

RNAprotect[®] Bacteria Reagent プロトコールとトラブルシューティング

RNAprotect Bacteria Reagent

バクテリア中のトータル RNA を *in vivo* で安定化

RNeasy[®] Protect Bacteria Mini Kit

RNeasy Protect Bacteria Midi Kit

バクテリア中のトータル RNA の *in vivo* 安定化および

RNA 精製



目次

プロトコール

プロトコール 1：バクテリアの酵素による溶解	3
プロトコール 2：バクテリアの酵素による溶解と機械的破碎	6
プロトコール 3：バクテリアの機械破碎	9
プロトコール 4：バクテリアの酵素による溶解と Proteinase K 分解	12
プロトコール 5：バクテリアの酵素による溶解、Proteinase K 分解、 機械破碎	15
プロトコール 6：固体培地で培養したバクテリアの破碎	18
プロトコール 7：RNeasy Mini Kit を用いたバクテリア・ライセートからの トータル RNA 精製	19
プロトコール 8：RNeasy Midi Kit を用いたバクテリア・ライセートからの RNA 精製	21
トラブルシューティング	23

プロトコール 1：バクテリアの酵素による溶解

実験を始める前の重要事項

- バクテリアの培養と採取を行なう前に英語版 Handbook 13 ページの “Optimal culture conditions” をお読みください。
- 初めて RNA を調製する場合には英語版 Handbook 38 ページの Appendix A をお読みください。
- この実験の全てのステップは中断せずに室温(15 ~ 25℃)で行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用しない場合は、ステップ 7 までの操作を行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用する場合は、英語版 Handbook 13 ページおよび 14 ページの “Determining the correct amount of starting material” と “Quantifying bacterial cells” をお読みください。スタートサンプルの量に応じて RNeasy Mini Kit と RNeasy Midi Kit のどちらを使用するかお選びください。
- 本プロトコールでは大腸菌に最適な 1 mg/ml のリゾチームで 5 分間処理する方法を採用しています。酵素による溶解の条件は菌種、細胞数、培養液により影響を受けます。従って、酵素濃度、酵素インキュベーション時間の調節、他の酵素の使用が必要になるかもしれません。

実験開始前の準備事項

- RNeasy Kits を RNA 精製に使用する場合は、1 ml の Buffer RLT あたり 10 μ l の β -メルカプトエタノールを添加し、混和します。 β -メルカプトエタノールを添加した Buffer RLT は 1 ヶ月間安定です。

操作手順

1. **1 mg/ml のリゾチームを含んだ TE Buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA; pH 8.0) を調製する。**
2. **必要なバクテリア培養液の容量を計算する (1 容量)。**
英語版 Handbook 13 ページの “Determining the correct amount of starting material” を参照してください。
3. **2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent をピペットで反応チューブ (別途準備) に入れる。**

例えばバクテリア培養液量が 500 μ l ならば、1,000 μ l の RNAprotect Bacteria Reagent を添加してください。

チューブはバクテリア培養液量の 4 倍のものを使用します (例; バクテリア培養液量が 500 μ l の場合、使用するチューブは 2 ml)。

オプション: バクテリア培養液全体は、2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent を培養液に加えることにより安定化されます。

4. チューブに 1 容量の細菌培養液を入れ、即座にボルテックスで 5 秒間混和する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。
5. 5,000 x g で 10 分間遠心操作する。
 遠心操作後、ペレットが目視できないことがあります。これは細胞と安定化試薬の相互作用により、視覚上細胞密度が変化したためです。操作には影響しません。
 注：50 ml より大きいチューブでは、遠心力と遠心操作の時間を増やします。しかし過剰な遠心力を用いると、ペレットの再懸濁が困難になることがあります。
6. 上清を棄てる。ペーパータオルの上で遠心チューブを逆さまにして軽く叩いて、残った上清を除去する。
 ペーパータオルの上でチューブを軽く叩いた後、残った上清をピペティングで除去しないでください。ペレットが消失することがあります。15 ml より大きいチューブを用いる場合には、ペーパータオルの上にチューブを 10 秒間逆さにおいて、上清を除去してください。
 注：残った上清の量は、ステップ 7 で使用するリゾチーム含有 TE バッファー (100 µl) あたり約 80 µl を超えないようにしてください。
 オプション：ペレットは -20°C で 2 週間まで、-70°C で 4 週間まで保存可能です。後日、RNA 精製を行なう場合は、このペレットを室温 (15 ~ 25°C) で解凍してプロトコールのステップ 7 から続けてください。
7. 適切な量のリゾチーム含有 TE バッファーを添加する (表 3 参照)。

表 3. 細菌の酵素による溶解に必要な試薬容量

細菌数 *	RNeasy spin column	リゾチーム含有 TE バッファー (ステップ 7)	Buffer RLT (ステップ 9)	エタノール (96 ~ 100%) (ステップ 10)
<5 x 10 ⁸	Mini	100 µl	350 µl	250 µl
5 x 10 ⁸ ~ 7.5 x 10 ⁸	Mini	200 µl	700 µl	500 µl
5 x 10 ⁸ ~ <1 x 10 ⁹	Midi	500 µl	2,000 µl	1,400 µl
1 x 10 ⁹ ~ 7.5 x 10 ⁹	Midi	1,000 µl	4,000 µl	2,800 µl

* 細胞数は大腸菌用に最適化されている。他の細菌を使用する場合は最適化が必要になる。英語版 Handbook 13 ページの "Determining the correct amount of starting material" を参照。

8. ボルテックスで 10 秒間混和する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。シェーカー付きインキュベーターでインキュベートするか、あるいは少なくとも 2 分間隔で 10 秒間ボルテックスしてインキュベートする。

