

miRNeasy FFPE プロトコールとトラブルシューティング

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織切片からの
miRNA を含むトータル RNA 精製

目次	ページ
プロトコール	
FFPE 組織切片からの miRNA を含むトータル RNA 精製	2
マイクロダイセクションにより採取した FFPE 組織切片からの miRNA を含むトータル RNA の精製	6
トラブルシューティング	10
Appendix A : 脱パラフィン法	14



プロトコール：FFPE 組織切片からの miRNA を含む トータル RNA 精製

実験を始める前の重要事項

- miRNeasy FFPE Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 13 ページ）をお読みください。
- RNA を初めて調製する場合には Appendix B（英語版 Handbook 30 ページ）をお読みください。
- Buffer RBC はグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒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、この実験のすべてのステップは室温（15～25℃）で行なってください。操作は迅速に行なってください。
- すべての遠心操作はマイクロ遠心機を用いて 15～25℃で行ないます。冷却機能付きマイクロ遠心機を使用する場合は、15℃以下に冷却されないように温度を 20～25℃に設定します。
- 以下の操作手順において、サンプルあたり 1～2 切片を使用する場合の容量は▲印、2 切片より多い場合は●印で記載しています。

実験開始前の準備事項

- Buffer RPE と RNase-Free DNase I を初めて使用する場合には、英語版 Handbook 14 ページの “Preparation of buffers” に記載されているようにこれらを調製してください。
- すべてのバッファーを室温（15～25℃）に戻します。調製した Buffer RPE を振盪して混和します。
- ステップ 5 で使用するサーモミキサーあるいはインキュベーターを 56℃にセットします。

操作手順

1. メスを使用してサンプルブロックの余分なパラフィンを取り除く。
2. 切片を 5～20 μm の厚さにカットする。
サンプル表面が空気に触れていた場合には、最初の 2～3 切片は捨てます。
3. 切片を▲ 1.5 あるいは 2 ml、● 2 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に即座に入れ、蓋を閉める。

4. ▲ 160 μ l あるいは● 320 μ l の **Deparaffinization Solution** を添加し、10 秒間激しくボルテックスした後、スピンドウンしてサンプルをチューブの底に回収する。
Deparaffinization Solution は miRNeasy FFPE Kit に入っておりません。別途注文が必要です (cat. no. 19093)。他の脱パラフィン法を使用される場合は 14 ページの Appendix A で詳細をご覧ください。
5. 56°C で 3 分間インキュベートした後、室温に戻す。
6. ▲ 150 μ l あるいは● 240 μ l の **Buffer PKD** を添加してボルテックスにより混和する。
7. 11,000 x g (10,000 rpm) で 1 分間遠心する。
8. 透明な下層部分に 10 μ l の **proteinase K** を添加する。ピペティングにより静かに混和する。
9. 56°C で 15 分間インキュベートした後、80°C で 15 分間インキュベートする。
ヒートブロックを一台しか使用しない場合には、56°C でインキュベーション後、ヒートブロックが 80°C になるまで、サンプルを室温に置きます。
重要：15 分間のインキュベーションを行なう前にヒートブロックの温度が 80°C であることを確認します。リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションに最適な RNA を精製するためには、80°C で 15 分間のインキュベーションは非常に重要です。
Buffer PKD 中での 80°C のインキュベーションにより、核酸のホルムアルデヒドによるクロスリンクが部分的に外れます。より長いインキュベーション時間あるいは高温度のインキュベーションにより断片化した RNA が増えることがありますが、リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションで C_T 値がわずかに減少することもあります。
10. 透明の下層部分を新しい 2 ml のマイクロ遠心チューブに移す。
サンプルが 2 切片より多い場合は容量の大きいチューブが必要になることがあります。
11. 氷上で 3 分間インキュベートしてから、20,000 x g (13,500 rpm) で 15 分間遠心する。
12. ペレットが剥がれないように注意して、上清を新しいマイクロ遠心チューブ (別途準備) に移す。
ペレットはクロスリンクした DNA を含む組織残渣を含んでいます。

