

AllPrep[®] RNA/Protein プロトコールとトラブルシューティング

同一の動物細胞サンプルからのトータルRNAと
タンパク質の同時分離精製

目次	ページ
プロトコール	
動物細胞からのトータルRNAとタンパク質の同時分離精製	2
トラブルシューティング	7



プロトコール：動物細胞からのトータルRNAとタンパク質の同時分離精製

本プロトコールは12、24、48、96ウェル細胞培養プレート用です。その他のフォーマットを使用される場合は、テクニカルサポートにお問い合わせください。

実験を始める前の重要事項

- AllPrep RNA/Protein Kitを初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 11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 20ページ）をお読みください。
- 保存中にBuffer APLおよびBuffer RLTが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および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に関しては英語版 Handbook 6ページを参照ください。
- 特別な表記がない限り、遠心操作を含む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。細胞回収後は迅速に処理します。
- トータルRNAの保存、定量、定性法については英語版 Handbook 22ページ、Appendix Bを参照ください。

実験を始める前の準備事項

- RNA収量を増加するために、使用する前にβ-MEをBuffer RLTに添加することがあります。すでに実施した精製でRNA収量が低く、トラブルシューティング（7ページ）を行なった場合にのみβ-MEの使用を推奨します。適切な保護着を着用の上、ドラフト内で調製してください。1 ml Buffer RLT当たり10 μl β-MEを添加します。β-MEを添加したBuffer RLTは1ヶ月間安定です。
- Buffer RPEは濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、ボトルに記載されている様に4倍量のエタノール（96～100%）を加えて、ワーキング溶液を調製します。

操作手順

1. **Protein Cleanup** スピнкаラムを静かにボルテックスして樹脂を再懸濁させる。
2. **Protein Cleanup** スピнкаラムの蓋を4分の1だけ緩める。
これによりスピнкаラム中の陰圧を防ぎます。
3. **Protein Cleanup** スピнкаラムの下のストッパーを折り、2 mlのコレクションチューブ（添付）にセットする。
ストッパーをねじらないでください。

ストッパーを折る



4. **750 x g**で3分間遠心操作する（5ページ、表4を参照し、**750 x g**に対応するrpmを換算する）。

遠心操作後にゲルとカラム壁の間に、小さな隙間が生じることがあります。

5. 平衡バッファー（下記参照）**500 μ l**を添加して**Protein Cleanup**スピнкаラムを平衡化する。静かにボルテックスして、**750 x g**で3分間遠心操作する（5ページ、表4を参照し、**750 x g**に対応するrpmを換算する）。

精製したタンパク質を用いて行なうダウンストリーム・アプリケーションで使用目的に応じた平衡バッファーをお選びください。

6. **Protein Cleanup**スピнкаラムを静かに新しい遠心チューブ（別売）に移す。
7. 培養細胞プレートから細胞培養液を除去する。適切な量のPBSあるいは生理食塩水で細胞を洗浄する。
8. **PBS**を除去する。適切な量の**Buffer APL**（表2）を添加して5分間インキュベートする。

注：細胞溶解中に氷上でインキュベートしないでください。RNA安定化剤が沈澱し、RNAの保護ができなくなります。

表2. 細胞溶解に必要なBuffer APL量

細胞培養プレート	ウェルあたりのBuffer APL量
12ウェルプレート	200 μ l
24ウェルプレート	150 μ l
48ウェルプレート	100 μ l
96ウェルプレート	50 μ l

9. 数回ピペティングしてホモジナイズする。
10. 2 ml コレクションチューブ中にセットした **AllPrep** スピнкаラムにライセートをピペットで入れる。8,000 x g (10,000 rpm) 以上で1分間遠心操作する。

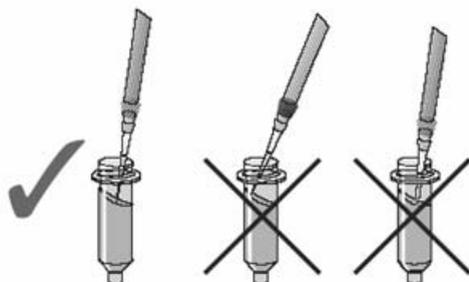
AllPrep スピнкаラムにはRNAが結合しています。ステップ14で使用するために室温で保存します。

ろ過液には全タンパク質が入っています。迅速にステップ11を続けて行ないます。直ぐに作業できない場合には、ろ過液を氷上で保存します。

11. ステップ10のろ過液をピペットで **Protein Cleanup** スピнкаラムの傾斜したゲルベッドの中央に一滴ずつ直接アプライする (下図参照)。