注：RNA は安定化されているので、インキュベーション時間を延長しても、悪影響を与えることなく RNA 収量が増加することがあります。

9. 適切な量の Buffer RLT (表 3 参照) を添加し、激しくボルテックスする。微粒子が見える場合には遠心操作によりペレット化して、上清のみをステップ 10 に使用する。

2 ml 以下のチューブを用いる場合には、マイクロ遠心機を用いて最高速度で 2 分間遠心操作を行ないます。2 ml より大きいチューブを用いる場合には、3,000 ~ 5,000 x g で 5 分間遠心操作します。

注：使用前に β -メルカプトエタノールを Buffer RLT に添加します。3 ページの“実験を始める前の重要事項”を参照してください。

10. 適切な量のエタノール (96 ~ 100%) をライセートに添加する (表 3 参照)。ピペッティング (RNeasy Mini) あるいは激しく振盪 (RNeasy Midi) して混和する。遠心操作は行なわない。

エタノール添加後に沈殿物を形成することがありますが、これは RNeasy 調製には影響しません。

11. RNeasy Mini Kit を用いる場合はプロトコール 7 へ進む。RNeasy Midi Kit を用いる場合はプロトコール 8 へ進む。

プロトコール 2 : バクテリアの酵素による溶解と機械的破砕

実験を始める前の重要事項

- バクテリアの培養と採取を行なう前に英語版 Handbook 13 ページの “Optimal culture conditions” をお読みください。
- 初めて RNA を調製する場合には英語版 Handbook 38 ページの Appendix A をお読みください。
- この実験の全てのステップは中断せずに室温(15 ~ 25℃)で行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用しない場合は、ステップ 11 までの操作を行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用する場合は、英語版 Handbook 13 ページおよび 14 ページの “Determining the correct amount of starting material” と “Quantifying bacterial cells” をお読みください。スタートサンプルの量に応じて RNeasy Mini Kit と RNeasy Midi Kit のどちらを使用するかお選びください。
- 本プロトコールでは *B. subtilis* に最適な 15 mg/ml のリゾチームで 10 分間処理する方法を採用しています。酵素による溶解の条件は菌種、細胞数、培養液により影響を受けます。従って、酵素濃度および/あるいは酵素インキュベーション時間の調節が必要になるかもしれません（例； *Staphylococcus aureus* の細胞壁破砕には lysostaphin を推奨）。

実験開始前の準備事項

- RNeasy Kits を RNA 精製に使用する場合は、1 ml の Buffer RLT あたり 10 μ l の β -メルカプトエタノールを添加し、混和します。 β -メルカプトエタノールを添加した Buffer RLT は 1 ヶ月間安定です。

操作手順

1. 15 mg/ml のリゾチームを含んだ TE Buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA; pH 8.0) を調製する。
2. それぞれのサンプルについて、直径 150 ~ 600 μ m の酸洗浄済みガラスビーズ 25 ~ 50 mg を 2 ml のセーフロックチューブ（別途準備）に入れる（ステップ 11 で使用する）。
3. 必要なバクテリア培養液の容量を計算する（1 容量）。
英語版 Handbook 13 ページの “Determining the correct amount of starting material” を参照してください。

4. 2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent をピペットで反応チューブ（別途準備）に入れる。

例えばバクテリア培養液量が 500 μl ならば、1,000 μl の RNAprotect Bacteria Reagent を添加してください。

チューブの容量はバクテリア培養液量の 4 倍のものを使用します（例；バクテリア培養液量が 500 μl の場合、チューブの大きさは 2 ml）。

オプション：バクテリア培養液全体は、2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent を培養液に加えることにより安定化されます。

5. チューブに 1 容量のバクテリア培養液を入れ、即座にボルテックスで 5 秒間混和する。室温（15 ~ 25°C）で 5 分間インキュベートする。

6. 5,000 x g で 10 分間遠心操作する。

遠心操作後、ペレットが目視できないことがあります。これは細胞と安定化試薬の相互作用により、視覚上細胞密度が変化したためです。操作には影響しません。

注：50 ml より大きいチューブでは、遠心力と遠心操作の時間を増やします。しかし過剰な遠心力を用いると、ペレットの再懸濁が困難になることがあります。

7. 上清を棄てる。ペーパータオルの上で遠心チューブを逆さまにして軽く叩いて、残った上清を除去する。

ペーパータオルの上でチューブを軽く叩いた後、残った上清をピPETTING で除去しないでください。ペレットが消失することがあります。15 ml より大きいチューブを用いる場合には、ペーパータオルの上にチューブを 10 秒間逆さにおいて、上清を除去してください。

注：残った上清の量は、ステップ 8 で使用するリゾチーム含有 TE バッファー（100 μl ）あたり約 80 μl を超えないようにしてください。

オプション：ペレットは -20°C で 2 週間まで、-70°C で 4 週間まで保存可能です。後日、RNA 精製を行なう場合は、このペレットを室温（15 ~ 25°C）で解凍してプロトコールのステップ 8 から続けてください。

8. 適切な量のリゾチーム含有 TE バッファーを添加する（表 4 参照）。

9. ボルテックスで 10 秒間混和する。室温（15 ~ 25°C）で 10 分間インキュベートを行なう。シェーカー付きインキュベーターでインキュベートするか、あるいは少なくとも 2 分間隔で 10 秒間ボルテックスしてインキュベートする。