13. トータルサンプル量の 10 分の 1 に相当する量 (約▲ 16 μ l あるいは● 25 μ l) の DNase Booster Buffer と 10 μ l の DNase I ストック溶液を添加する。チューブを転倒混和する。チューブの壁に残った液体を回収するためにスピンドウンする。

注：凍結乾燥状態でお届けする DNase I は、英語版 Handbook 14 ページの “Preparing DNase I stock solution” に記述されている方法で調製します。

注：DNase I は物理的変性に特に敏感です。チューブを上下に静かに転倒させて混和します。ボルテックスは使用しないでください。

14. 室温で 15 分間インキュベートする。
15. 結合条件を調節するために▲ 320 μ l あるいは● 500 μ l の Buffer RBC を添加し、ライセートを完全に混和する。
16. サンプルに▲ 1,120 μ l あるいは● 1,750 μ l の 100% エタノールを添加し、ピペットでよく混和する。遠心操作は行わず、すぐにステップ 17 に進む。エタノールの添加後、沈殿物が観察されることがあります。これは操作には影響しません。

17. 700 μ l のサンプル (形成した沈殿物を含む) を、2 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットされた RNeasy[®] MinElute[®] Spin Column にアプライする。蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる*。

コレクションチューブはステップ 18 で再使用します。

18. 残りのサンプルも RNeasy MinElute Spin Column に通すようステップ 17 を繰り返す。

コレクションチューブはステップ 19 で再使用します。

19. 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる。

注：Buffer RPE は濃縮液でお届けします。使用前に、英語版 Handbook 14 ページの “Preparing Buffer RPE” に記載されている方法でエタノールを必ず添加してください。

コレクションチューブはステップ 20 で再使用します。

* フロースルー液は Buffer RBC を含んでいるので、漂白剤と一緒にしないでください。“Safety Information” は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

20. 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレンを洗浄するために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心する。フロースルー液の入ったコレクションチューブを廃棄する。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column をフロースルー液と接触しないように、コレクションチューブから慎重に取り除きます。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。

21. RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ（キットに同梱）にセットする。スピнкаラムの蓋を開き、最大速度で 5 分間遠心する。フロースルー液の入ったコレクションチューブを捨てる。

蓋の破損を防ぐために、遠心操作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蓋を向けてセットします（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蓋を向けます）。

残留しているエタノールが続いて行なう反応を阻害することがあるため、スピнкаラム・メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。蓋を開いて遠心することで、RNA 溶出の際にエタノールがキャリーオーバーしません。

22. RNeasy MinElute Spin Column を新しい 1.5 ml コレクションチューブ（キットに同梱）にセットする。14 ~ 30 μ l の RNase フリー水をスピнкаラム・メンブレンに直接添加する。蓋を静かに閉めて最高速度で 1 分間遠心し、RNA を溶出する。

少量の RNase フリー水で溶出すると、トータル RNA の濃度は高くなりますが、収量は低下します。

RNeasy MinElute Spin Column のテッドボリウムは 2 μ l なので、14 μ l の RNase フリー水で溶出すると、最終的な溶出容量は 12 μ l になります。

プロトコール：マイクロダイセクションにより採取した FFPE 組織切片からの miRNA を含むトータル RNA の精製

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ホルマリン固定サンプルからの miRNA を含むトータル RNA の精製用です。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の分子解析は、非常に微量なスタートサンプル量から核酸を精製しなければならないために特に困難です。さらに固定と染色ステップにより RNA が分解されることがあります。

サンプルからの切片作製、染色、マイクロダイセクション用機器および消耗品は Leica® (www.leica-microsystems.com) および P.A.L.M. Microlaser Technologies (www.palm-mikrolaser.com) にて入手可能です。

