心操作を行なう。
15. 各RNeasyスピнкаラムを新しい1.5 mlのコレクションチューブ（添付）に移す。RNaseフリー水30 ~ 50 μ lを各スピнкаラム・メンブレンに直接添加する。蓋を静かに閉め、8000 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。
16. 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15での溶出液を用いて（高濃度のRNAが必要な場合）ステップ15を再度行なう。ステップ15のコレクションチューブに溶出する。
ステップ15の溶出液を用いた場合のRNA量は、RNaseフリー水を2回用いて得られる量より15 ~ 30 %少なくなりますが、RNAの最終濃度は高くなります。

プロトコール：採取した動物組織からのRNAの安定化

このプロトコールではRNeasy Protect Mini Kitに含まれているRNAlater® RNA Stabilization Reagentを用いてヒトあるいは動物組織を安定化して保存する操作方を記述しています。安定化した組織からのRNA精製は、“動物組織からのトータルRNA精製用プロトコール”(本誌17ページ)をご覧ください。

RNAlater RNA Stabilization Reagentに関する重要事項

採取した動物組織を十分な量のRNAlater RNA Stabilization Reagent中に完全に沈めるまでは組織中のRNAは保護されていません。採取後、組織は少なくとも10倍量のRNAlater RNA Stabilization Reagent(あるいは組織1 mgに対して10 µlの溶液)の中に即座に入れます。必要なら多量の溶液を使用することもできます。この試薬の量が少ないと保存中にRNAの分解を起こします。全組織を試薬が覆える程度の大きさの容器で保管します。直径の大きいチューブや容器では、組織を完全に覆うための試薬がさらに大量に必要になります。組織採取およびRNA安定化操作はできるだけ迅速に行ないます。

組織の大きさは、RNAlater RNA Stabilization ReagentによりRNAを安定化する際に重要です。試薬が組織と接触すると直ぐに、組織の表面層および外側に試薬が浸透します。組織の内側のRNAも迅速かつ確実に安定化するためには、サンプルを0.5 cm未満にカットします。組織片は、少なくとも1箇所の寸法が0.5 cm以下になるようなサイズにしてください。厚さが0.5 cm以上の組織片では、サンプルの中心部分へ試薬がゆっくり浸透し、RNAの分解が生じます。ラット腎臓や脾臓のような小さな器官、あるいはほとんどのマウス組織(肝臓を除く)ではスライスする必要がありません：組織全体をRNA later RNA Stabilization Reagentに浸します。

RNA安定化に必要なRNAlater RNA Stabilization Reagentの量を決定する際に下記を参考にしてください：

- 一辺が5 mmの立方体のラット腎臓 ($[5 \text{ mm}]^3 = 125 \text{ mm}^3 = 125 \text{ µl}$) の重量は150 ~ 175 mgで、少なくとも1.5 ~ 1.75 mlの試薬が必要です。
- 一辺が3 mmの立方体のラット組織 ($[3 \text{ mm}]^3 = 27 \text{ mm}^3 = 27 \text{ µl}$) の重量は30 ~ 35 mgで、少なくとも300 ~ 350 µlの試薬が必要です。

組織重量の測定は通常は正確に行ないませんが、安定化していない組織中のRNAは測定中に分解を始めます。従って重量を測定するよりも組織片の重量を簡易的に見積もる方が効率的な場合があります。成熟マウスの様々な組織に関して全重量の平均値と、使用するRNAlater RNA Stabilization Reagent量を表7に記載しています。

表 7. 組織重量と RNA^{later} RNA Stabilization Reagent 量

マウス器官	重量 (mg)	RNA ^{later} RNA Stabilization Reagent の量 (ml)
腎臓	180 ~ 250	≥2.5
脾臓	100 ~ 160	≥1.6
肺	190 ~ 210	≥2.1
心臓	100 ~ 170	≥1.7
肝臓	1000 ~ 1800	≥18

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Protect Mini Kit を初めて使う際には、“ Important Notes ” (英語版 Handbook 18 ページ) をお読みください。
- RNA^{later} RNA Stabilization Reagent は、室温 (15 ~ 25) 以下で保存すると沈澱を形成することがあります。使用直前に 37 で振盪すれば形成した沈澱はまた溶解します。
- 新鮮で凍結されていない組織だけが RNA^{later} RNA Stabilization Reagent を用いて安定化可能です。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。

操作手順

1. 組織サンプルを切除する前に、RNA^{later} RNA Stabilization Reagent 中で安定化する組織サンプルの容量 (あるいは重さ) を見積もる。
2. 組織サンプルを保存するために必要な RNA^{later} RNA Stabilization Reagent の適切な量を決定する。少なくとも、組織サンプルの 10 倍の試薬 (あるいは組織 1 mg に対して約 10 μ l) が必要である。正確な量の試薬をピペットで適切な収集容器に入れる。

注：RNA^{later} RNA Stabilization Reagent の中に組織片を完全に沈めます。詳細は上記の “ RNA^{later} RNA Stabilization Reagent に関する重要事項 ” をご覧ください。

3. 動物から組織サンプルを切除し、必要なら 0.5 cm 以下の厚さにカットする。このステップはできるだけ迅速に行ない、直ちにステップ 4 に進む。

注：厚さが 0.5 cm 以下の組織サンプルで効率的な RNA の安定化を行なうことが可能です。詳細は上記の “ RNA^{later} RNA Stabilization Reagent に関する重要事項 ” をご覧ください。

4. **RNAlater RNA Stabilization Reagent**が入ったコレクション容器（ステップ2）に組織片を完全に沈める。

注：RNAを保護するために、**RNAlater RNA Stabilization Reagent**の中に組織片を迅速に沈めます。

5. **RNAlater RNA Stabilization Reagent**の中に沈めた組織は、2 ~ 8 では最高4週間、15 ~ 25 では最高7日間、37 では最高1日保存できる。

