

RNeasy® Plus Universal

プロトコールとトラブルシューティング

RNeasy Plus Universal Mini Kit

RNeasy Plus Universal Midi Kit

すべてのタイプの組織からのトータル RNA 精製

目次	ページ
プロトコール	
RNeasy Plus Universal Mini Kit を用いたトータル RNA 精製	2
RNeasy Plus Universal Midi Kit を用いたトータル RNA 精製	8
トラブルシューティング	13



プロトコール：RNeasy Plus Universal Mini Kit を用いた トータル RNA 精製

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、正しい組織量を使用することが重要です。RNeasy Plus Universal Mini Kit を用いると、通常 50 mg までの組織を処理できます。この組織量は、RNeasy Mini Spin Column の RNA 結合容量と QIAzol® Lysis Reagent の溶解容量を超えません。脳あるいは脂肪組織では、100 mg までの組織を通常処理できます。肝臓、脾臓、胸腺など RNA 含有量の高い組織に関しては、最高の RNA 収量を得るため、またスピнкаラムへの RNA 結合容量を超えないために、30 mg 以下の組織を使用することを推奨します。様々な組織からの RNA 平均収量を Table 2 に掲載しています（英語版 Handbook 13 ページ）。

お客様がご使用になるスタートサンプルの特性に関して情報が得られない場合は、30 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 100 mg 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。

組織の重量測定がスタートサンプルを一番正確に定量できる方法です。一般的に、一辺が 4 mm の立方体（64 mm³）の動物組織の重量は 70 ~ 85 mg です。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Plus Universal 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。
- RNA を初めて調製する場合には Appendix A（英語版 Handbook 31 ページ）をお読みください。
- TissueRuptor™あるいは Tissuelyser システムを使用する場合には、これらのユーザーマニュアル（一部、日本語版あり）および Handbook（一部、日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり）を参照にして操作してください。
- 長期保存（数ヶ月間）用に組織を凍結する場合は、液体窒素中で瞬間凍結し、即座に -70°C で保存します。QIAzol Lysis Reagent 中で組織を破砕する前の重量測定や取り扱いの際に組織を解凍しないでください。ステップ 3 でホモジナイズした組織ライセートも -70°C で数ヶ月間保存できます。ステップ 4 を行なう前に、凍結したライセートを 37°C のウォーターバスで完全に解凍し、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。

- QIAzol, gDNA Eliminator Solution、RNeasy テクノロジーを組み合わせた精製法は DNase 処理なしにほとんどのゲノム DNA を効果的に除去できるため、通常、DNase 分解は不要です。また、2 ステップリアルタイム RT-PCR を行なう場合、cDNA 合成の際にゲノム DNA 除去を組み込んだ QuantiTect® Reverse Transcription Kit を用いて DNA 除去を行なうことができます（英語版 Handbook 42 ページの “ordering information” 参照）。
- QIAzol Lysis Reagent と Buffer RWT 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。
- 液層の分離（ステップ 8）以外、全てのプロトコールステップおよび遠心操作は室温（15 ~ 25°C）で行ないます。操作は迅速に行なってください。

実験開始前の準備事項

- Buffer RWT は濃縮液でお届けします。初めて使用する際には、ボトルに記載されているように 2 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。
- Buffer RPE は濃縮液でお届けします。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. **TissueLyser システムを使用する場合には、2 ml のマイクロ遠心チューブ（別途準備）に直径 5 mm のステンレススチール製ビーズ 1 個を入れる。RNA_{later}® あるいは Allprotect Reagent で安定化していない組織を取り扱う場合は、チューブをドライアイス上にセットする。**

注：TissueLyser LT を用いて破碎されにくいサンプルを破碎する場合、7 mm のステンレススチール製ビーズを 1 個か 2 個使用することを推奨します。

2. **動物から組織サンプルを切除、あるいは保存していた組織を使用。使用する組織量を測定する。50 mg 以下の組織あるいは 100 mg 以下の脳/脂肪組織を使用する。すぐにステップ 3 に進む。**

組織の重量測定がスタートサンプルを一番正確に定量できる方法です。

組織を RNA_{later} あるいは Allprotect Reagent 中に保存していた場合は、ピンセットで試薬から組織を取り出し、過剰な試薬あるいは保存中に生じた結晶を確実に除去します。

