

RNAprotect® Cell Reagent

プロトコールとトラブルシューティング

RNAprotect Cell Reagent

培養細胞中のRNAを迅速に安定化

RNeasy® Protect Cell Mini Kit

培養細胞中のトータルRNAの迅速な安定化およびトータルRNA精製

目次

ページ

プロトコール

RNAprotect Cell Reagentを用いた選別済み細胞あるいは

培養細胞中のRNA安定化

2

安定化した細胞からのRNeasy Plus Mini Kitを用いたRNA精製

4

トラブルシューティング

9



プロトコール：RNAprotect Cell Reagentを用いた選別済み細胞あるいは培養細胞中のRNA安定化

本プロトコールでは、様々な状態における細胞中のRNAを安定化する方法を記載しています。RNAprotect Cell Reagentを培養液あるいは保存液（例；PBS）中の培養細胞（付着／浮遊細胞）に直接添加できます。またペレット化した細胞の様に、培養液や保存液のない細胞にも試薬を添加できます。

実験を始める前の重要事項：

- RNeasy Protect Cell Mini Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 12ページ）をお読みください。
- 細胞中のRNAは、細胞を十分な量のRNAprotect Cell Reagentで混和するまでは保護されていません。本試薬をペレット化した細胞にすぐに添加するか、あるいは細胞を含む培地または保存液に直接添加します。
- 次のページの操作手順で記述しているように、十分な量のRNAprotect Cell Reagentと培養細胞を混和したことを確認して下さい。この試薬の量が少ないと、保存中にRNAの分解を起こし、RNA収量が低下する恐れがあります。必要な場合には試薬の量を増加します。
- 大量の培養液あるいは保存液中の培養細胞にRNAprotect Cell Reagentを直接添加する場合は、精製用プロトコール（4ページ）での細胞ペレット化が不完全になり、RNA収量が低下することがあります。処理する細胞が多い場合は、培養液あるいは保存液を1 ml未満にすることをお奨めします。一般的に（特に細胞数が少ない場合には）、培養液あるいは保存液の量を少なくすることを推奨します。
- HeLa細胞、Jurkat細胞、マクロファージのような一般的な細胞株はRNAprotect Cell Reagentで溶解しません。しかし、いくつかの細胞株は本試薬で溶解し、RNAが溶液中に遊離することがあります。遊離したRNAは安定化していますが、精製用プロトコール（4ページ）で細胞ペレットに回収する必要があります。遊離RNAの回収を最大にするために、できるだけ少量の培養液あるいは保存液を使用することをお勧めします。
- 新鮮で凍結されていない培養細胞だけがRNAprotect Cell Reagentを用いて安定化可能です。
- プロトコールに記載されている操作をできるだけ速やかに行います。

操作手順：

1. ステップ 1a あるいは 1b に従って細胞に RNAprotect Cell Reagent を添加する。

1a. 溶液中の細胞、あるいは溶液で覆われた細胞：

細胞培養液あるいは保存液量の 5 倍容量の RNAprotect Cell Reagent を添加する。振盪、ピペティング、ボルテックスなどにより混和する。

注：培養液あるいは保存液が 1 ml を超えないようにしてください。RNAprotect Cell Reagent で溶解されやすい細胞の場合は、特に溶液の量を少なくすることをお奨めします。

RNAprotect Cell Reagent の添加後、付着細胞が剥離します。トリプシン処理は必要ありません。

安定化した細胞の保存中に、サンプルが保存容器の底に沈むことがあります。サンプルの再懸濁を省くために、試薬の添加後細胞を遠心チューブ（4 ページのプロトコール、ステップ 1 で使用）に移すことをお奨めします。

1b. ペレット化した細胞あるいは溶液で覆われていない細胞（例；塗抹標本の細胞）：

遠心チューブ（別途準備）中の細胞ペレットに 300 μ l の RNAprotect Cell Reagent を添加する。ボルテックスにより細胞を完全に再懸濁する。

注：細胞ペレットに少なくとも 5 倍容量の RNAprotect Cell Reagent を添加します。残っている培養液あるいはバッファー量が全体で 60 μ l を超える場合には、適宜 RNAprotect Cell Reagent の量を増やします。