重要: ゲル内に滴下液が吸収されるようにゆっくりとピペットで入れます。ゲルベッドとカラム壁の間隙に入れないでください。ピペットチップがゲルベッド表面に接触しないようにします。サンプルあるいはピペットチップがカラム壁に触らないようにします。

正しいサンプルのアプライ



12. 240 x g あるいは 420 x g で3分間遠心操作する (詳細は表3および4を参照)。

表3. Protein Cleanup Spin Columnの遠心操作

1 ウェルあたりのBuffer APL量	速度 (RCF)
200 μ l	240 x g
150 μ l	240 x g
100 μ l	420 x g
50 μ l	420 x g

表4. マイクロ遠心機の遠心力換算表 *

マイクロ遠心機	240 x g	420 x g	750 x g
Eppendorf® Centrifuge 5415C	1700 rpm	2250 rpm	3000 rpm
Eppendorf Centrifuge 5415D	1600 rpm	2130 rpm	2850 rpm
Eppendorf Centrifuge 5417C	1500 rpm	2000 rpm	2700 rpm
Heraeus® Biofuge® 15	1610 rpm	2130 rpm	2800 rpm
Hettich® Mikro 22 R	1490 rpm	1970 rpm	2630 rpm
Hettich Mikro 24-48	1490 rpm	1970 rpm	2630 rpm
Beckman® GS15R	1190 rpm	1570 rpm	2100 rpm
Hettich Mikro EBA12	1500 rpm	2000 rpm	2700 rpm

* 1分間の回転数 (rpm) と相対遠心力 RCF (x g) の換算式は
 $rpm = 1000 \times \sqrt{(RCF/1.12r)}$ 、rはローターの半径 (mm)。

13. マイクロ遠心チューブからProtein Cleanupスピнкаラムを取り出す。

ろ過液には精製済みトータルタンパク質が含まれ、ダウンストリームのアプリケーションあるいは精製/分画などの操作にすぐ使用することができます。

注：精製したタンパク質には、タンパク質量法 (Bradford法およびLowry法など) を妨害するバッファー成分が含まれていることがあります。しかし、260 nm および 280 nm の吸光度を測定することにより、タンパク質を迅速かつ容易に定量できます* (英語版 Handbook 24 ページ、Appendix C 参照)。あるいは BCA (Bicinchoninic acid) アッセイを行なうことも可能です。

注：溶解およびクリーンアップ後のタンパク質の機能性はβ-ガラクトシダーゼ活性の測定によりテストしました。目的のタンパク質の機能性はそのタンパク質の特性に従いテストされなければなりません。

14. AllPrepスピнкаラムを新しい2 mlのコレクションチューブ (添付) にセットする。Buffer RLT 350 µl を添加し、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で1分間遠心操作する。

15. 1容量の70%エタノール (通常350 µl) をろ過液に添加する。ピペットで数回上下させてよく混和する。

エタノール添加後、沈澱が生じることがあります。しかしRNA精製操作には影響しません。

* AllPrepスピнкаラムにはRNA、DNA共に結合します。このため、精製したタンパク質の吸光度は核酸混入による影響を受けません。

16. サンプル700 μl (沈澱が形成している場合はこれも含む) を2 ml コレクションチューブ上のRNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉めて、8,000 \times g (10,000 rpm) 以上で1分間遠心操作する。ろ過液を棄てる*。
コレクションチューブはステップ17で再利用します。
17. 700 μl のBuffer RW1 をRNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉めて、8,000 \times g (10,000 rpm) 以上で30秒間遠心操作してスピнкаラム・メンブレンを洗浄する。ろ過液を棄てる*。
コレクションチューブはステップ18で再利用します。
18. 500 μl のBuffer RPE をRNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉めて、8,000 \times g (10,000 rpm) 以上で30秒間遠心操作してスピнкаラム・メンブレンを洗浄する。ろ過液を棄てる。
コレクションチューブはステップ19で再利用します。
注：Buffer RPE は濃縮液としてお届けします。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)。
19. 500 μl のBuffer RPE をRNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉めて、8,000 \times g (10,000 rpm) 以上で30秒間遠心操作してスピнкаラム・メンブレンを洗浄する。ろ過液を棄てる。
コレクションチューブはステップ20で再利用します。
20. RNeasy スピнкаラムを最高速度で1分間遠心操作し、残存している洗浄バッファを除去する。
推奨：乾燥させるために2度目の遠心操作を行ないます：スピнкаラムを新しい2 ml のコレクションチューブ (別売) にセットし、ろ過液の入った古いコレクションチューブを棄て、最高速度で1分間遠心操作します。
注：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。遠心操作によりRNA 溶出中へのエタノール混入を避けることができます。
21. 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。30 ~ 50 μl のRNase フリー水を直接スピнкаラム・メンブレンにピペットでアプライする。蓋を静かに閉めて、8,000 \times g (10,000 rpm) 以上で1分間遠心操作してRNA を溶出する。