組織を RNA_{later} または Allprotect Reagent で処理、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 は安定化されていません。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。一連の操作はできるだけ迅速に行なってください。

3. TissueRupter (ステップ 3a)、Tissuelyser LT (ステップ 3b)、Tissuelyser II (ステップ 3c) を用いて、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に関する詳細は英語版 Handbook 14 ページの “Disrupting and homogenizing starting material” を参照ください。

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。TissueRupter や Tissuelyser システムを用いたホモジナイゼーションの方が他の方法より RNA 収量が増加します。

3a. TissueRupter を用いた破碎およびホモジナイゼーション

- 900 μ l の QIAzol Lysis Reagent が入った適切な大きさの容器に組織を入れる。

注：ホモジナイゼーション中に泡が生じる可能性があるため、十分な容量を持つ最適な大きさの容器を使用します。

一般的にコニカルチューブよりも丸底チューブの方が効率的に破碎やホモジナイズを行なえます。

- TissueRupter のディスパーザブルプローブの先端を容器に入れて、ライセートが均一になるまで TissueRupter を最高速度で操作する (通常 20 ~ 40 秒)。ステップ 4 に進む。

注：操作中に TissueRupter とディスパーザブルプローブの損傷を避けるため、プローブの先端がバッファ中に入ったままの状態ですべて操作してください。

ホモジナイゼーションの際に (特に脳組織) 泡が形成されることがあります。この場合は、ホモジネートを室温 (15 ~ 25°C) で 2 ~ 3 分間放置し、泡が消えてから次のプロトコールステップに進みます。

3b. Tissuelyser LT を用いた破碎およびホモジナイゼーション

- ステップ 1 で準備したチューブをドライアイス上に 15 分間以上保冷する (しかし Tissuelyser LT Adapter のインサートは室温で保管する)。その後、組織をチューブに入れ、チューブをドライアイス上でさらに 15 分間保冷する。

RNAlater あるいは Allprotect Reagent で安定化した組織を取り扱う場合は、チューブをドライアイス上で保冷する必要はありません。

- Tissuelyser LT Adapter のインサートにチューブを入れて、室温で 2 分間インキュベートする。チューブあたり 900 μ l の QIAzol Lysis Reagent を即座に添加する。

凍結組織が解凍し RNA 分解の要因になるので、2 分間以上のインキュベートは行わないでください。

- Tissuelyser LT Adapter にチューブをセットする。

- **TissueLyser LT** で **50 Hz**、**2 ～ 5 分間** 破碎する。

操作時間は組織により異なりますが、組織が完全にホモジナイズされるまで破碎時間を延長できます。

- ライセートを新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで静かに入れる。ステップ 4 に進む。

ステンレススチール製ビーズを再使用しないでください。

3c. **TissueLyser II** を用いた破碎およびホモジナイゼーション

- ステップ 1 で準備したチューブに組織を入れる。

- チューブをドライアイス上で保冷した場合は、これを室温に置く。チューブあたり **900 µl** の **QIAzol Lysis Reagent** を即座に添加する。

- **TissueLyser Adapter Set 2 x 24** にチューブを入れる。

- **TissueLyser II** にセットして **20 Hz** で **2 分間** 破碎する。

操作時間は組織により異なりますが、組織が完全にホモジナイズされるまで破碎時間を延長できます。

- アダプターセットを外して、**TissueLyser II** に一番近いチューブが一番遠くなるようにチューブのラックを回転し、アダプターセットをもう一度組み立てる。**TissueLyser II** にセットしを **20 Hz** でさらに **2 分間** 破碎する。

チューブの配置を換えることにより、均一なホモジナイゼーションが行なえます。

- ライセートを新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで静かに入れる。ステップ 4 に進む。

ステンレススチール製ビーズを再使用しないでください。

4. ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に室温（**15 ～ 25℃**）で **5 分間** 放置する。