実験を始める前の重要事項

- miRNeasy FFPE Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 13 ページ）をお読みください
- RNA を初めて調製する場合には Appendix B（英語版 Handbook 30 ページ）をお読みください。
- Buffer RBC はグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒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、この実験のすべてのステップは室温（15～25℃）で行なってください。操作は迅速に行なってください。
- すべての遠心操作はマイクロ遠心機を用いて 15～25℃で行ないます。冷却機能付きマイクロ遠心機を使用する場合は、15℃以下に冷却されないように温度を 20～25℃に設定します。

実験開始前の準備事項

- Buffer RPE と RNase-Free DNase I を初めて使用する場合には、英語版 Handbook 14 ページの “Preparation of buffers” に記載されているようにこれらを調製してください。
- すべてのバッファーを室温（15～25℃）に戻します。調製した Buffer RPE を振盪して混和します。
- ステップ 4 で使用するサーモミキサーあるいはインキュベーターを 56℃にセットします。

操作手順

1. マイクロダイセクションの後、適切な量の **Deparaffinization Solution** が入ったコレクション用容器にサンプルを入れる。容量はマイクロダイセクションに使用したコレクション容器により異なるが、**65 μ l** (Leica の装置) あるいは **300 μ l** (その他の装置) 以上使用しない。

Deparaffinization Solution は miRNeasy FFPE Kit に入っていないので、別途注文が必要です (cat. no. 19093)。他の脱パラフィン法を使用される場合は 14 ページの Appendix A で詳細をご覧ください。

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。トータル量は **160 μ l** 以上にする。必要に応じて **Deparaffinization Solution** で容量を **160 μ l** に調節する。
3. **10 秒間激しくボルテックスした後、スピンドウンしてサンプルをチューブの底に回収する。**
4. **56°C** で **3 分間** インキュベートした後、室温に戻す。
5. **150 μ l** の **Buffer PKD** を添加し、ボルテックスにより混和する。
6. **11,000 x g** (**10,000 rpm**) で **1 分間** 遠心する。
7. 透明な下層部分に **10 μ l** の **proteinase K** を添加する。ピペッティングにより静かに混和する。
8. **56°C** で **15 分間** インキュベートした後、**80°C** で **15 分間** インキュベートする。

ヒートブロックを一台しか使用しない場合には、56°C でのインキュベーション後ヒートブロックが 80°C になるまで、サンプルを室温に置きます。

重要：15 分間のインキュベーションを行なう前にヒートブロックの温度が 80°C であることを確認します。リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションに最適な RNA を精製するためには、80°C で 15 分間のインキュベーションは非常に重要です。

Buffer PKD 中での 80°C のインキュベーションにより、核酸のホルムアルデヒドによるクロスリンクが部分的に外れます。より長いインキュベーション時間あるいは高温度のインキュベーションにより断片化した RNA が増えることがありますが、リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションで C_T 値がわずかに減少することもあります。

9. 透明の下層部分を新しい **2 ml** のマイクロ遠心チューブに移す。
10. 氷上で **3 分間** インキュベートしてから、**20,000 x g** (**13,500 rpm**) で **20 分間** 遠心する。
11. ペレットが剥がれないように注意して、上清を新しいマイクロ遠心チューブ (別途準備) に移す。

ペレットはクロスリンクした DNA を含む組織残渣を含んでいます。

12. トータルサンプル量の 10 分の 1 に相当する量の **DNase Booster Buffer** (約 16 μl) と 10 μl の **DNase I** ストック溶液を添加する。チューブを転倒混和する。チューブの壁に残った液体を回収するためにスピンドアウンする。

注：凍結乾燥状態でお届けする DNase I は、英語版 Handbook 14 ページの “Preparing DNase I stock solution” に記述されている方法で調製します。

注：DNase I は物理的変性に特に敏感です。チューブを上下に静かに転倒させて混和し、ボルテックスは使用しないでください。

13. 室温で 15 分間インキュベートする。
14. 結合条件を調節するために 320 μl の **Buffer RBC** を添加し、ライセートを完全に混和する。
15. サンプルに 1,120 μl の 100%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 16 に進む。