注：RNA は安定化されているので、インキュベーション時間を延長しても、悪影響を与えることなく RNA 収量が増加することがあります。

10. 適切な量の Buffer RLT を添加する（表 4 参照）。ボルテックスを 5 ～ 10 秒間激しく行なう。

注：使用前に β-メルカプトエタノールを Buffer RLT に添加します。6 ページの“実験を始める前の重要事項”を参照してください。

ペレットが完全に Buffer RLT に懸濁したことを確認してください。

表 4. バクテリアの酵素による溶解と機械破碎に必要な試薬容量

バクテリア数 *	RNeasy spin column	リゾチーム含有 TE バッファー (ステップ 8)	Buffer RLT (ステップ 10)	エタノール		
				Buffer RLT (ステップ 12)	(96 ～ 100%) (ステップ 13)	エタノール (70%) (ステップ 13)
<5 x 10 ⁸	Mini	100 μl	350 μl	-	220 μl	-
5 x 10 ⁸ ～ 7.5 x 10 ⁸	Mini	200 μl	700 μl	-	470 μl	-
5 x 10 ⁸ ～ 7.5 x 10 ⁹	Midi	200 μl	700 μl	3,200 μl	-	4,000 μl

* 細胞数は大腸菌用に至適化されている。他のバクテリアを使用する場合は至適化が必要になる。英語版 Handbook 13 ページの“Determining the correct amount of starting material”を参照。

11. ステップ 2 で準備した酸洗浄済みガラスビーズが入っているセーフロックチューブ (2 ml) に懸濁液を入れる。TissueLyser を用いて最高速度で 5 分間細胞破碎する。

他の機械的破碎法も使えますが、QIAGEN は TissueLyser の使用を推奨します。

12. 最高速度で 10 秒間遠心操作を行なう。上清 (5 x 10⁸ 以下の細胞では 400 μl、5 x 10⁸ 以上の細胞では 850 μl) を新しいチューブ (別途準備) に入れる。RNeasy Midi Kit を用いる場合は、3,200 μl の Buffer RLT を上清に添加し、振盪あるいはボルテックスを 5 ～ 10 秒間行ない、完全に混和する。

注：使用前に β-メルカプトエタノールを Buffer RLT に添加します。6 ページの“実験を始める前の重要事項”を参照してください。

13. 適切な量のエタノール (RNeasy Mini 用は 96 ～ 100%、RNeasy Midi 用は 70% を使用) (表 4 を参照) を上清に添加する。ピペッティング (RNeasy Mini) あるいは激しく振盪 (RNeasy Midi) して混和する。遠心操作は行なわない。

エタノール添加後に沈殿物を形成することがありますが、これは RNeasy 調製には影響しません。

14. RNeasy Mini Kit を用いる場合はプロトコール 7 へ進む。RNeasy Midi Kit を用いる場合はプロトコール 8 へ進む。

プロトコール 3 : バクテリアの機械破碎

実験を始める前の重要事項

- バクテリアの培養と採取を行なう前に英語版 Handbook 13 ページの “Optimal culture conditions” をお読みください。
- 初めて RNA を調製する場合には英語版 Handbook 38 ページの Appendix A をお読みください。
- この実験の全てのステップは中断せずに室温(15 ~ 25°C)で行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用しない場合は、ステップ 9 までの操作を行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用する場合は、英語版 Handbook 13 ページおよび 14 ページの “Determining the correct amount of starting material” と “Quantifying bacterial cells” をお読みください。スタートサンプルの量に応じて RNeasy Mini Kit と RNeasy Midi Kit のどちらを使用するかお選びください。

実験開始前の準備事項

- RNeasy Kits を RNA 精製に使用する場合は、1 ml の Buffer RLT あたり 10 μ l の β -メルカプトエタノールを添加し、混和します。 β -メルカプトエタノールを添加した Buffer RLT は 1 ヶ月間安定です。

操作手順

1. それぞれのサンプルについて、直径 150 ~ 600 μ m の酸洗浄済みガラスビーズ 25 ~ 50 mg を 2 ml のセーフロックチューブ (別途準備) に入れる (ステップ 8 で使用する)。
2. 必要なバクテリア培養液の容量を計算する (1 容量)。
英語版 Handbook 13 ページの “Determining the correct amount of starting material” を参照してください。
3. 2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent をピペットで反応チューブに入れる。
例えばバクテリア培養液量が 500 μ l ならば、1,000 μ l の RNAprotect Bacteria Reagent を添加してください。
チューブの容量はバクテリア培養液量の 4 倍のものを使用します (例; バクテリア培養液量が 500 μ l の場合、チューブの大きさは 2 ml)。
オプション: バクテリア培養液全体は、2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent を培養液に加えることにより安定化されます。
4. チューブに 1 容量のバクテリア培養液を入れ、即座にボルテックスで 5 秒間混和する。室温 (15 ~ 25°C) で 5 分間インキュベートする。

5. 5,000 x g で 10 分間遠心操作する。

遠心操作後、ペレットが目視できないことがあります。これは細胞と安定化試薬の相互作用により、視覚上細胞密度が変化したためです。操作には影響しません。

注：50 ml より大きいチューブでは、遠心力と遠心操作の時間を増やします。しかし過剰な遠心力を用いると、ペレットの再懸濁が困難になることがあります。

6. 上清を棄てる。ペーパータオルの上で遠心チューブを逆さまにして軽く叩いて、残った上清を除去する。

ペーパータオルの上でチューブを軽く叩いた後、残った上清をピペッティングで除去しないでください。ペレットが消失することがあります。15 ml より大きいチューブを用いる場合には、ペーパータオルの上にチューブを 10 秒間逆さにおいて、上清を除去してください。