-20 °Cでの長期保存には、まず試薬中のサンプルを2 ~ 8 °Cで一晩インキュベートした後、試薬中の組織を-20 °Cで保存する。

-80 °Cでの長期保存にはまず試薬中の組織を2 ~ 8 °Cで一晩インキュベートする。その後、組織を試薬から取り出し、-80 °Cで保存する。

注：より低い温度で長期保存することをお勧めします（例；37 °Cあるいは室温で保存する代わりに2 ~ 8 °Cで4週間；長期保存には-20 °Cあるいは-80 °C）。

RNAlater RNA Stabilization Reagent中で保存されている組織は-20 °Cでは凍結しません。温度が低いと試薬中に結晶あるいは沈殿が形成されることがあります。この沈殿物はRNA精製には影響しません。沈殿物を溶解させる必要はありません。

RNAlaterで安定化後-20 °Cあるいは-80 °Cで保存されている組織は、室温で解凍して調製し、再び凍結しても、20回までの凍結融解はRNAの品質や収量に影響しません。

組織サンプルを**RNAlater RNA Stabilization Reagent**中で輸送する場合には、輸送中に組織が溶液中に確実に沈むようにしてください。輸送中はチューブを垂直に立てるか、または**RNAlater RNA Stabilization Reagent**でチューブを完璧に充填してください。

6. 保存後は、“動物組織からのトータルRNA精製用プロトコール”（本誌17ページ）に進んでください。

プロトコール：動物組織からのトータルRNA精製

このプロトコールにはRNeasy Mini KitあるいはRNeasy Protect Mini Kitが必要です。

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。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。ほとんどの組織では、これらの組織の量はRNeasyスピнкаラムの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 19ページ）。

脾臓、脳の一部、肺、胸腺などのいくつかの組織は溶解が困難で、RNA分離中に沈殿物を生じる傾向があります。完全なホモジナイゼーションを促進し、収量の顕著な低下、DNAのコンタミネーション、あるいはRNeasyスピнкаラムの目詰まりを避けるために、Buffer RLTの量を増加する必要があります。詳細は下記の操作手順をご覧ください。

骨格筋、心臓、皮膚のような繊維性組織からのRNA精製では、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。これらの組織から最大収量のRNAを精製するにはRNeasy Fibrous Tissue Mini Kitのご利用を推奨します。英語版Handbook 76ページのordering informationをご覧ください。

脂肪を含む組織（脳、脂肪組織）には、QIAzol Lysis Reagentを含むRNeasy Lipid Tissue Mini Kitを使用することで収量が増加します。英語版Handbook 76ページのordering informationをご覧ください。

お客様のスタートサンプルの特性に関する情報がない場合には、10 mg以下の組織を使用することを推奨します。RNAの収量や純度によっては、最高30 mgまでの組織を使用することも可能です。

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3 mmの立方体（27 mm³）の動物組織の重量は30～35 mgです。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版Handbook 18ページ）をお読みください。
- RNAを初めて取り扱う方はAppendix A（英語版Handbook 63ページ）をまずお読みください。
- 最良の結果を得るために、採取した動物組織は本誌14ページにあるRNAlater RNA Stabilization Reagentで迅速に安定化してください。試薬で保存した組織は37 で最高1日、15～25 で7日間、2～8 で4週間、-20 あるいは-80 で長期の保管が可能です。

- 新鮮、凍結あるいはRNAlaterで安定化した組織を使用できます。組織は-70 で数ヶ月保存できます。液体窒素で急激に凍結させ直ちに-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4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。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。
- 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（Buffer RLTの量を適宜増加する）。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。
- Buffer RLTは保存中に沈殿物を生じることがあります。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。
- Buffer RLTとBuffer RW1はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤などの消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版 Handbook 8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で行なってください。調製中は迅速に操作を行なってください。
- 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。

実験を始める前の準備事項

- 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を添加してください。適切な保護着を着用し、ドラフト内で調製してください。 β -MEを添加したBuffer RLT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 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調製して一回分ずつに分注し直ぐに使用するかあるいは凍結します。DTTを添加したBuffer RLTは室温で最高1ヶ月間保存できます。
- Buffer RPEは濃縮液でお届けします。キットを始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。
- カラム上でDNase分解を行なう場合には、Appendix Dの記載（英語版 Handbook 69ページ）に従ってDNase Iストック溶液を調製します。

操作手順

1. 動物から組織サンプルを切除するか保存していたサンプルを取り出す。RNAlaterで安定化した組織をピンセットで溶液から取り出す。サンプル組織の量を決める。30 mg以上使用しない。
組織の計量は、量を決める最も正確な方法です。

注：組織をRNAlater Reagent中で-20 で保存した場合には、形成した結晶をすべて取り除きます。

2. ステップ2aあるいはステップ2bに進む。

2a. RNAlaterで安定化された組織：

全組織を使用する場合には、破碎とホモジナイゼーションのために組織を適切なサイズの容器に直接入れて、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、これを破碎とホモジナイゼーションのために適当なサイズの容器に入れる。ステップ3に進む。

RNAlaterで安定化した組織内のRNAは、常温（15～25）でのカット中および重量測定中は保護されています。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 RNA Stabilization Reagentに入れて保存します。既に安定化されている組織は溶液無しでそのまま-80 で保存できます。

2b. 安定化されていない新鮮な組織あるいは凍結組織：

組織を使用する場合には、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組織を直接入れて、ステップ3にすぐに進む。

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、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る。すぐにステップ3に進む。