注：必要に応じて RNAprotect Cell Reagent の量を増やします。

2. 細胞と RNAprotect Cell Reagent のミックスは、30 で 1 日、室温（15 ~ 25 ）で 7 日間、2 ~ 8 で 4 週間まで保存可能、また -20 あるいは -80 で長期保存できる。

注：できる限り低温での保存をお薦めします（室温のかわりに 2 ~ 8 、30 の代わりに室温）。

注：保存中、特に低い温度では沈殿物が生じることがあります。この沈殿物は RNA 精製には影響しません。

プロトコール：安定化した細胞からの RNeasy Plus Mini Kit を用いた RNA 精製

スタートサンプルの破碎とホモジナイゼーション

スタートサンプルの効率的な破碎とホモジナイゼーションは、どのようなトータル RNA 精製法にとっても非常に重要です。破碎とホモジナイゼーションは2つの異なるステップです：

- 破碎：細胞の細胞壁および形質膜の完璧な破碎は、サンプルに含まれている RNA をすべて遊離するために絶対に必要です。破碎が十分でないと RNA 収量が顕著に低下します。
- ホモジナイゼーション：破碎により生じる細胞ライセートの粘性を抑えるためにホモジナイゼーションが必要です。ホモジナイゼーションは高分子量ゲノム DNA およびその他の高分子量細胞成分を剪断し、均一なライセートを生じます。不完全なホモジナイゼーションの結果、RNeasy スピнкаラムへの RNA の結合が効率的に行われず、RNA 収量が著しく低下します。

RNeasy 操作法では、Buffer RLT Plus 中でボルテックスすることにより培養細胞の破碎が行われます。その後、QIAshredder ホモジナイザーあるいは TissueRuptor を用いてホモジナイゼーションを行います：

- QIAshredder ホモジナイザーは、細胞ライセートを迅速かつ効率的にホモジナイズし、サンプルのクロスコンタミがありません。2 ml のコレクションチューブにセットした QIAshredder Spin Column に 700 μ l までのライセートを入れ、マイクロ遠心機にセットして最高速度で2分間遠心します。スピнкаラムを通過する時にライセートはホモジナイズされます。
- TissueRuptor は細胞ライセートをホモジナイズするためのローター/ステーター式ホモジナイザーです。TissueRuptor の使い捨てプローブの刃は高速で回転し、攪乱運動と機械的な剪断の組み合わせによりサンプルをホモジナイズします。ホモジナイゼーション中にプローブのチップを溶液中に沈める事ができ、サンプルがあふれない適切なサイズの容器を使用してください。一般的に丸底チューブのほうがコニカルチューブよりも効率的にホモジナイズできます。TissueRuptor を用いたホモジナイゼーションに関しては *TissueRuptor Handbook* (英語版) をご覧ください。その他のローター/ステーター方式ホモジナイザーはメーカーのガイドラインに従って使用してください。

実験を始める前の重要事項：

- RNeasy Protect Cell Mini Kit を初めて使う際には、“Important Notes”(英語版 Handbook 12 ページ)をお読みください。
- 始めて RNA を取り扱う際には、英語版 Handbook 25 ページの Appendix A をまずお読みください。
- 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。

- 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（15～25℃）にして使用します。
- Buffer RLT PlusとBuffer RW1はグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety information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で行なってください。実験中は迅速に作業してください。
- 全ての遠心ステップは一般的なマイクロ遠心機を用いて20～25℃で行なってください。遠心機が20℃以下に冷却されていないことを確認します。

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。キットを使用する前に、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%）を添加します。
- HeLa細胞やJurkat細胞のような多くの一般的な細胞株では、RNA精製の際にβ-ME（β-mercaptoethanol）は必要ありません。しかし、いくつかの細胞株ではRNA精製中のRNA分解を阻止するためにβ-MEの添加を必要とする場合があります。この場合は、使用前に1 mlのBuffer RLT Plus当たり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 Plusは室温（15～25℃）で1ヶ月間まで保存できます。