注：残った上清の量は、ステップ7で使用する Buffer RLT (350 μ l) あたり約 80 μ l を超えないようにしてください。

オプション：ペレットは -20°C で 2 週間まで、 -70°C で 4 週間まで保存可能です。後日、RNA 精製を行なう場合は、このペレットを室温 ($15 \sim 25^{\circ}\text{C}$) で解凍してプロトコールのステップ7から続けてください。

7. 適切な量の Buffer RLT を添加する (表 5 参照)。ボルテックスを 5 ~ 10 秒間激しく行なう。

注：使用前に β -メルカプトエタノールを Buffer RLT に添加します。9 ページの“実験を始める前の重要事項”を参照してください。

ペレットが完全に Buffer RLT に懸濁したことを確認してください。

表 5. バクテリアの機械破砕に使用する Buffer RLT 量

バクテリア数 *	Buffer RLT (μ l)
$<5 \times 10^8$	350
$5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$	700
$>1 \times 10^9$	1,800

* 細胞数は大腸菌用に最適化されている。他のバクテリアを使用する場合は最適化が必要になる。英語版 Handbook 13 ページの“Determining the correct amount of starting material”を参照。

8. ステップ1で準備した酸洗浄済みビーズが入っているセーフロックチューブ (2 ml) に懸濁液を入れる。TissueLyser を用いて最高速度で5分間細胞破碎する。他の機械的破碎法も使えますが、QIAGEN は TissueLyser の使用を推奨します。
9. 最高速度で10秒間遠心操作を行なう。新しいチューブ (別途準備) に上清を入れる。RNeasy Midi Kit を使用する場合は、上清に Buffer RLT を添加して、最終容量を4 ml にする。5 ~ 10秒間激しくボルテックスする。

RNeasy Midi Kit を使用する場合は、チューブのサイズは使用した Buffer RLT の2倍以上にします。

RNeasy Midi Kit を使用する場合は、チューブのサイズは10 ml 以上にします。

注：使用前にβ-メルカプトエタノールを Buffer RLT に添加したことを確認します (9 ページの“実験を始める前の準備事項”を参照)。
10. 上清の量を測定する。等量のエタノール (70%) を添加する。ピペッティング (RNeasy Mini) あるいは激しく振盪 (RNeasy Midi) してよくミックスする。遠心操作は行なわない。

エタノール添加後に沈殿物を形成することがありますが、これは RNeasy 調製には影響しません。
11. RNeasy Mini Kit を用いる場合はプロトコール7へ進む。RNeasy Midi Kit を用いる場合はプロトコール8へ進む。

プロトコール 4 : バクテリアの酵素による溶解と Proteinase K 分解

実験を始める前の重要事項

- バクテリアの培養と採取を行なう前に英語版 Handbook 13 ページの “Optimal culture conditions” をお読みください。
- 初めて RNA を調製する場合には英語版 Handbook 38 ページの Appendix A をお読みください。
- この実験の全てのステップは中断せずに室温(15 ~ 25℃)で行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用しない場合は、ステップ 7 までの操作を行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用する場合は、英語版 Handbook 13 ページおよび 14 ページの “Determining the correct amount of starting material” と “Quantifying bacterial cells” をお読みください。スタートサンプルの量に応じて RNeasy Mini Kit と RNeasy Midi Kit のどちらを使用するかお選びください。
- 本プロトコールでは *B. subtilis* に最適な 15 mg/ml のリゾチームで 10 分間処理する方法を採用しています。酵素による溶解の条件は菌種、細胞数、培養液により影響を受けます。従って、酵素濃度および/あるいは酵素インキュベーション時間の調節が必要になるかもしれません。また、他の酵素により効率的に溶解されるバクテリアがあります (例; *Staphylococcus aureus* の細胞壁破砕には lysostaphin を推奨)。

実験開始前の準備事項

- RNeasy Kits を RNA 精製に使用する場合は、1 ml の Buffer RLT あたり 10 μ l の β -メルカプトエタノールを添加し、混和します。 β -メルカプトエタノールを添加した Buffer RLT は 1 ヶ月間安定です。

操作手順

1. 15 mg/ml のリゾチームを含んだ TE Buffer (30 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA; pH 8.0) を調製する。
2. 必要なバクテリア培養液の容量を計算する (1 容量)。
英語版 Handbook 13 ページの “Determining the correct amount of starting material” を参照してください。

3. 2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent をピペットで反応チューブ（別途準備）に入れる。

例えばバクテリア培養液量が 500 μl ならば、1,000 μl の RNAprotect Bacteria Reagent を添加してください。

チューブの容量はバクテリア培養液量の 4 倍のものを使用します（例；バクテリア培養液量が 500 μl の場合、チューブの大きさは 2 ml）。

オプション：バクテリア培養液全体は、2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent を培養液に加えることにより安定化されます。

4. チューブに 1 容量のバクテリア培養液を入れ、即座にボルテックスで 5 秒間混和する。室温（15 ~ 25°C）で 5 分間インキュベートする。

5. 5,000 x g で 10 分間遠心操作する。

遠心操作後、ペレットが目視できないことがあります。これは細胞と安定化試薬の相互作用により、視覚上細胞密度が変化したためです。操作には影響しません。

注：50 ml より大きいチューブでは、遠心力と遠心操作の時間を増やします。しかし過剰な遠心力を用いると、ペレットの再懸濁が困難になることがあります。

6. 上清を棄てる。ペーパータオルの上で遠心チューブを逆さまにして軽く叩いて、残った上清を除去する。

ペーパータオルの上でチューブを軽く叩いた後、残った上清をピペッティングで除去しないでください。ペレットが消失することがあります。15 ml より大きいチューブを用いる場合には、ペーパータオルの上にチューブを 10 秒間逆さにおいて、上清を除去してください。