組織をRNAlater RNA Stabilization Reagentで処理するか、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。

注：残った新鮮な組織はRNAlater RNA Stabilization Reagentに入れRNAを安定化することができます（14ページのプロトコルを参照）。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あるいは3dに従ってBuffer RLT（組織は30 mg以下を使用）中で組織を破碎し、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法の詳細に関しては、英語版 Handbook 20～23ページの“Disruption and homogenization of starting material”を参照してください。

注：使用前にBuffer RLTにβ-MEを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）。

RNAlater RNA Stabilization Reagentで保存した組織は新鮮あるいは解凍した組織に比べてわずかに固くなります。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 スピン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収量が一般的に増加します。

表8. 組織破碎およびホモジナイゼーションに必要なBuffer RLT量

スタートサンプル量 (mg)	Buffer RLT量 (µl)
<20	350あるいは600*
20 ~ 30	600

* RNAlater RNA Stabilization 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を用います。

3a. ローター / ステーター方式ホモジナイザー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（新鮮、凍結あるいはRNAlaterで安定化した）組織を適切なサイズの容器に入れる。適切な量のBuffer RLTを添加する（表8参照）。すぐにローター / ステーター方式ホモジナイザーを用いて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）。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RNAlaterで安定化）を迅速に液体窒素中に入れ、液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて細かい粉末にする。液体窒素で冷却した2 mlマイクロ遠心チューブ（RNaseフリー、別途準備）に、粉末状の組織と液体窒素を移す。液体窒素を蒸発させる。サンプルが解凍しないように注意する。

適切な量のBuffer RLTを添加する（表8参照）。2 mlのコレクションチューブにセットしたQIAshredderスピンの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。

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、凍結あるいはRNAlaterで安定化）を迅速に液体窒素中に入れ、乳鉢と乳棒を用いて細かい粉末にする。液体窒素で冷却した2 mlマイクロ遠心チューブ（RNaseフリー、別途準備）に、粉末状の組織と液体窒素を移す。液体窒素を蒸発させる。サンプルが解凍しないように注意する。

適切な量のBuffer RLTを添加し（表8参照）、RNaseフリーのシリンジに取り付けた20-Gの注射針中にライセートを少なくとも5回通してホモジナイズする。ステップ4に進む。

3d. TissueLyser を用いた破碎およびホモジナイゼーション :

TissueLyser Handbook を参照する。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。上清をピペット操作により注意深く取り出し、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。

微量の不溶物質が存在するために、3 分間の遠心操作後にペレットが見えないサンプルもあります。

5. 清澄化したライセートに同量の 70 % エタノール* を添加し、すぐにピペッティングにより混和する。遠心操作は行なわない。すぐにステップ 6 に進む。

注 : ステップ 3 および 4 のホモジナイゼーションおよび遠心中のロスにより、ライセートは 350 μ l あるいは 600 μ l 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. 最高 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 (添付) の中にセットした RNeasy スピнкаラムにアプライする。蓋を静かに閉めて、8000 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 7 で再使用します。

サンプルが 700 μ l 以上の場合には、残りのサンプルを続けて同じ 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、ろ液を捨てます。[†]

オプション : オプションでカラム上の DNase 分解 (英語版 Handbook 23 ページ “Eliminating genomic DNA contamination”) を行なう場合には、このステップ後に D1 ~ D4 (英語版 Handbook 69 ページ) 行ないます。

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・メンブレン洗浄のために 8000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。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 スピнкаラムがろ液と接触しないように注意して、カラムをコレクションチューブから取り除きます。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。

オプションのカラム上での DNase 分解 (英語版 Handbook 69 ページ) を行なう場合はこのステップは省略してください。

* 肝臓からの RNA 収量を増やすためには、70 % エタノールの代わりに 50 % エタノールを使用します。

[†] ろ液は Buffer RLT あるいは Buffer RW1 を含んでいるので漂白剤と一緒に使用しないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

8. RNeasy スピнкаラムに 500 μl の Buffer RPE 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 8000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。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. RNeasy スピнкаラムに 500 μl の Buffer RPE 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、8000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心操作する。

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、長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥します。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、RNeasy スピнкаラムがろ液と接触しないように注意して、カラムをコレクションチューブから取り除きます。これにより、エタノールのキャリアオーバーを防止することができます。

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 (添付) に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。蓋を静かに閉めて、最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

Buffer RPE のキャリアオーバーの可能性を排除するため、あるいはステップ 9 の後 RNeasy スピнкаラムの外側にろ液が残っている場合は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 コレクションチューブ (添付) にセットする。RNase フリー水 30 ~ 50 μl をスピнкаラム・メンブレンに直接添加する。蓋を静かに閉め、8000 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 μg 以上の場合には、新しい RNase フリー水 30 ~ 50 μl 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の 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。RNA の最終濃度は高くなります。

プロトコール：酵母からのトータルRNA精製

このプロトコールにはRNeasy Mini Kitが必要です。

酵母細胞の破碎

これは酵母細胞からトータルRNAを精製するためのプロトコールです。酵母の細胞壁の破碎には2種類の 방법이記載されています：

- 酵素溶解：本法では、zymolaseやlyticaseを用いて細胞壁を分解する、細胞のスフェロプラスト化が必要になります。最大 5×10^7 個の酵母細胞までは、スフェロプラストは溶解される前に、遠心操作によって酵素反応液中から分離されます。 2×10^7 個までの酵母細胞では、スフェロプラストの分離を行わず直接酵素反応液をRNeasy操作に用います。
- 機械的な破碎：本法では、酵母細胞を溶解しRNAを遊離するためにBuffer RLTとガラスビーズが入ったTissueLyserあるいはビーズミル中で高速撹拌します。