操作手順：

1. 細胞とRNAprotect Cell Reagentのミックスを適切なサイズのマイクロ遠心チューブに入れて、5,000 x gで5分間遠心操作する。
 サンプルを保存容器から遠心チューブに移す際には、容器の底に沈殿しているサンプルをすべてボルテックスあるいはピペティングにより確実に再懸濁します。RNA収量が低下するので、サンプルすべてを遠心チューブに移すことが重要です。
 注：室温以下（-20℃など）でサンプルを保存した場合には、完全に解凍してから遠心操作を始めます。
 注：保存中、特に低い温度では沈殿物が生じることがあります。この沈殿物はRNA精製には影響しません。
2. 上清をピペットで完全に除去する。
3. チューブを軽くたたいてペレットをルーズにする。
 ペレットをルーズにすることにより、ステップ4でのBuffer RLT Plusでの溶解が容易になります。
4. 350 μlあるいは600 μlのBuffer RLT Plusを添加する（表2参照）。ボルテックスによりペレットを完全に溶解し、すぐにステップ5に進む。
 必要な場合には、使用前にBuffer RLT Plusにβ-MEを添加します（“実験を始める前の準備事項”参照）。

注：ペレットが完全に溶けていることを確認します。この操作は約1分間必要です。完全に溶けていないと効率的に溶解されず、RNA収量が低下します。

注：溶解したペレットは濁っていることがあります。これはRNA精製には影響しません。

溶解したペレットは-70℃で数ヶ月保存可能です。保存していたサンプルは、室温あるいは水浴37℃でペレット溶液をインキュベートし、完全にサンプルを解凍して塩を溶解させます。RNA分解を抑えるために、37℃での長期のインキュベーションは避けてください。ステップ5に進みます。

表2. 溶解した細胞ペレットに対する Buffer RLT Plus量

細胞数	Buffer RLT Plusの容量 (μl)
5×10^6	350
$5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	600

5. 細胞ライセートをステップ5aあるいは5b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、4ページの“スタートサンプルの破碎とホモジナイゼーション”を参照してください。
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スピンカラムの目詰まりの原因になります。
- 5a. 2 mlのコレクションチューブにセットしたQIAshredderスピnc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6に進む。
- 5b. TissueRuptorを用いてライセートを30秒間ホモジナイズする。ステップ6に進む。
6. ホモジナイズしたライセートを2 mlのコレクションチューブ(添付)にセットしたgDNA Eliminatorスピncラムに入れる。8,000 x g (10,000 rpm)以上で30秒間遠心操作する。カラムを捨てて、ろ液を保存する。
注：遠心操作後にカラムのメンブレン上に液体が残留していないことを確認します。必要に応じて、すべての液体がメンブレンを通過するまで同様に遠心操作を繰り返します。
7. ろ液に同容量の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。
ホモジナイゼーションとDNA除去操作中のロスにより、ろ液は350 μlあるいは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。

8. 最高 700 μl 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。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 9 でコレクションチューブを再使用します。

サンプルが 700 μl 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。

9. 700 μl の Buffer RW1 を RNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心してスピнкаラム・メンブレンを洗浄する。ろ液を捨てる。*

ステップ 10 でコレクションチューブを再使用します。

注：遠心操作後、RNeasy スピнкаラムが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が完璧に空になっていることを確認します。

10. RNeasy スピнкаラムに 500 μl の Buffer RPE を添加する。蓋を静かに閉め、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心してスピнкаラム・メンブレンを洗浄する。ろ液を捨てる。

ステップ 11 でコレクションチューブを再使用します。

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

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

長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥することにより、RNA 溶出中にエタノールがキャリアオーバーしないようにします。残留エタノールはダウンストリーム反応を妨害することがあります。

注：遠心操作後、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除きます。接触した場合、エタノールのキャリアオーバーが起きます。

12. 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。最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

ステップ 11 の後 RNeasy スピнкаラムの外側にろ液が残っている場合は、Buffer RPE のキャリアオーバーの可能性を排除するためにこのステップを行ないます。

* Buffer RLT Plus と Buffer RW1 はグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

13. 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。チューブを静かに閉め、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で1分間遠心操作を行ない、RNA を溶出する。
14. 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13での溶出液を用いて (高濃度のRNA が必要な場合) ステップ13を再度行なう。ステップ13のコレクションチューブに溶出する。
ステップ13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