注：残った上清の量は、ステップ7で使用するリゾチーム含有 TE バッファー（100 μl ）あたり約 80 μl を超えないようにしてください。

オプション：ペレットは -20°C で 2 週間まで、-70°C で 4 週間まで保存可能です。後日、RNA 精製を行なう場合は、このペレットを室温（15 ~ 25°C）で解凍してプロトコールのステップ7から続けてください。

7. 10 ~ 20 μl の QIAGEN Proteinase K を適切な量のリゾチーム含有 TE バッファーに添加し、このミックスをペレットに添加する。ピペットで数回アップダウンしてペレットを慎重に再懸濁する。

必要な QIAGEN Proteinase K の量は菌種により異なります。RNA 精製に RNeasy Midi Kit を使用する場合には、20 μl の QIAGEN Proteinase K を使用します。

表 6. バクテリアの酵素による溶解と Proteinase K 分解に必要な試薬容量

バクテリア 数 *	リゾチーム 含有 TE バッ ファー			エタノール (96 ~ 100%)	エタノール (80%)
	RNeasy spin column	(ステップ 7)	Buffer RLT (ステップ 9)	(ステップ 10)	(ステップ 10)
<1 x 10 ⁸	Mini	100 µl	350 µl	250 µl	-
1 x 10 ⁸ ~ 2.5 x 10 ⁸	Mini	200 µl	700 µl	500 µl	-
<2.5 x 10 ⁸ ~ <1.5 x 10 ⁹	Midi	200 µl	2,000 µl	-	1,750 µl
7.5 x 10 ⁸ ~ 1.5 x 10 ⁹	Midi	200 µl	4,000 µl	-	3,500 µl

* 細胞数は *B. subtilis* 用に至適化されている。他のバクテリアを使用する場合は至適化が必要になる。英語版 Handbook 13 ページの “Determining the correct amount of starting material” を参照。

8. ボルテックスで 10 秒間混和する。室温 (15 ~ 25°C) で 10 分間インキュベートを行なう。シェーカー付きインキュベーターでインキュベートするか、あるいは少なくとも 2 分間隔で 10 秒間ボルテックスしてインキュベートする。

注：RNA は安定化されているので、インキュベーション時間を延長しても、悪影響を与えることなく RNA 収量が増加することがあります。

9. 適切な量の Buffer RLT (表 6 参照) を添加し、激しくボルテックスする。微粒子が観察される場合には遠心操作によりペレット化して、上清のみを次のステップに使用する。

2 ml 以下のチューブを用いる場合には、マイクロ遠心機を用いて最高速度で 2 分間遠心操作を行ないます。2 ml より大きいチューブを用いる場合には、3,000 ~ 5,000 x g で 5 分間遠心操作します。

注：使用前に β-メルカプトエタノールを Buffer RLT に添加します。12 ページの “実験を始める前の重要事項” を参照してください。

10. 適切な量のエタノール (RNeasy Mini 用は 96 ~ 100%、RNeasy Midi 用は 80% を使用) を添加する (表 6 を参照)。ピペッティング (RNeasy Mini) あるいは激しく振盪 (RNeasy Midi) して混和する。遠心操作は行なわない。

エタノール添加後に沈殿物を形成することがありますが、これは RNeasy 調製には影響しません。

11. RNeasy Mini Kit を用いる場合はプロトコール 7 へ進む。RNeasy Midi Kit を用いる場合はプロトコール 8 へ進む。

プロトコール 5 : バクテリアの酵素による溶解、 Proteinase K 分解、機械破碎

実験を始める前の重要事項

- バクテリアの培養と採取を行なう前に英語版 Handbook 13 ページの “Optimal culture conditions” をお読みください。
- 初めて RNA を調製する場合には英語版 Handbook 38 ページの Appendix A をお読みください。
- この実験の全てのステップは中断せずに室温(15 ~ 25°C)で行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用しない場合は、ステップ 11 までの操作を行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用する場合は、英語版 Handbook 13 ページおよび 14 ページの “Determining the correct amount of starting material” と “Quantifying bacterial cells” をお読みください。スタートサンプルの量に応じて RNeasy Mini Kit と RNeasy Midi Kit のどちらを使用するかお選びください。
- 本プロトコールでは *B. subtilis* に最適な 15 mg/ml のリゾチームで 10 分間処理する方法を採用しています。酵素による溶解の条件は菌種、細胞数、培養液により影響を受けます。従って、酵素濃度および/あるいは酵素インキュベーション時間の調節が必要になるかもしれません。また、他の酵素により効率的に溶解されるバクテリアがあります (例 ; *Staphylococcus aureus* の細胞壁破碎には lysostaphin を推奨)。

実験開始前の準備事項

- RNeasy Kits を RNA 精製に使用する場合は、1 ml の Buffer RLT あたり 10 μ l の β -メルカプトエタノールを添加し、混和します。 β -メルカプトエタノールを添加した Buffer RLT は 1 ヶ月間安定です。

操作手順

1. 15 mg/ml のリゾチームを含んだ TE Buffer (30 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA; pH 8.0) を調製する。
2. それぞれのサンプルについて、直径 150 ~ 600 μ m の酸洗浄済みガラスビーズ 25 ~ 50 mg を 2 ml のセーフロックチューブ (別途準備) に入れる (ステップ 11 で使用する)。
3. 必要なバクテリア培養液の容量を計算する (1 容量)。
英語版 Handbook 13 ページの “Determining the correct amount of starting material” を参照してください。