一般に2つのプロトコールとも同様に機能します。いくつかのアプリケーションでは、酵素溶解の方が設備を必要としないため使い易いかもしれません。しかし機械的な破碎によるプロトコールは、酵素を用いたインキュベーションステップが行えないタイムコースの実験に使用できます。

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。最大使用量は以下の項目により変動します：

- RNeasyスピнкаラムのRNA結合容量（100 μg RNA）
- 効率的な溶解に必要なBuffer RLT容量（使用できるBuffer RLTの最大容量により、スタートサンプルの最大量は酵母細胞数 5×10^7 個までに限定される）

操作する細胞のRNA含有量が高い場合は、RNeasyスピнкаラムのRNA結合容量を超えないように、細胞の数を減らしてご使用ください。RNA含有量が低い酵母細胞では最高の細胞数を使用できます。しかし、RNA量がRNeasyスピнкаラムのRNA結合容量を超えていない場合でも、細胞数が多すぎると不完全な溶解を起こし、その結果RNA収量と純度が低下します。

通常 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 個の酵母細胞を用いてください。酵母の種類と増殖条件により異なりますが、 4×10^7 個の酵母細胞から30 ~ 100 μg のRNAが得られます。

もしスタートサンプルのRNA含有量に関する情報をお持ちでない場合には 2×10^7 個以下の酵母細胞をご使用ください。精製したRNAの収量および純度により、次の調製で細胞数を増加することも可能です。

RNAの収量および純度が顕著に低下するため、RNeasy スピンカラムにオーバーロードしないでください。

通常、酵母の増殖は分光光度計で計測します。しかし、OD値と酵母細胞数の間に、特異的で信頼できる相関関係を定義することは困難です。細胞密度は様々な要素（例えば種、培地、振盪速度）に影響され、細胞培養のOD値は吸収と言うよりは散乱光測定値です。散乱光の測定はサンプルと検出器の距離に大きく影響されるため、分光光度計のタイプによって値が変動します。さらに種が異なると、ある波長でも異なるOD値を示します（例えば600 nmあるいは436 nm）。

適した波長で観測したOD値と plating experiment（例；Ausubel, F.M. et al., eds. [1991] *Current Protocols in Molecular Biology* New York: Wiley Interscienceを参照）で決めた細胞密度を比較して分光光度計の検量線作成をお勧めします。OD値は有意性を確かにするために0.05 ~ 0.3で観測してください。OD値が0.3以上のサンプルの場合は希釈を行なって、測定値がこの範囲に入るようにしてください。希釈率は1 mlあたりの細胞数を計算する時に必要です。

次の値はおおよそのガイドとしてお使いください。1 mlあたり1 ~ 2 x 10⁷個の細胞を含んだ *S.cerevisiae* 培養液を4倍に薄めた場合、Beckman DU®-7400分光光度計でOD₆₀₀は約0.25、Beckman DU-40分光光度計では0.125になります。すなわち1 mlあたりの1 ~ 2 x 10⁷個の酵母のOD値はそれぞれ1.0あるいは0.5になります。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 18 ページ）をお読みください。
- RNA を初めて取り扱う方は Appendix A（英語版 Handbook 63 ページ）をまずお読みください。
- 対数増殖期の酵母細胞を採取してください。酵母を用いた溶解（ステップ 1a あるいは 1b）の場合には新鮮な細胞のみをご使用ください。機械的な破碎を行なう場合は、細胞ペレットは -70 °C で保存することも、またすぐ実験に使用することも可能です。ステップ 1c 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。使用時には凍結したライセートを完全に解凍し、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。ステップ 2 に進みます。
- Buffer RLT は保存中に沈殿物を生じることがあります。必要な場合には、温めて再び溶解した後、室温（15 ~ 25 °C）にして使用します。
- Buffer RLT と Buffer RW1 はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤などの消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。
- 酵素による溶解あるいは機械的な破碎のあと、この実験の全てのステップは室温で行なってください。調製中は迅速に操作を行なってください。

- 細胞収集後すべての遠心操作はマイクロ遠心機で20 から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。

実験を始める前の準備事項

- 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 を添加してください。適切な保護着を着用し、ドラフト内で調製してください。 β -ME を添加した Buffer RLT は室温で最高1ヶ月間保存できます。
- Buffer RPE は濃縮液でお届けします。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。
- カラム上で DNase 分解を行なう場合には、Appendix D の記載(英語版 Handbook 69 ページ)に従って DNase I ストック溶液を調製します。
- 酵素を用いた溶解(ステップ 1a あるいは 1b)には下記のように Buffer Y1 を調製します。1 M ソルビトールおよび 0.1 M EDTA (pH 7.4)が入った溶液を調製します。使用直前に 0.1% β -ME と lyticase/zymolase (最終濃度は 1×10^7 細胞当たり 50 U に調製)を添加します。
使用する酵母菌株および酵素によって、インキュベーション時間、酵素濃度、Buffer Y1 の成分を変更してください。酵素のメーカーのガイドラインに従ってください。
- 機械的な破碎を行なう際は(ステップ 1c)、酸で洗浄済みのガラスビーズ(直径 0.45 ~ 0.55 mm)をドラフト中で濃硝酸に1時間つけた後、蒸留水で洗浄、オープンで加熱乾燥してください。