エタノールの添加後、沈殿物が観察されることがあります。これは操作には影響しません。

16. 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（キットに同梱）にセットされた **RNeasy MinElute Spin Column** にアプライする。蓋を静かに閉めて、8,000 $\times g$ (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる*。

コレクションチューブはステップ 17 で再使用します。

17. 残りのサンプルも **RNeasy MinElute Spin Column** に通すようステップ 16 を繰り返す。

コレクションチューブはステップ 18 で再使用します。

18. 500 μl の **Buffer RPE** を **RNeasy MinElute Spin Column** に添加する。蓋を静かに閉め、スピニカラム・メンブレンを洗浄するために 8,000 $\times g$ (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる。

コレクションチューブはステップ 19 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、英語版 Handbook 14 ページの “Preparing Buffer RPE” に記載されている方法でエタノールを添加したことをご確認してください。

19. 500 μl の **Buffer RPE** を **RNeasy MinElute Spin Column** に添加する。蓋を静かに閉め、スピニカラム・メンブレンを洗浄するために 8,000 $\times g$ (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心する。フロースルー液の入ったコレクションチューブを廃棄する。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column をフロースルー液と接触しないように、コレクションチューブから慎重に取り除きます。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。

* フロースルー液は Buffer RBC を含んでいるので、漂白剤と一緒にしないでください。“Safety Information” は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

- 20. RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットする。スピncラムの蓋を開け、最大速度で 5 分間遠心する。フロースルー液の入ったコレクションチューブを捨てる。**

蓋の破損を防ぐために、遠心操作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蓋を向けてセットします (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蓋を向けます)。

残留しているエタノールが続いて行なう反応を阻害することがあるため、スピncラム・メンブレンを乾燥させることは非常に重要です。蓋を開いて遠心することで、RNA 溶出の際にエタノールがキャリアオーバーしません。

- 21. RNeasy MinElute Spin Column を新しい 1.5 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットする。14 ~ 30 μ l の RNase フリー水をスピncラム・メンブレンに直接添加する。蓋を静かに閉めて最高速度で 1 分間遠心し、RNA を溶出する。**

少量の RNase フリー水で溶出すると、トータル RNA の濃度は高くなりますが、収量は低下します。

RNeasy MinElute Spin Column のテッドボリュームは 2 μ l なので、14 μ l の RNase フリー水で溶出すると、最終的な溶出容量は 12 μ l になります。

トラブルシューティング

コメント

RNeasy MinElute Spin Column の目詰まり

- a) 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 13 ページ参照）。
- b) 遠心操作時の温度が
低すぎる
- 遠心温度を 15 ~ 25℃ に設定する。20℃ に設定しても 15℃ 以下に冷却される遠心機もある。これが RNeasy MinElute Spin Column の目詰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 MinElute Spin Column にサンプルを入れる前に、エタノールの入ったサンプルを 37℃ で温める。

RNA の収量が低い

- a) スタートサンプルの
品質が低い
- 20 時間を越えて固定した、あるいは長期間保存したサンプルには使用可能な RNA が非常に少量しか含まれていない可能性がある。
- 顕微鏡スライド上に固定された切片は長期間空気に触れているため、使用可能な RNA 収量が非常に少ない可能性がある。
- b) スタートサンプル量が
多すぎる
- RNeasy MinElute Spin Column へのオーバーロードは核酸収量を顕著に低下させる。スタートサンプル量を減らす（英語版 Handbook 13 ページ参照）。
- c) 脱パラフィンが不十分、
あるいはサンプル中の
パラフィンが多すぎる
- 他の脱パラフィン法を用いた場合は、Deparaffinization Solution (cat. no. 19093) の使用を考慮する。
- d) RNA が RNeasy
MinElute Spin Column
メンブレンに結合した
まま
- RNA 溶出を再度行なうか、まず遠心操作前に RNase フリー水を RNeasy MinElute Spin Column に加え、実験台上で 10 分間インキュベートする。