- 4. 2容量の RNAprotect Bacteria Reagent をピペットで反応チューブ（別途準備）に入れる。**

例えばバクテリア培養液量が 500 μ l ならば、1,000 μ l の RNAprotect Bacteria Reagent を添加してください。

チューブの容量はバクテリア培養液量の 4 倍のものを使用します（例；バクテリア培養液量が 500 μ l の場合、チューブの大きさは 2 ml）。

オプション：バクテリア培養液全体は、2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent を培養液に加えることにより安定化されます。

- 5. チューブに 1 容量のバクテリア培養液を入れ、即座にボルテックスで 5 秒間混和する。室温（15 ~ 25°C）で 5 分間インキュベートする。**
- 6. 5,000 x g で 10 分間遠心操作する。**

遠心操作後、ペレットが目視できないことがあります。これは細胞と安定化試薬の相互作用により、視覚上細胞密度が変化したためです。操作には影響しません。

注：50 ml より大きいチューブでは、遠心力と遠心操作の時間を増やします。しかし過剰な遠心力を用いると、ペレットの再懸濁が困難になることがあります。

- 7. 上清を棄てる。ペーパータオルの上で遠心チューブを逆さまにして軽く叩いて、残った上清を除去する。**

ペーパータオルの上でチューブを軽く叩いた後、残った上清をピペッティングで除去しないでください。ペレットが消失することがあります。15 ml より大きいチューブを用いる場合には、ペーパータオルの上にチューブを 10 秒間逆さにおいて、上清を除去してください。

注：残った上清の量は、ステップ 8 で使用するリゾチーム含有 TE バッファー（100 μ l）あたり約 80 μ l を超えないようにしてください。

オプション：ペレットは -20°C で 2 週間まで、-70°C で 4 週間まで保存可能です。後日、RNA 精製を行なう場合は、このペレットを室温（15 ~ 25°C）で解凍してプロトコールのステップ 8 から続けてください。

- 8. 10 ~ 20 μ l の QIAGEN Proteinase K を適切な量のリゾチーム含有 TE バッファー（表 7）に添加し、ミックスをペレットに添加する。ピペットで数回アップダウンしてペレットを慎重に再懸濁する。**

表 7. バクテリアの酵素による溶解、Proteinase K 分解、機械破砕に必要な試薬量

バクテリア数 *	RNeasy spin column	リゾチーム含有 TE バッファー (ステップ 8)	Buffer RLT (ステップ 10)	エタノール (80%) (ステップ 13)
$<7.5 \times 10^8$	Mini	100 μ l	700 μ l	590 μ l
$5 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^9$	Midi	200 μ l	1,500 μ l	1,300 μ l

* 細胞数は *B. subtilis* 用に至適化されている。他のバクテリアを使用する場合は至適化が必要になる。英語版 Handbook 13 ページの “Determining the correct amount of starting material” を参照。

9. ボルテックスで 10 秒間混和する。室温 (15 ~ 25°C) で 10 分間インキュベートを行なう。シェーカー付きインキュベーターでインキュベートするか、あるいは少なくとも 2 分間隔で 10 秒間ボルテックスしてインキュベートする。

注：RNA は安定化されているので、インキュベーション時間を延長しても、悪影響を与えることなく RNA 収量が増加することがあります。

10. 適切な量の Buffer RLT を添加する (表 7 参照)。ボルテックスを 5 ~ 10 秒間激しく行なう。

注：使用前に β -メルカプトエタノールを Buffer RLT に添加します。15 ページの “実験を始める前の重要事項” を参照してください。

ペレットが完全に Buffer RLT に懸濁したことを確認してください。

11. ステップ 2 で準備した酸洗浄済みガラスビーズが入っているセーフロックチューブ (2 ml) に懸濁液を入れる。TissueLyser を用いて最高速度で 5 分間細胞破砕する。

他の機械的破砕法も使えますが、QIAGEN は TissueLyser の使用を推奨します。

12. 最高速度で 10 秒間遠心操作を行なう。上清 (RNeasy Mini 用は 760 μ l、RNeasy Midi 用は 1,670 μ l) を新しいチューブ (別途準備) に入れる。

13. 適切な量のエタノール (80%) を上清に添加する (表 7 参照)。ピペッティング (RNeasy Mini) あるいは激しく振盪 (RNeasy Midi) して混和する。遠心操作は行なわない。

エタノール添加後に沈殿物を形成することがありますが、これは RNeasy 調製には影響しません。

14. RNeasy Mini Kit を用いる場合はプロトコール 7 へ進む。RNeasy Midi Kit を用いる場合はプロトコール 8 へ進む。

プロトコール 6: 固体培地で培養したバクテリアの破碎

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英語版 Handbook 38 ページの Appendix A をお読みください。
- この実験の全てのステップは中断せずに室温(15 ~ 25℃)で行なってください。
- RNA 精製に RNeasy Kits を使用する場合は、英語版 Handbook 13 ページおよび 14 ページの “Determining the correct amount of starting material” と “Quantifying bacterial cells” をお読みください。スタートサンプルの量に応じて RNeasy Mini Kit と RNeasy Midi Kit のどちらを使用するかお選びください。
- 本プロトコールでは菌種に対してユーザーが至適化を行なう必要があります。
- 菌種によってはプロトコール 6 の後でプロトコール 1、2、4、5 のいずれかを行ないます。
- 安定化ミックスを調製するために培養液あるいは PBS が必要です。