操作手順

1. ステップ 1a(酵素溶解、細胞数 5×10^7 以下)、ステップ 1b(酵素溶解、細胞数 2×10^7 以下)、ステップ 1c(機械的破碎)に従って酵母ライセートを調製する。
 - 1a. 5×10^7 個以下の新鮮な細胞の酵素溶解 (5×10^7 個以上使用しない):
 - 12 ml あるいは 15 ml の遠心チューブで 4 、 1000 x g で 5 分間遠心分離して酵母細胞を収集する。上清を捨て、残りの溶液を注意深く吸引除去する。後で遠心機を使用する際は、遠心機を 20 ~ 25 に温める。
注: 溶液を完全に除去しないと細胞壁の分解が阻害されます。
 - 新しく調製した 2 ml の Buffer Y1 (Lyticase あるいは zymolase を含む)に細胞を再懸濁する。30 、 10 ~ 30 分間静かに攪拌しながらインキュベートしスフェロプラストを調製する。スフェロプラストは静かに取り扱うこと。
使用する酵母菌株によってはインキュベーションの時間、酵素の量、および Buffer Y1 の成分を変えてください。最適な結果を得るためには、酵素のメーカーのガイドラインに従ってください。完全なスフェロプラスト化は効率的な溶解のために重要です。

- **300 x g**で5分間遠心分離しスフェロプラストをペレット化する。上清を注意深く完全に除去して捨てる。

注：上清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メンブレンへのRNA結合条件が影響を受けます。これによりRNA収量が減少することがあります。

- スフェロプラストを溶解するために**350 µl**のBuffer RLTを添加して激しくボルテックスする。不溶物質が存在する場合にはライセートを最高スピードで2分間遠心分離し、上清のみを次のステップに用いる。

注：使用前にBuffer RLTにβ-MEを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）。

- ホモジナイズしたライセートに同量（通常**350 µl**）の**70 %エタノール**を添加し、ピペットで良く混和する。遠心操作は行なわない。すぐにステップ2に進む。

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。

1b. 2×10^7 個以下の**新鮮な細胞**の酵素溶解（ 2×10^7 個以上使用しない）：

- **12 ml**あるいは**15 ml**の遠心チューブで**4**、**1000 x g**で5分間遠心分離して酵母細胞を回収する。上清を捨てて残りの溶液を注意深く吸引除去する。後で遠心機を使用する際は、遠心機を**20 ~ 25** に温める。

注：溶液を完全に除去しないと細胞壁の分解が阻害されます。

- 新しく調製した**100 ml**のBuffer Y1（Lyticaseあるいはzymolaseを含む）に細胞を再懸濁する。**30**、**10 ~ 30**分間静かに攪拌しながらインキュベートしスフェロプラストを調製する。スフェロプラストは静かに取り扱うこと。

使用する酵母菌株によってはインキュベーションの時間、酵素の量、およびBuffer Y1の成分を変えてください。最適な結果を得るためには、酵素のメーカーのガイドラインに従ってください。完全なスフェロプラスト化は効率的な溶解のために重要です。

- スフェロプラストを溶解するために**350 µl**のBuffer RLTを添加し、激しくボルテックスする。不溶物質が存在する場合には最高スピードで2分間遠心分離し、上清のみを次のステップに用いる。

注：Buffer RLTにβ-MEを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）。

- ホモジナイズしたライセートに**250 µl**のエタノール（**96 ~ 100 %**）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2に進む。

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。

1c. 細胞の機械的な破碎（細胞は 5×10^7 個以上使用しない）:

- TissueLyserまたはビーズミルに装着可能なチューブに、酸処理した約 600 μ l のガラスビーズを添加する（詳細は英語版 Handbook 22 ページを参照）。

- 4 で 1000 x g、5 分間の遠心操作により細胞を回収する。上清を捨て、残りの溶液を注意深く吸引除去する。後で遠心機を使用する際は、遠心機を 20 ~ 25 に温める。

注：上清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 メンブレンへの RNA 結合条件が影響を受けます。これにより RNA 収量が減少することがあります。

- チューブをフリッキングしてペレットをルーズにする。細胞ペレットを再懸濁するために 600 μ l の Buffer RLT を添加し、ボルテックスする。酸処理したガラスビーズにサンプルを添加する。

注：使用前に Buffer RLT に β -ME を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）。

- 細胞が完全に破碎するまで TissueLyser あるいはビーズミル中のサンプルを最高スピードで冷却しながら攪拌する。

ほとんどの小規模なビーズミルは冷却システムを持っていないので、ビーズミルを定期的に止めてサンプルを氷上で冷却してください。細胞破碎に必要な時間、冷却時間およびその間隔は使用しているビーズミルのタイプにより異なります。メーカーの説明書を参考にしてください。

注：ビーズミルでの破碎の代わりにボルテックスを使用すると、RNA 収量が著しく減少します。

- TissueLyser あるいはビーズミルからサンプルを取り出し、ビーズを沈澱させる。ライセート（通常 350 μ l）を新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）に移す。最高速度で 2 分間遠心操作後、上清を新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）に移す。上清のみを次のステップに使用する。

- 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、ピペティングによりよく混和する。遠心操作は行わない。ステップ 2 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 μ l 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。

2. 形成した沈澱も含むサンプル(通常 700 μ l)を、2 ml コレクションチューブ(添付)にセッティングした RNeasy スピнкаラムにアプライする。蓋を静かに閉めて、8000 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3で再使用します。

サンプルが 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、ろ液を捨てます*。

オプション：オプションでカラム上の DNase 分解(英語版 Handbook 23 ページ “Eliminating genomic DNA contamination”)を行なう場合には、このステップ後に D1 ~ D4 (英語版 Handbook 69 ページ)行ないます。

3. 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・メンブレン洗浄のために 8000 x g (10,000 rpm)以上で15秒間遠心する。ろ液を捨てる*。

コレクションチューブはステップ4で再使用します。

注：遠心操作後、RNeasy スピнкаラムがろ液と接触しないように注意して、カラムをコレクションチューブから取り除きます。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。