このステップは核タンパク質コンプレックスの解離を促進します。

5. **100 µl** の **gDNA Eliminator Solution** を添加する。ホモジネートの入ったチューブをしっかりと閉め、**15 秒間** 激しく振盪する。

gDNA Eliminator Solution は水層でのゲノム DNA のコンタミを効率的に抑えるために、追加の **DNase** 処理は不要です。

6. **180 µl** のクロロホルムを添加する。ホモジネートの入ったチューブをしっかりと閉め、**15 秒間** 激しく振盪する。

完全に混合することは次のステップで液層を分離するために重要です。

7. ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に室温で **2 ～ 3 分間** 放置する。

8. 4℃、12,000 x g で 15 分間遠心する。同じ遠心機を次の遠心操作ステップに使用する場合には、この操作の後に遠心機を室温 (15 ~ 25℃) にセットする。遠心後にサンプル溶液は 3 つの層に分かれます：上層の無色で RNA を含む水層；白色の中間層；一番下の赤い有機溶媒層。脂肪含有量が特に高い組織では、赤い有機溶媒層の下にさらに透明な層が見られることがあります。水層の容量は約 600 µl です。
9. 上部の水層 (通常 600 µl) を新しいマイクロ遠心チューブ (別途準備) に移す。
10. 1 容量の 70% エタノール (通常 600 µl) を添加し、ピペットによる吸排出を繰り返して完全に混和する。遠心操作は行なわない。すぐにステップ 11 に進む。
注：ホモジナイゼーションと遠心操作中のロスにより、ライセートは 600 µl よりも少ないことがあります。
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。沈殿物を激しく振盪させて完全に再懸濁し、すぐにステップ 11 に進みます。
11. 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 Mini Spin Column に 700 µl までのサンプルをアプライする。蓋を静かに閉めて、室温 (15 ~ 25℃) で、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 12 で再使用します。
12. サンプルの残りをを用いてステップ 11 を繰り返す。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 13 で再使用します。
13. RNeasy スピнкаラムに 700 µl の Buffer RWT を添加する。蓋を静かに閉め、洗浄のために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる*。
コレクションチューブはステップ 14 で再使用します。
遠心操作後、RNeasy スピнка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出します。コレクションチューブを完全に空にします*。
注：Buffer RWT は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールを Buffer RWT に添加したことを確認します (3 ページの“実験を始める前の準備事項”を参照)。

* フロースルー液は QIAzol Lysis Reagent または Buffer RWT 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。

14. **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、洗浄のために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心する。フロースルー液を棄てる。**

コレクションチューブはステップ 15 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 (3 ページの“実験を始める前の準備事項”を参照)。

15. **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、洗浄のために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心する。**

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阻害することがあります。

注：遠心操作後、RNeasy スピнка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。

16. **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 (キットに同梱) に移し、フロースルー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 15 の後で RNeasy スピнкаラムの外側にフロースルー液が残っている場合はこのステップを行ないます。

17. **RNeasy スピнкаラムを新しい 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 フリー水をスピнкаラム・メンブレンに直接添加する。蓋を静かに閉る。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。**

18. **さらに RNase フリー水あるいはステップ 17 の溶出液 (高濃度の RNA が必要な場合) を用いてステップ 17 を再度行なう。ステップ 17 のコレクションチューブに溶出する。**

ステップ 17 の溶出液を用いた場合、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。最終濃度は高くなります。

プロトコール：RNeasy Plus Universal Midi Kit を用いた トータル RNA 精製

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、正しい組織量を使用することが重要です。RNeasy Plus Universal Midi Kit を用いると、通常 250 mg までの組織を処理できます。この組織量は、RNeasy Midi Spin Column の RNA 結合容量と QIAzol Lysis Reagent の溶解容量を超えません。脳あるいは脂肪組織では、500 mg までの組織を通常処理できます。肝臓、脾臓、胸腺など RNA 含有量の高い組織に関しては、最高の RNA 収量を得るため、またスピнкаラムへの RNA 結合容量を超えないために、150 mg 以下の組織を使用することを推奨します。様々な組織からの RNA 平均収量を Table 2 に掲載しています（英語版 Handbook 13 ページ）。

お客様がご使用になるスタートサンプルの特性に関して情報が得られない場合は、150 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 500 mg 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。