A_{260}/A_{280} 値が低い

A_{260}/A_{280} 測定用の
核酸を水で希釈

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 32 ページ、Appendix C 参照)。

ダウンストリーム実験で DNA が混入

- a) スタートサンプル量が
多すぎる
- サンプル処理量が多いと DNA の除去効率が低下する組織もある。溶出した RNA に DNA が混入している場合には、調製あたりの組織切片を減らして調製してみる。
- b) 組織の DNA 含量が
高い
- DNA 含量の非常に高い組織 (例; 胸腺) を大量処理すると、DNA が完璧に除去されないことがある。組織切片量を減らして再度 RNA 精製を行なう。
- miRNA あるいは他のノンコーディング RNA の検出に RNA を使用する場合は、miScript PCR System を推奨する。miScript PCR System において、miScript Primer Assay は通常ゲノム DNA を検出しないが、調製あたりに使用する切片数を多くしすぎないことで DNA のコンタミを回避することは重要である。一方、miScript Precursor Assay はゲノム DNA の混入に影響を受ける。precursor miRNA の検出に miScript Precursor Assay を使用する場合、DNA が混入しているかどうかを決定するために “no RT” (no reverse transcription) コントロールを行なうことを推奨。
- 2 ステップのリアルタイム RT-PCR での mRNA 検出に RNA を用いる場合、ゲノム DNA コンタミの除去と逆転写反応をインテグレートした QuantiTect® Reverse Transcription Kit (cat. no. 205311) を用いて cDNA を合成する。

コメント

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) RNA が断片化されている、またはホルムアルデヒドによりクロスリンクされている
- 逆転写反応やその他の酵素によるダウンストリーム・アプリケーションに最適な RNA を精製するためには、miRNeasy FFPE 操作で 80°C のインキュベーションは非常に重要。80°C のインキュベーション温度が 15 分間のインキュベーション時間中に保持されていたことを確認する。
- 80°C のインキュベーションによりホルムアルデヒドによるクロスリンクはある程度外されるが、FFPE 切片から精製した RNA は酵素反応への使用には最適ではない。miRNA あるいは他のノンコーディング RNA の定量にリアルタイム RT-PCR を使用する場合は、miScript PCR System を推奨する。長い RNA のリアルタイム RT-PCR 解析の場合、cDNA 合成にはランダムプライマーか遺伝子特異的なプライマーのみの使用を推奨する。PCR の増幅産物はできるだけ短くすることを推奨する (<150 nt)。
- b) 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、RNeasy MinElute Spin Column のメンブレンを乾燥させるために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間 (15 ~ 25°C) 必ず遠心する。遠心操作後、カラムがフロースルー液と接触しないように気をつけて、カラムをコレクションチューブから取り除く。その後、必ず新しいコレクションチューブをカラムにセットし、最高速度で 5 分間遠心する。
- c) RNA 溶出中に塩類が混入
- Buffer RPE は必ず室温 (15 ~ 25°C) で使用する。

コメント

- d) 逆転写反応に使用した RNA の量が不十分
- miRNA あるいは他のノンコーディング RNA の検出に miScript PCR System (英語版 Handbook 35 ページ、“Ordering Information”) を使用する場合は、10 pg ~ 1 µg の RNA がスタートサンプル量としては充分である。必要に応じて組織切片を増やして RNA 精製を行なう。1 µg より多い RNA を使用する場合には、適した量に反応液量を直線的にスケールアップする。
- リアルタイム RT-PCR による mRNA 検出に RNA を使用する場合は、通常ほとんどの逆転写酵素で約 1 µg の RNA を使用する。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 未満の RNA の高感度な逆転写反応用にデザインされた Sensiscript® RT Kit (cat. no. 205211) を使用することを推奨する。1 ステップの RT-PCR あるいはリアルタイム定量 RT-PCR を行なう場合、ゲノム DNA コンタミの除去と逆転写反応をインテグレートした QuantiFast™ Probe RT-PCR Plus Kit (cat. no. 204482) を使用することを推奨する。