オプションのカラム上での DNase 分解(Handbook 69 ページ)を行なう場合はこのステップは省略してください。

4. RNeasy スピнкаラムに 500 μ l の Buffer RPE 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 8000 x g (10,000 rpm)以上で15秒間遠心する。ろ液を捨てる。

コレクションチューブはステップ5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)。

5. RNeasy スピнкаラムに 500 μ l の Buffer RPE 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、8000 x g (10,000 rpm)以上で2分間遠心操作する。

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、長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥します。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、RNeasy スピнкаラム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出します。これにより、エタノールのキャリアオーバーを防止することができます。

* Buffer RLT や Buffer RW1 を含んだろ過液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

6. 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（添付）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。蓋を静かに閉めて、最高スピードで1分間遠心操作を行なう。

Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除するため、あるいはステップ5の後RNeasy スピнкаラムの外側にろ液が残っている場合はこのステップを行ないません。

7. RNeasy スピнкаラムを新しい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 30 ~ 50 μ l を直接スピнкаラム・メンブレンに添加する。蓋を静かに閉め、8000 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。
8. 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7での溶出液を用いて（高濃度のRNAが必要な場合）ステップ7を再度行なう。ステップ7のコレクションチューブに溶出する。
ステップ7の溶出液を用いた場合のRNA量は、RNase フリー水を2回用いて得られる量より15 ~ 30 %少なくなりますが、RNAの最終濃度は高くなります。

プロトコール：植物細胞や組織、糸状菌類からのトータルRNA精製

このプロトコールにはRNeasy Plant Mini Kitが必要です。

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、最大100 mgの植物サンプルあるいは 1×10^7 個の細胞を処理することができます。ほとんどの植物サンプルでは、これらの量はRNeasyスピнкаラムのRNA結合容量とBuffer RLTの溶解力を超えません。様々な植物サンプルからの平均RNA収量をTable 2（英語版 Handbook 19ページ）に示しています。

スタートサンプルの性質について情報をお持ちでない場合は、植物サンプル50 mg以下あるいは $3 \sim 4 \times 10^6$ 個以下の細胞をご使用になることをお勧めします。RNAの収量や純度によっては、調製に100 mgまでの植物サンプルあるいは最高 1×10^7 個の細胞を使用することも可能です。

RNAの収量および純度が著者に低下するため、RNeasyスピнкаラム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、細胞数あるいは組織重量を測定することです。一般的に、直径が1.5 cmの葉ディスクの重量は25 ~ 75 mgです。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Plant Mini Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 18ページ）をお読みください。
- RNAを初めて取り扱う方はAppendix A（英語版 Handbook 63ページ）をまずお読みください。
- 新鮮あるいは凍結した組織をご使用ください。組織は -70 で数ヶ月保存できます。液体窒素で急激に凍結させ直ちに -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4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5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。
- RNeasy Plant Mini Kitでは溶解バッファの選択が可能です：チオシアン酸グアニジンを含むBuffer RLT、および塩酸グアニジンを含むBuffer RLCの2種類です。ほとんどの場合、Buffer RLTのチオシアン酸グアニジンが細胞の破砕と変性に適しているため溶解バッファとして使用されます。しかし、ある組織では、二次代謝物質（トウモロコシの乳白色の胚乳や糸状菌類の菌糸体等）の量やタイプにより、チオシアン酸グアニジンがサンプル凝固を起こすことがあり、RNA抽出が不可能になります。このような場合にはBuffer RLCをご使用ください。

- Buffer RLTは保存中に沈殿物を生じることがあります。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。
- Buffer RLT、Buffer RLC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消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版 Handbook 8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2000rpm以下にならないように確認してください。

実験を始める前の準備事項

- 使用前にβ-ME（β-mercaptoethanol）をBuffer RLTあるいはBuffer RLCに添加します。1 mlのBuffer RLTあるいはBuffer RLCあたり10 μlのβ-MEを添加してください。適切な保護着を着用し、ドラフト内で調製してください。β-MEを添加したBuffer RLTあるいはBuffer RLCは室温で最高1ヶ月間保存できます。
- Buffer RPEは濃縮液でお届けします。キットを始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。
- カラム上でDNase分解を行なう場合には、Appendix Dの記載（英語版 Handbook 69ページ）に従ってDNase Iストック溶液を調製します。

操作手順

1. 植物サンプルの量を定める。100 mg以上使用しない。
正確なサンプル量を定めるために組織を計量してください。
2. 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。液体窒素で冷却した2 mlマイクロ遠心チューブ（RNaseフリー、別途準備）に、粉末状の組織と液体窒素を移す。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。すぐにステップ3に進む。
植物組織中のRNAは、サンプルが液体窒素で急速に冷凍されるまで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。
3. Buffer RLTあるいはBuffer RLC（“実験を始める前の重要事項”参照）450 μlを最大100 mgの粉末状組織に添加する。激しくボルテックスする。
56℃で短時間のインキュベーション（1～3分間）が組織破碎を促進することがあります。しかしデンプン含量が高いサンプルでは材料の膨潤を防止するため、高温でのインキュベーションは行なわないでください。
注：使用前にBuffer RLTあるいはBuffer RLCにβ-MEを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）。

4. 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（薄紫色）にライセートを添加し、最高スピードで2分間遠心操作する。QIAshredder からのろ液の上清を、コレクションチューブ中の細胞破片ペレットを乱さないように新しいチューブ（別途準備）に移す。ステップ5ではこの上清のみを使用する。