組織の重量測定がスタートサンプルを一番正確に定量できる方法です。一般的に、一辺が 6 mm の立方体（216 mm³）の動物組織の重量は 240 ~ 280 mg です。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Plus Universal 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。
- RNA を初めて調製する場合には Appendix A（英語版 Handbook 31 ページ）をお読みください。
- 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）を参照にして操作してください。
- 長期保存（数ヶ月間）用に組織を凍結する場合は、液体窒素中で瞬間凍結し、即座に -70℃ で保存します。QIAzol Lysis Reagent 中で組織を破砕する前の重量測定や取り扱いの際に組織を解凍しないでください。ステップ 3 でホモジナイズした組織ライセートも -70℃ で数ヶ月間保存できます。ステップ 4 を行なう前に、凍結したライセートを 37℃ のウォーターバスで完全に解凍し、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。

- QIAzol、gDNA Eliminator Solution、RNeasy テクノロジーを組み合わせた精製法は DNase 処理なしにほとんどのゲノム DNA を効果的に除去できるため、通常 DNase 分解は不要です。また、2 ステップリアルタイム RT-PCR を行なう場合、cDNA 合成の際にゲノム DNA 除去を組み込んだ QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて DNA 除去を行なうことができます（英語版 Handbook 42 ページの “ordering information” 参照）。
- QIAzol Lysis Reagent と Buffer RWT 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。
- 液層の分離（ステップ 8）以外、全てのプロトコールステップおよび遠心操作は室温（15 ~ 25°C）で行ないます。操作は迅速に行なってください。

実験開始前の準備事項

- Buffer RWT は濃縮液でお届けします。初めて使用する際には、ボトルに記載されているように 2 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。
- Buffer RPE は濃縮液でお届けします。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. 動物から組織サンプルを切除、あるいは保存していた組織を使用。使用する組織量を測定する。250 mg 以下の組織あるいは 500 mg 以下の脳／脂肪組織を使用する。すぐにステップ 2 に進む。

組織の重量測定がスタートサンプルを一番正確に定量できる方法です。

組織を RNAlater あるいは Allprotect Reagent 中に保存していた場合は、ピンセットで試薬から組織を取り出し、過剰な試薬あるいは保存中に生じた結晶を確実に除去します。

組織を RNAlater または Allprotect Reagent で処理、瞬間凍結、あるいはステップ 3 で破砕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 は安定化されていません。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。一連の操作はできるだけ迅速に行なってください。

2. 5 ml の QIAzol Lysis Reagent が入った適切な大きさの容器に組織を入れる。

注：ホモジナイゼーション中に泡が生じる可能性があるため、十分な容量を持つ最適な大きさの容器を使用します。

一般的にコニカルチューブよりも丸底チューブの方が効率的に破砕やホモジナイゼーションを行なえます。

3. **TissueRuptor** のディスプレイブルプローブの先端を容器に入れて、ライセートが均一になるまで最高速度で操作する（通常 30 ~ 60 秒）。

注：操作中に TissueRuptor とディスプレイブルプローブの損傷を避けるため、プローブの先端がバッファー中に入ったままの状態ですべて操作してください。

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。

ホモジナイゼーションの際に（特に脳組織）泡が形成されることがあります。この場合は、ホモジネートを室温で 2 ~ 3 分間放置し、泡が消えてから次のプロトコールステップに進みます。
4. ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に室温（15 ~ 25℃）で 5 分間放置する。

このステップは核タンパク質コンプレックスの解離を促進します。
5. 500 μ l の **gDNA Eliminator Solution** を添加する。ホモジネートの入ったチューブをしっかり閉め、15 秒間激しく振盪する。

gDNA Eliminator Solution は水層でのゲノム DNA のコンタミを効率的に抑えるために、追加の DNase 処理は不要です。
6. 1 ml のクロロホルムを添加する。ホモジネートの入ったチューブをしっかり閉め、15 秒間激しく振盪する。

完全に混合することは次のステップで液層を分離するために重要です。
7. ホモジネート溶液が入ったチューブを実験台上に室温で 2 ~ 3 分間放置する。
8. 4℃、5,000 \times g で 15 分間遠心する。同じ遠心機を次の遠心操作ステップに使用する場合には、この操作の後に遠心機を室温（15 ~ 25℃）にセットする。