* Buffer RL1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 6 ページをご覧ください。

トラブルシューティングガイド

コメント

精製したタンパク質を用いたダウンストリーム実験でよい結果が出ない

- a) RNA 安定化試薬が完全に除去されていない Protein Cleanup スピнкаラムの遠心速度が、使用した溶解バッファー量で推奨されている速度よりも速過ぎないことを確認する。
タンパク質を含む過液を Protein Cleanup スピнкаラムに正しくアプライする（プロトコルのステップ 11 を参照）。ゲルベッドとカラム壁の隙間にタンパク質が流入するのを避けることが非常に重要である。
- b) 精製したタンパク質中にバッファー成分が残存している ライセートにより異なる。バッファー成分の除去を改善するため、Protein Cleanup スピнкаラムの遠心速度を減じる。これにより過液の量が減少し、その結果タンパク質収量が減ることがある。
- c) タンパク質が分解 細胞溶解中のタンパク質分解はほとんど生じないかあるいはダウンストリーム・アプリケーションに全く影響を及ぼさないが、分解を完全に排除することはできない。タンパク質分解を避けるために、プロテナーゼあるいはホスファターゼ阻害剤を Buffer APL に添加する（英語版 Handbook 26 ページ、Appendix E 参照）。
- d) タンパク質濃度が低い 細胞溶解を完全に行なうために、推奨された量の Buffer APL を使用する（3 ページ、表 2）。英語版 Handbook 25 ページ、Appendix D にあるタンパク質のアセトン沈澱用プロトコルを行ないタンパク質を濃縮する。

重要：アセトン沈澱を行なう前に Protein Cleanup スピнкаラムで RNA 安定化試薬を除去する（プロトコルのステップ 11～13）。

RNA 収量が低い

- a) RNeasy メンブレンに RNA が結合したまま RNA 溶出を繰り返すが、遠心前に RNeasy スピнкаラムを実験台で 10 分間、RNase フリー水とインキュベートする。
- b) エタノールのキャリーオーバー プロトコルのステップ 20 に記述しているように、乾燥のために 2 回の遠心操作を行ない RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥させる。2 回目の遠心操作後、エタノールを含んだ過液にスピнкаラムが接触しないように注意してコレクションチューブからカラムを取り除く。

コメント

RNA 収量が低いあるいは皆無

RNase フリー水の添加が
不適切

RNase フリー水を RNeasy スピンカラム・メンブレンの中央にアプライし、次の遠心操作で最大量の RNA を溶出させる。

RNA 定量の際の A_{260}/A_{280} 値が低い

使用したバッファーが
不適切

RNase フリー水ではなく、10 mM Tris-Cl、pH 7.5 で RNA サンプルを希釈後、260 nm および 280 nm の吸光度を測定する（英語版 Handbook 22 ページ、Appendix B 参照）。

RNA が分解

a) RNase の混入

Buffer APL を除いたすべての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。操作中および操作後の取り扱いの際に RNase が混入しないように注意する（英語版 Handbook 20 ページ、Appendix A）。

RNase を使用した可能性のある DNA 調製に用いた吸引乾燥機に RNA サンプルを入れない。

b) 細胞溶解中に RNA が
保護されていない

細胞溶解中に RNA 安定化試薬が沈澱した。Buffer APL の温度が 15 ~ 25 °C であることを確認する。

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 15 ~ 25 °C で使用する。

b) エタノールの
キャリアオーバー

プロトコールのステップ 20 に記述しているように、乾燥のために 2 回の遠心操作を行なうことにより RNeasy スピンカラム・メンブレンを乾燥させる。2 回目の遠心操作後、エタノールを含んだろ過液にスピンカラムが接触しないように注意してコレクションチューブからカラムを取り除く。

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

2301393 05/2008