操作手順

1. **200 μ l** の新鮮な一晚培養液を滅菌済みスプレッターで寒天プレート (直径 9 cm) に接種する。
2. 寒天プレートをインキュベートする。
温度と培養時間はユーザーが決めてください。
3. **2 容量の RNAprotect Bacteria Reagent** と **500 ~ 1,000 μ l** の培養液あるいは PBS を混和して安定化用ミックスを調製する。
4. 安定化用ミックスを寒天プレートに入れる。
5. 滅菌済みスプレッターを用いて慎重に菌叢を取り出す。バクテリア懸濁液をチューブにピペットで入れる。すぐにボルテックスで 5 秒間混和し、室温 (15 ~ 25℃) で 5 分間インキュベートする。
注: RNA 収量が減るので寒天片が混入しないようにします。
6. **5,000 x g** で 10 分間遠心操作する。
7. 上清を棄てる。ペーパータオルの上で遠心チューブを逆さまにして軽く叩いて、残った上清を除去する。
8. 菌種に従ってプロトコール 1、2、4、5 を行なう。
200 μ l 以上のリゾチーム含有 TE バッファーを使用します。リゾチーム濃度、proteinase K のニーズ、Buffer RLT およびエタノールの量はどのプロトコールを使用するかにより異なります。

プロトコル 7: RNeasy Mini Kit を用いたバクテリア・ライセートからのトータル RNA 精製

実験を始める前の重要事項

- プロトコル 7 を始める前にプロトコル 1 ~ 6 のいずれかの方法を行ないます。

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。初めて使用する際には、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。

操作手順

1. 最高 700 μ l のライセート (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) にセットした RNeasy Mini 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。フロースルーを棄てる*。コレクションチューブはステップ 2 で再使用する。

ライセートが 700 μ l を超える場合は、残りの溶液を続けてスピnc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、フロースルーを棄てます*。

オプション: RNA 精製におけるカラム上での簡便な DNase 分解用に QIAGEN RNase-Free DNase Set をお届けしています。RNeasy シリカメンブレン・テクノロジーは DNase 処理なしにほとんどの DNA を効率的に除去するため、DNase 分解は通常必要ありません。しかし、非常に微量な DNA にも敏感なある種の RNA アプリケーションの際には、完全な DNA 除去が必要な場合があります (例; 少量しか発現していないターゲットの RT-PCR 解析)。RNase-Free DNase Set をご使用になる場合は、このステップに続いて Appendix B (英語版 Handbook 40 ページ) のステップに進んでください。

2. 700 μ l の Buffer RW1 を RNeasy Mini Spin Column に添加する。蓋を静かに閉め、スピncラム・メンブレンを洗浄するために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルーとコレクションチューブを捨てる*。

カラム上で DNase 分解 (Handbook 40 ページ、Appendix B) をオプションで行なう際は、このステップを省略してください。

* フロースルー液は Buffer RLT や Buffer RW1 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 7 ページをご覧ください。

3. **RNeasy Mini Spin Column** を新しい 2 ml のコレクションチューブ（キットに同梱）に移す。500 μ l の **Buffer RPE** を **RNeasy Mini Spin Column** に添加する。蓋を静かに閉め、スピncラム・メンブレンを洗浄するために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルーを棄てる。コレクションチューブはステップ 4 で再使用する。

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（19 ページの“実験を始める前の準備事項”を参照）。

4. 500 μ l の **Buffer RPE** を **RNeasy Mini Spin Column** に添加する。蓋を静かに閉め、スピncラム・メンブレンを洗浄するために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心する。

この遠心操作により、ステップ 5 での溶出の際のエタノールのキャリーオーバーを防ぐことができます（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）。

注：遠心操作後、RNeasy Mini Spin Column がフロースルー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出します。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。

オプション：RNeasy Mini Spin Column を新しい 2 ml コレクションチューブ（別途準備）に移し、フロースルーの入った古いコレクションチューブを捨てる。最高速度で 1 分間遠心操作を行なう。

5. **RNeasy Mini Spin Column** を新しい 1.5 ml のコレクションチューブ（キットに同梱）に移す。30 ~ 50 μ l の **RNase フリー水** を直接スピnc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。
6. 予想した **RNA** 量が 30 μ g を超える場合には、さらに 30 ~ 50 μ l の **RNase フリー水** を用いるかステップ 5 での溶出液を用いて（高濃度の **RNA** が必要な場合）、ステップ 5 を再度行なう。ステップ 5 のコレクションチューブを再使用する。
ステップ 5 の溶出液を用いた場合、**RNA** 収量は **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 8 : RNeasy Midi Kit を用いたバクテリア・ライセートからの RNA 精製

実験を始める前の重要事項

- プロトコール 8 を始める前に、プロトコール 1 ~ 6 のいずれかを行ないます。

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。初めて使用する際には、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。

操作手順

1. 最高 4 ml のライセート (形成した沈殿物を含む) を、15 ml コレクションチューブ (キットに同梱) にセットした RNeasy Midi Spin Column にアプライする。蓋を静かに閉めて、**3,000 ~ 5,000 x g** で 5 分間遠心操作する。フロースルーを棄てる*。コレクションチューブはステップ 2 で再使用する。

最大量のスタートサンプルを用いる場合には、遠心時間を 10 分まで伸ばして、ライセートがカラムを完全に通過するようにしてください。

ライセートが 4 ml を超える場合は、残りの溶液を続けてスピ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、フロースルーを棄てます*。

オプション: RNA 精製におけるカラム上での簡便な DNase 分解用に QIAGEN RNase-Free DNase Set をお届けしています。RNeasy シリカメンブレン・テクノロジーは DNase 処理なしにほとんどの DNA を効率的に除去するため、DNase 分解は通常必要ありません。しかし、非常に微量な DNA にも敏感なある種の RNA アプリケーションの際には、完全な DNA 除去が必要な場合があります (例; 少量しか発現していないターゲットの RT-PCR 解析)。RNase-Free DNase Set をご使用になる場合は、このステップに続いて Appendix B (英語版 Handbook 40 ページ) のステップに進んでください。