Appendix A : 脱パラフィン法

FFPE サンプルから核酸を精製する前に、サンプルと Proteinase K が直接反応できるようにパラフィンを除去しなければなりません。脱パラフィンには Deparaffinization Solution (cat. no. 19093) を推奨します。あるいは、以下に記載するようにヘプタン、キシレン、リモネン、CitriSolv (Fisher HealthCare、cat. no. 22-143-975) あるいは融解法を用いることもできます。

ヘプタンとメタノールを用いた脱パラフィン

ヘプタンとメタノールによる脱パラフィンは追加の洗浄ステップなしに行なえます。通常、この方法により RNA アプリケーションで良い結果が得られます。

以下の方法においてサンプルあたり 1 ~ 2 切片を使用する場合の容量は▲印、サンプルあたり 3 切片以上調製する場合の容量は●印で記載しています。

- A1. 500 μ l のヘプタンを添加し、ボルテックスで 10 秒間激しく混和し、室温 (15 ~ 25°C) で 10 分間インキュベートする。
- A2. 25 μ l のメタノールを添加し、ボルテックスで 10 秒間激しく混和し、9,000 x g (11,000 rpm) 以上で 2 分間遠心操作する。
- A3. ペレットが剥がれないようにピペットで遠心上清を注意深く取り除く。細いピペットチップを用いて残留しているヘプタン/メタノールを注意深く取り除く。
- A4. チューブの蓋を開けたままで、ペレットを室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間乾燥させる。
- A5. ▲ 150 μ l あるいは● 240 μ l の Buffer PKD を添加し、ボルテックスで混和する。
- A6. 10 μ l の Proteinase K を添加し、ピペッティングにより静かに混和する。
- A7. 56°C で 15 分間インキュベートした後、80°C で 15 分間インキュベートする。

ヒートブロックを一台しか使用しない場合には、56°C でのインキュベーション後、ヒートブロックが 80°C になるまでサンプルを室温に置きます。

重要：15 分のインキュベーションを行なう前に、ヒートブロックが 80°C であることを確認します。リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションに最適な RNA を精製するためには、80°C で 15 分間のインキュベーションは非常に重要です。

Buffer PKD 中での 80°C のインキュベーションにより、核酸のホルムアルデヒドによるクロスリンクが部分的に外れます。より長いインキュベーション時間あるいは高温度のインキュベーションにより断片化した RNA が増えることがあります。リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションで C_T 値がわずかに減少することもあります。

- A8. FFPE 組織切片用プロトコールのステップ 11 (3 ページ) に進むか、マイクロダイセクションでの FFPE 組織切片用プロトコールのステップ 10 (7 ページ) に進む。

キシレン、リモネン、CitriSolv を用いた脱パラフィン

最初にパラフィンをキシレン、リモネン、あるいは CitriSolv 中で溶解します。サンプルを沈殿した後、上清を取り除き、残ったキシレンをエタノールによる洗浄で除去します。FFPE サンプルからの RNA 精製に、これまでこの方法は一般的によく使用されており、様々なアプリケーションに使用されています。