RNAが分解

- a) 細胞を即座に安定化しなかった
細胞をRNAprotect Cell Reagentと速やかに混和する。
- b) 長時間保存した
RNAprotect Cell Reagentと混和した細胞は、30℃で1日、15～25℃で7日間、2～8℃で4週間まで保存可能。また-20℃か-80℃では長期保存が可能。できるだけ低温で保存する。
- c) RNA精製中にRNAが分解
全てのRNeasyバッファは試験済みでRNaseフリーである事が保証されているが、RNaseは使用中に混入することがある。RNA精製中およびその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 25ページのAppendix Aを参照する。

gDNA Eliminator スピncラムが目詰まり

- 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は“スタートサンプルの破碎とホモジナイゼーション”(4ページ)を参照する。
必要に応じて遠心速度および遠心時間を増加する。
次回の調製ではスタートサンプル量を減らす(英語版Handbook 12ページ参照)。または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
スタートサンプル量を減らす。正確なサンプル量で実験を始めることが重要である(英語版Handbook 12ページ参照)。
- c) 遠心操作時の温度が低すぎる
遠心温度は20～25℃とする。20℃に設定しても遠心時に20℃以下になる遠心機もある。これがgDNA Eliminator スピncラムの目詰りを起こす沈殿物を形成する原因となる。低温になった場合には遠心機を25℃に設定する。gDNA Eliminator スピncラムにライセートを入れる前に、37℃でライセートを温める。

コメント

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“スタートサンプルの破砕とホモジナイゼーション”(4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(英語版 Handbook の12ページ参照)、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
RNeasy スピнкаラムへのオーバーロードはRNA収量を顕著に低下させる。スタートサンプル量を減らす(英語版 Handbook の12ページ参照)。
- c) DNA除去前にライセートにエタノールを添加
ライセートにエタノールを添加する前に、gDNA Eliminator スピнкаラムでライセートを処理する。
- d) RNAがRNeasy スピнкаラムメンブレンにまだ結合
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。
- e) エタノールのキャリアオーバー
Buffer RPE で二回目の洗浄を行なう際に、20 ~ 25 、8,000 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。
RNeasy スピнкаラムの外側に液が付着している場合には、必ずオプションの遠心操作を行ない、カラム・メンブレンを乾燥させる(7ページ、2番目のプロトコールのステップ12)。
- f) RNAprotect Cell Reagentの除去が不完全
Buffer RLT Plus が著しく希釈されることを防ぐために、過剰なRNAprotect Cell Reagentを除去する。溶解バッファが希釈されると、サンプル溶解が効率的に行われない。
- g) 細胞が入っている培養液あるいは保存液(PBSなど)の量が多すぎる
次の調製には培養液あるいは保存液の量を減らす。

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 27ページ、Appendix B参照)。

ダウンストリーム実験でDNAが混入

- a) 細胞数が多すぎる ある種の細胞タイプでは、細胞数が多すぎるとDNA除去効率が低下する事がある（ゲノムDNAを20 µg以上含む）。溶出したRNAにDNAが混入している場合には、細胞数を減らして調製してみる。
- b) RNAprotect Cell Reagentの除去が不完全 Buffer RLT Plusが著しく希釈されることを防ぐために、過剰なRNAprotect Cell Reagentを除去する。溶解バッファーが希釈されるとgDNA Eliminatorスピニングは効果的に作用しない。

RNA濃度が低すぎる

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

RNAを用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない

- a) 溶出の際に塩類がキャリアオーバー 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) エタノールのキャリアオーバー Buffer RPEによる二回目の洗浄では、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で2分間 (20 ~ 25) 遠心操作し、必ずRNeasyスピニング・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、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除く。これにより、接触した場合、エタノールのキャリアオーバーが起きる。
RNeasyスピニングカラムの外側にろ液が付着している場合には、必ずオプションの遠心操作を行ない、カラム・メンブレンを乾燥させる（7ページ、2番目のプロトコルのステップ12）。

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



WWW.QIAGEN.CO.JP

2301048 07/2006