2. 4 ml の Buffer RW1 を RNeasy Midi Spin Column に添加する。蓋を静かに閉めて、**3,000 ~ 5,000 x g** で 5 分間遠心し、スピнкаラム・メンブレンを洗浄する。フロースルーを棄てる*。コレクションチューブはステップ 3 で再使用する。カラム上で DNase 分解 (Handbook 40 ページ、Appendix B) をオプションで行なう際はこのステップを省略してください。

* フロースルー液は Buffer RLT や Buffer RW1 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 7 ページをご覧ください。

3. 2.5 mlのBuffer RPEをRNeasy Midi Spin Columnに添加する。蓋を静かに閉めて、3,000 ~ 5,000 x gで2分間遠心し、スピнкаラム・メンブレンを洗淨する。フロースルーを棄てる。コレクションチューブはステップ4で再使用する。
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(21ページの“実験を始める前の準備事項”を参照)。
4. 2.5 mlのBuffer RPEをRNeasy Midi Spin Columnに添加する。蓋を静かに閉めて、3,000 ~ 5,000 x gで5分間遠心し、スピнкаラム・メンブレンを洗淨する。
この遠心操作により、ステップ5での溶出の際のエタノールのキャリーオーバーを防ぐことができます(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)。
注：遠心操作後、RNeasy Midi Spin Columnがフロースルー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出します。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。
5. RNeasy Midi Spin Columnを新しい15 mlのコレクションチューブ(キットに同梱)に移す。適切な量のRNaseフリー水(表8)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1分間放置し、その後3,000 ~ 5,000 x gで3分間遠心操作を行ない、RNAを溶出する。

表 8. RNeasy Midi Spin ColumnからのRNA溶出に使用するRNaseフリー水の量

予想されるトータルRNA収量	RNaseフリー水
≤150 µg	150 µl
150 µg ~ 1 mg	250 µl

6. さらにRNaseフリー水あるいはステップ5の溶出液(高濃度のRNAが必要な場合)を用いてステップ5を再度行なう。ステップ5のコレクションチューブを再使用する。
ステップ5の溶出液を用いた場合、RNA収量は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。

トラブルシューティング

コメント

Buffer RLT 添加後、ライセートが微粒子を含んでいる

- a) 細胞ペレットが完全に再懸濁されていない Buffer RLT の添加後、ライセートを遠心分離して、上清のみを次のステップに用いる。2 ml 以下のチューブを用いる場合には、マイクロ遠心機を用いて最高速度で 2 分間で遠心操作を行なう。2 ml より大きいチューブを用いる場合には、3,000 ~ 5,000 x g で 5 分間遠心操作する。
- b) RNAprotect Bacteria Reagent とバクテリア培養液の遠心操作後の溶液除去が不完全 次の操作のために、関連したプロトコール（プロトコール 1 ~ 6）に記述されているように、ペーパータオルの上にチューブを逆さまにして軽く叩いて上清（RNAprotect Bacteria Reagent と培養液上清の組み合わせ）を除去する。
- c) スタートサンプル量が多すぎる 正確な量のスタートサンプルを用いて、操作を繰り返す（英語版 Handbook 13 ページ、“Determining the correct amount of starting material” を参照）。

RNeasy スピンカラムが目詰まり

- a) RNAprotect Bacteria Reagent とバクテリア培養液の遠心操作後の溶液除去が不完全 次の操作のために、関連したプロトコール（プロトコール 1 ~ 6）に記述されているように、ペーパータオルの上にチューブを逆さまにして軽く叩いて上清（RNAprotect Bacteria Reagent と培養液上清の組み合わせ）を除去する。
- 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（英語版 Handbook 13 ページ、“Determining the correct amount of starting material” を参照）。

コメント

RNA 収量が低い

- a) スタートサンプル量の計算が不正確 正確な量のスタートサンプルを用いて、操作を繰り返す（英語版 Handbook 13 ページ、“Determining the correct amount of starting material” を参照）。
- b) 細胞壁破砕が不完全 リゾチームを用いて細胞壁を分解する際は、リゾチーム濃度および分解時間を最適化することが必要なのことがある。
酵素による分解を用いる際には、菌種によってはリゾチーム以外の酵素が必要な場合がある。酵素濃度あるいは分解反応の時間を増やす。分解時間の増加は RNA の安定性に影響しない。
機械的な破砕を用いる場合には、破砕ステップの時間を増やしてみる。
安定化した細胞の凍結融解は細胞壁の破砕を容易にし、細胞ペレットの再懸濁を容易にする。
- c) バクテリア細胞のペレットの再懸濁が不完全 円錐型のチューブを用いた際、激しくボルテックスして、ペレットを再懸濁させる。
安定化した細胞の冷凍・解凍は細胞壁の破砕を容易にし、細胞ペレットの再懸濁を容易にする。
バクテリアをペレット化する際の遠心力を $2,000 \times g$ に減らしてみる。しかし、培養液の容量、バクテリア細胞の密度および培養液の密度により、完全に沈殿しない可能性がある。
- d) 細胞が対数増殖期を過ぎている 最高の RNA 収量と効率的な RNA 安定化を行なうために、対数増殖期にある細胞を回収する。

注：RNeasy Mini Handbook（日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）あるいは RNeasy Midi/Maxi Handbook の Troubleshooting を参照する。

Trademarks: QIAGEN®, RNAprotect®, RNeasy® (QIAGEN Group).

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。

© 2001–2011 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