以下の方法においてサンプルあたり 1 ~ 2 切片を使用する場合の容量は▲印、サンプルあたり 3 切片以上調製する場合の容量は●印で記載しています。

- A1. 1 ml のキシレン、リモネン、あるいは CitriSolv を添加する。10 秒間ボルテックスで激しく混和し、最高速度で 2 分間遠心操作する。**
- A2. ペレットが剥がれないようにピペットで遠心上清を注意深く取り除く。**
- A3. ペレットにエタノール (96 ~ 100%) 1 ml を添加し、ボルテックスで混和する。サンプルに残留しているキシレンをエタノールで抽出します。**
- A4. 最高速度で 2 分間遠心操作する。**
- A5. ペレットが剥がれないようにピペットで遠心上清を注意深く取り除く。細いピペットチップを用いて残留しているエタノールを注意深く取り除きます。**
- A6. 蓋を開けたまま室温 (15 ~ 25°C) あるいは最高 37°C、10 分間あるいは残りのエタノールが蒸発するまでインキュベートする。**
- A7. ▲ 150 μ l あるいは● 240 μ l の Buffer PKD を添加し、ボルテックスで混和する。**
- A8. 10 μ l の Proteinase K を添加し、ピペッティングにより静かに混和する。**
- A9. 56°C で 15 分間インキュベートした後、80°C で 15 分間インキュベートする。**

ヒートブロックを一台しか使用しない場合には、56°C でのインキュベーション後、ヒートブロックが 80°C になるまでサンプルを室温に置きます。

重要：15 分のインキュベーションを行なう前に、ヒートブロックが 80°C であることを確認します。リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションに最適な RNA を精製するためには、80°C で 15 分間のインキュベーションは非常に重要です。

Buffer PKD 中での 80°C のインキュベーションにより、核酸のホルムアルデヒドによるクロスリンクが部分的に外れます。より長いインキュベーション時間あるいは高温度のインキュベーションにより断片化した RNA が増えることがありますが、リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションで C_T 値がわずかに減少することもあります。

- A10. FFPE 組織切片用プロトコルのステップ 11 (3 ページ) に進むか、マイクロダイセクションでの FFPE 組織切片用プロトコルのステップ 10 (7 ページ) に進む。**

融解による脱パラフィン

パラフィンが融解され、その後冷却されると水層上に一枚の固体状の層を形成します。この層をピペットチップで突き刺し、その後精製プロトコルを続けます。パラフィンでピペットが詰まらないようにする必要があります。

以下の方法においてサンプルあたり 1～2 切片を使用する場合の容量は▲印、サンプルあたり 3 切片以上調製する場合の容量は●印で記載しています。

A1. ▲ 150 μ l あるいは● 240 μ l の Buffer PKD を添加し、ボルテックスで混和する。

A2. 55°C で 3 分間加熱し、ボルテックスで 10 秒間激しく混和した後、最高速度で 2 分間遠心操作する。

A3. 10 μ l の Proteinase K を添加し、ピペッティングにより静かに混和する。

Proteinase K を添加するため、固体状のパラフィン層にピペットチップを通します。

A4. 56°C で 15 分間インキュベートした後、80°C で 15 分間インキュベートする。

ヒートブロックを一台しか使用しない場合には、56°C でのインキュベーション後、ヒートブロックが 80°C になるまでサンプルを室温に置きます。

重要：15 分のインキュベーションを行なう前に、ヒートブロックが 80°C であることを確認します。リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションに最適な RNA を精製するためには、80°C で 15 分間のインキュベーションは非常に重要です。

Buffer PKD 中での 80°C のインキュベーションにより、核酸のホルムアルデヒドによるクロスリンクが部分的に外れます。より長いインキュベーション時間あるいは高温度のインキュベーションにより断片化した RNA が増えることがあります。リアルタイム RT-PCR などのダウンストリーム・アプリケーションで C_T 値がわずかに減少することもあります。

A5. FFPE 組織切片用プロトコルのステップ 11 (3 ページ) に進むか、マイクロダイセクションでの FFPE 組織切片用プロトコルのステップ 10 (7 ページ) に進む。

Trademarks: QIAGEN®, MinElute®, QuantiFast™, QuantiTect®, RNeasy®, Sensiscript® (QIAGEN Group); Leica® (Leica Microsystems GmbH).

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載の QIAGEN 製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2010 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒 104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300 ■ Fax: 03-5547-0818 ■ E-mail: techservice-jp@qiagen.com