QIAshredder スピンカラムにライセートをピペティングによりアプライする場合、ピペットチップの先端を切ると操作が容易になることがあります。QIAshredder スピンカラムによる遠心操作は細胞破片の除去と同時にライセートをホモジナイズします。細胞破片のほとんどはQIAshredder スピンカラムに留まりますが、微量の細胞破片は流出し、コレクションチューブの底にペレットを形成します。ペレットを乱さないように注意してライセートを新しいマイクロ遠心チューブに移してください。

5. 清澄化したライセートに半量のエタノール（96 ~ 100 %）を添加し、すぐにピペティングにより混和する。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450 μ l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. 形成した沈澱も含むサンプル（通常650 μ l）を、2 mlコレクションチューブ（添付）にセッティングしたRNeasy スピンカラム（ピンク）にアプライする。蓋を静かに閉めて、8000 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7で再使用します。

サンプルが700 μ l以上の場合には、残りのサンプルを続けてRNeasy スピンカラムにアプライし、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、ろ液を捨てます*。

オプション：オプションでカラム上のDNase分解（英語版 Handbook 23 ページ “Eliminating genomic DNA contamination”）を行なう場合には、このステップ後にD1 から D4（英語版 Handbook 69 ページ）行ないます。

7. 700 μ lのBuffer RW1をRNeasy スピンカラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピンカラム・メンブレン洗浄のために8000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心する。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。

* フロースルーはBuffer RLT、Buffer RLCあるいはBuffer RW1を含んでいるため、漂白剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 8 ページをご覧ください。

注：遠心操作後、RNeasy スピнкаラム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出します。コレクションチューブが内壁に空になっていることを確認します。

オプションのカラム上での DNase 分解（英語版 Handbook 69 ページ）を行なう場合はこのステップは省略してください。

8. RNeasy スピнкаラムに 500 μ l の Buffer RPE 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 8000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。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. RNeasy スピнкаラムに 500 μ l の Buffer RPE 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、8000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心操作する。

RNA 溶出中にエタノールがキャリーオーバーしないように、長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥します。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、RNeasy スピнкаラムがろ液と接触しないように注意して、カラムをコレクションチューブから取り除きます。これにより、エタノールのキャリーオーバーを防止することができます。

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（添付）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。蓋を静かに閉めて、最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除するため、あるいはステップ9の後 RNeasy スピнкаラムの外側にろ液が残っている場合は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 コレクションチューブ（添付）にセットする。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。蓋を静かに閉め、8000 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の 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。RNA の最終濃度は高くなります。

プロトコール：RNAクリーンアップ

RNeasy Mini Kiは様々な方法で分離したRNA、あるいはラベリングやDNase分解などの酵素反応を行なった後のRNAクリーンアップにも使用可能です。

スタートサンプル量の正確な測定

このプロトコールでは、最高100 µgのRNAをクリーンアップできます。この量はRNeasy スピнкаラムのRNA結合容量に対応しています。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Kitを初めて使う際には、“Important Notes”(英語版 Handbook 18ページ)をお読みください。
- RNAを初めて取り扱う方はAppendix A(英語版 Handbook 63ページ)をまずお読みください。
- Buffer RLTは保存中に沈殿物を生じることがあります。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。
- Buffer RLTはグアニジン塩を含んでおり、漂白剤を含む殺菌剤と一緒にしないでください。Safety informationは英語版 Handbook 8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で行なってください。調製中は迅速に操作を行なってください。
- 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。

実験を始める前の準備事項

- Buffer RPEは濃縮液でお届けします。キットを始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。
- カラム上でDNase分解を行なう場合には、Appendix Dの記載(英語版 Handbook 69ページ)に従ってDNase Iストック溶液を調製します。

操作手順

1. RNaseフリー水を添加してサンプル量を100 µlに調整する。350 µlのBuffer RLTをサンプルに添加しよく混和する。
2. 希釈したRNAに250 µlのエタノール(96 ~ 100%)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 Miniスピнкаラムにサンプル(700 µl)をアプライする。蓋を静かに閉めて、8000 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4で再使用します。

* ろ液はBuffer RLTを含んでいるので、漂白剤と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版 Handbook 8ページをご覧ください。

注：遠心操作後、RNeasy スピнкаラムがろ液と接触しないように注意して、カラムをコレクションチューブから取り除きます。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。

オプション：オプションでカラム上のDNase分解（英語版 Handbook 23 ページ “Eliminating genomic DNA contamination”）を行なう場合には、このステップ後に D1 ~ D4（英語版 Handbook 69 ページ）行ないます。

4. RNeasy スピнкаラムに 500 μ l の Buffer RPE 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 8000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。ろ液を捨てる。

コレクションチューブはステップ 5 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）。

5. RNeasy スピнкаラムに 500 μ l の Buffer RPE 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、8000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心操作する。

RNA 溶出中にエタノールがキャリーオーバーしないように、長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥します。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、RNeasy スピнкаラムがろ液と接触しないように注意して、カラムをコレクションチューブから取り除きます。これにより、エタノールのキャリーオーバーを防止することができます。

6. 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（添付）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。蓋を静かに閉めて、最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除するため、あるいはステップ 5 の後 RNeasy スピнкаラムの外側にろ液が残っている場合はこのステップを行ないます。

7. RNeasy スピнкаラムを新しい 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 30 ~ 50 μ l を直接スピнкаラム・メンブレンに添加する。蓋を静かに閉め、8000 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。

8. 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 7 での溶出液を用いて（高濃度の RNA が必要な場合）ステップ 7 を再度行なう。ステップ 7 のコレクションチューブに溶出する。

ステップ 7 の溶出液を用いた場合の 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、RNA の最終濃度は高くなります。