遠心後にサンプル溶液は 3 つの層に分かれます：上層の無色で RNA を含む水層；白色の中間層；一番下の赤い有機溶媒層。脂肪含有量が特に高い組織では、赤い有機溶媒層の下にさらに透明な層が見られることがあります。水層の容量は約 3 ml です。
9. 上部の水層を新しいチューブ（別途準備）に移す。
10. 等量（通常 3 ml）の 70%エタノールを添加し、ボルテックスで十分に混和する。遠心操作は行わない。すぐにステップ 11 に進む。

注：ホモジナイゼーションと遠心操作中のロスにより、ライセートは 3 ml よりも少ないことがあります。

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。沈殿物を激しく振盪させて完全に再懸濁し、すぐにステップ 11 に進む。
11. 15 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 Midi Spin Column** に 4 ml までのサンプルをアプライする。蓋を静かに閉めて、室温（15 ~ 25℃）、3,000 ~ 5,000 \times g で 5 分間遠心する。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 12 で再使用します。

12. サンプルの残り (4 ml まで) を用いてステップ 11 を繰り返す。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 13 で再使用します。

13. RNeasy スピнкаラムに 4 ml の Buffer RWT を添加する。蓋を静かに閉めて、3,000 ~ 5,000 x g で 5 分間遠心し、メンブレンを洗浄する。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 14 で再使用します。

注：Buffer RWT は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールを Buffer RWT 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)。

14. RNeasy スピнкаラムに 2.5 ml の Buffer RPE を添加する。蓋を静かに閉めて、3,000 ~ 5,000 x g で 2 分間遠心し、メンブレンを洗浄する。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 15 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 (9 ページの“実験を始める前の準備事項”を参照)。

15. RNeasy スピнкаラムに 2.5 ml の Buffer RPE を添加する。蓋を静かに閉めて、3,000 ~ 5,000 x g で 5 分間遠心し、メンブレンを洗浄する。

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阻害することがあります。

注：遠心操作後、RNeasy スピнка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。

16. RNeasy スピнкаラムを新しい 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 3) を RNeasy スピнкаラム・メンブレンに直接ピペットで添加する。蓋を静かに閉める。1 分間放置した後、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 3. RNA 溶出用 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

* フロースルー液は QIAzol Lysis Reagent または Buffer RWT 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。

17. さらに RNase フリー水あるいはステップ 16 の溶出液（高濃度の RNA が必要な場合）を用いてステップ 16 を再度行なう。ステップ 16 のコレクションチューブに溶出する。

ステップ 16 の溶出液を用いた場合、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、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

液層が完璧に分離しない

- a) クロロホルムを添加しなかった、あるいはクロロホルムに不純物が混入
イソアミルアルコールや他の不純物を含まないクロロホルムを添加したことを確認する。
- b) 遠心する前のホモジネートの混和が不十分
クロロホルム添加後（ステップ6）のホモジネートは激しく振盪しなければならない。液層が明確に分離していない場合には、チューブを少なくとも15秒間激しく振盪し、ステップ7と8のインキュベーションと遠心操作を繰り返す。
- c) RNA 精製に使用したサンプルが有機溶媒を含む
スタートサンプルが有機溶媒（例えばエタノール、DMSO）、強力なバッファー、あるいはアルカリ試薬を含んでいないことを確認する。これらは液層分離を妨害する。

RNeasy スピнкаラムが目詰まり

- a) 破碎および／あるいは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に関しては“Disrupting and homogenizing starting materials”（英語版 Handbook 14 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（2または8ページのプロトコール、および英語版 Handbook 12 ページ参照）。またはホモジナイゼーション時間を延長する。
- 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。正確な量のスタートサンプルを用いることは重要（2または8ページのプロトコール、および英語版 Handbook 12 ページ参照）。
- c) 遠心温度が低すぎる
液層の分離（ステップ8）以外、すべての遠心操作は15～25℃で行なう。20℃に設定しても20℃以下に冷却される遠心機もある。これが沈殿物を形成しRNeasy スピнкаラムの目詰りをおこす原因となる。このような場合は遠心温度を25℃に設定する。RNeasy スピнка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。