トラブルシューティングガイド

コメント

スピncラムが目詰まり

- 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 20 ~ 23 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(プロトコール参照) 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。
- タンパク質が豊富な組織から RNA を精製するには RNeasy Fibrous Tissue Kit (英語版 Handbook 76 ページの ordering information 参照) を推奨。
- b) スタートサンプル量が多すぎる
- 次の調製には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(プロトコール参照)。
- c) エタノール添加前に遠心操作を行っていない(組織および酵母の機械的な破砕用プロトコール)
- エタノール添加前にライセートを遠心分離し、次の操作で上清のみを使う(プロトコール参照)。細胞破片を含んだペレットは RNeasy スピncラムの目詰まりを起こす。
- d) 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 RNeasy スピncラムの目詰まりをおこす沈殿物を形成する原因となる。このような場合は遠心温度を 25 に設定する。RNeasy スピncラムに移す前にエタノールを含んだライセートを 37 に温める。

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 20 ~ 23 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(プロトコール参照) 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。
- タンパク質が豊富な組織から RNA を精製するには RNeasy Fibrous Tissue Kit (英語版 Handbook 76 ページの ordering information 参照) を推奨。

コメント

- b) スタートサンプル量が
多すぎる
- c) RNAがRNeasy スピン
カラムメンブレンから
溶出していない
- d) エタノールのキャリー
オーバー
- e) 細胞培養液の除去が
不完全（細胞サンプル
の場合）
- A_{260}/A_{280} 値が低い
- A_{260}/A_{280} の測定用にRNAを
水で希釈
- 次の調製には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（プロ
トコール参照）。
- RNA溶出を再度行なうが、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。
- Buffer RPEで二回目の洗浄を行なう際に、20～25℃、
8000 x g (10,000 rpm) 以上で2分間遠心して、
RNeasyスピнкаラム・メンブレンを乾燥させる。遠
心操作後、カラムがろ液と接触しないように注意し
て、カラムをコレクションチューブから取り除く。
これにより、エタノールのキャリーオーバーを防止
することができる。
- エタノールのキャリーオーバーを起こさせないため
にRNeasyスピнкаラムを新しい2 mlコレクション
チューブに移してプロトコールに記述されているよ
うに1分間遠心操作をオプションで行なう。
- 培養細胞の調製の際、細胞回収後に細胞培養液を完
全に除去したかどうか確認する（プロトコール参照）。

RNAが分解

- a) 採取した動物組織を
迅速に安定化して
いない
- b) 安定化時のスタート
材料が多すぎる
- c) 安定化の際の動物組織
が厚すぎる
- 採取後、適切な量のRNA_{later} RNA Stabilization Reagent
の中に組織を浸ける。
- 安定化の際、組織の量を減らすか、またはRNA_{later}
RNA Stabilization Reagentの量を増やす（14ページ
のプロトコール参照）。
- RNA_{later} RNA Stabilization Reagentで安定化する際、
大きなサンプルは0.5 cm以下に薄くカットする。

コメント

-
- d) 安定化の際、凍結した動物組織を使用 新鮮で凍結されていない組織だけがRNAlater RNA Stabilization Reagentにより安定化可能。
- e) RNAlater RNA Stabilization Reagentの保存期間を超えた RNAlaterで安定化した組織は、37 で1日、15 ~ 25 で7日間、2 ~ 8 で4週間まで保存可能。または-20 か-80 では長期保存が可能。
- f) 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、RNAlater RNA Stabilization 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 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 63ページ），“Handling and storage of starting material”（英語版 Handbook 20ページ）およびRNAlaterプロトコル（本誌14ページ）を参照。
- g) RNaseのコンタミ 全てのRNeasyバッファーは試験済みでRNaseフリーである事が保証されているが、RNaseが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 63ページのAppendix Aを参照する。
RNaseを使用したDNA調製の際に用いた吸引乾燥装置にRNAサンプルを入れない。

ダウンストリーム実験でDNAが混入

- a) 最適な調製法を使用していない（細胞サンプル） 動物細胞からRNAを分離する際に、DNAの混入が問題になるアプリケーションには、核が最初に除去されている細胞質RNA用のプロトコルを使用することを推奨。詳細はwww.qiagen.com/literature/protocols/RNeasyMini.aspxでプロトコルを参照。
- b) Buffer RW1でインキュベートしていない 次の調製から、Buffer RW1添加後と遠心操作前にRNeasyスピナラムを室温（15 ~ 25 ）で5分間インキュベートする。

コメント

c) DNase処理していない RNase-Free DNase Set (英語版 Handbook Appendix D、69ページ)をそれぞれのプロトコールで示されているところで用いてオプションのカラム上でのDNase分解を行なう。

あるいはRNeasy操作を行なった後、RNA溶出液をDNaseで分解する。熱処理によるDNase不活性化の後、RNAは次のアプリケーションにそのまま直接使用するか、RNAクリーンアッププロトコールを行なう(34ページ)。

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) 塩が溶出液に混入

Buffer RPEは必ず20~30 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ろ液を除去する。

b) エタノールの混入

Buffer RPEで二回目の洗浄を行なう際に、20~25 、8000 x g (10,000 rpm)以上で2分間遠心して、RNeasyスピncラム・メンブレンを乾燥させる。遠心操作後、カラムがろ液と接触しないように注意して、カラムをコレクションチューブから取り除く。これにより、エタノールのキャリーオーバーを防止することが可能。

エタノールのキャリーオーバーを起こさせないためにRNeasyスピncラムを新しい2 mlコレクションチューブに移してプロトコールに記述されているように1分間遠心操作をオプションで行なう。

Trademarks: QIAGEN®, RNeasy® (QIAGEN Group); DU® (Beckman Coulter, Inc.).
RNAlater is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents.
QIAzol Lysis Reagent is a subject of US Patent No. 5,346,994 and foreign equivalents.
© 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