コメント

RNA の収量が低い

- a) 破碎と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に関しては“Disrupting and homogenizing starting materials”（英語版 Handbook 14 ページ）を参照する。
- 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。正確な量のスタートサンプルを用いることは重要（2 または 8 ページのプロトコール、および英語版 Handbook 12 ページ参照）。
- c) RNA がスピнкаラムメンブレンに結合したまま
RNA 溶出を再度行なうか、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。
- d) 遠心操作時の温度が低すぎる
液層の分離（ステップ 8）以外、すべての遠心操作は 15 ~ 25℃で行なう。20℃に設定しても 20℃以下に冷却される遠心機もある。これが沈殿物を形成し RNeasy スピнкаラムの目詰りをおこす原因となる。このような場合は遠心温度を 25℃に設定する。RNeasy スピнка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 収量が低いあるいは皆無（RNeasy Plus Universal Mini Kit）

RNase フリー水の
添加が不適切

RNase フリー水を RNeasy スピнкаラム・メンブレンの中央にアプライし、完全にメンブレンを覆うようにする。

A_{260}/A_{280} 値が低い

- a) ホモジナイゼーションに使用した QIAzol Lysis Reagent 量が不十分
次回の精製でスタートサンプル量を減らす、QIAzol Lysis Reagent 量とホモジナイゼーション時間を増加する。
- b) ホモジナイゼーション後にサンプルを 5 分間インキュベートしなかった
プロトコール（ステップ 4）に記載してあるようにホモジナイゼーション後にサンプルを室温（15 ~ 25℃）で 5 分間置く。このステップは核タンパク質コンプレックスの解離を促進する。
- c) 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 33 ページ、Appendix B を参照）。

RNA が分解

- a) スタートサンプルの不適切な取り扱い 凍結組織サンプルでは液体窒素中で即座に瞬間凍結し、 -70°C で適切に保存する。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 31 ページ）および“Handling and storage of starting material”（英語版 Handbook 13 ページ）を参照。
- b) RNase の混入 全ての RNeasy バッファーは試験済みで RNase フリーであることが保証されているが、RNase は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 31 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) 液層分離の際に温度が高すぎた 最適な液層分離と水層からゲノム DNA を除去するためには液層分離（ステップ 8）を 4°C で行なわなければならない。遠心操作中に遠心機が 10°C を越えないように注意する。
- b) 水層に中間層が混入 水層に中間層が混入すると、RNA 溶出液中の DNA 含有量が増加する。必ず中間層が混入しないように水層を移す。
- c) ホモジナイゼーションに使用した QIAzol lysis Reagent 量が不十分 次回の精製でスタートサンプル量を減らす、あるいは QIAzol lysis Reagent 量とホモジナイゼーション時間を増加する。
- d) RNA 精製に使用したサンプルが有機溶媒を含む スタートサンプルが有機溶媒（例えばエタノール、DMSO）、強力なバッファー、あるいはアルカリ試薬を含んでいないことを確認する。これらは液層分離を妨害する。

コメント

- e) 液層分離を行なう前に gDNA Eliminator Solution を添加していない
次の精製には適切な量の gDNA Eliminator Solution を添加する。
- f) ライセートとクロロホルムをボルテックスで混和した
激しく振盪することによりライセートとクロロホルムを混和する。チューブをボルテックスしない。

RNA を用いたダウンストリームの実験で最適な結果が得られない

- a) 溶出の際に塩類がキャリアオーバー
Buffer RPE は必ず 20 ~ 30°C で使用する。
- 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 スピニングカラム・メンブレンを乾燥させるために、15 ~ 25°C、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間 (RNeasy Plus Universal Mini Kit、ステップ 15) あるいは 15 ~ 25°C、3,000 ~ 5,000 x g で 5 分間 (RNeasy Plus Universal Midi Kit、ステップ 14) 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出す。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る。

RNeasy Plus Universal Mini Kit でエタノール混入の可能性を完全に排除するため、プロトコールのステップ 16 に記載されているように RNeasy Mini Spin Column を新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、オプションで 1 分間の遠心操作をする。

— Memo —

Trademarks: QIAGEN®, QIAzol®, QuantiTect®, RNeasy®, TissueRuptor™ (QIAGEN Group).

"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.

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

