

# Allprotect Tissue Reagent

## プロトコールとトラブルシューティング

動物およびヒト組織中のDNA、RNA、タンパク質を  
即座に安定化した後、保存

目次	ページ
プロトコール	
採取した組織中のDNA、RNA、タンパク質の安定化	2
RNA、DNA/RNA、DNA/RNA/タンパク質を精製するための 安定化した組織の破碎とホモジナイゼーション	5
DNA精製のための安定化した組織の破碎とホモジナイゼーション	7
トータルタンパク質調製のための安定化した組織の 破碎とホモジナイゼーション	9
トラブルシューティング	11



# プロトコール：採取した組織中のDNA、RNA、タンパク質の安定化

本プロトコールは、Allprotect Tissue Reagentを用いた動物およびヒト組織の安定化と保存について記述しています。安定化した組織からQIAGENキットを用いてDNA、RNA、および／あるいはタンパク質を精製する際は、キットに添付のハンドブックを参照してください。

## 実験を始める前の重要事項

- 組織を効率的に安定化するために、常に組織を完全に**Allprotect Tissue Reagent**に沈めてください。詳細は、英語版 Handbook 9ページの“Important Notes”をお読みください。
- Allprotect Tissue Reagentは一回しか使用できません。再使用はしないでください。
- 新鮮で凍結されていない組織のみAllprotect Tissue Reagentを用いて安定化できます。既に凍結した組織ではこの試薬内での融解が遅すぎ、試薬が組織に迅速に浸潤しないため、核酸とタンパク質の分解を十分に防止することができません。

## 実験を始める前の準備事項

- Allprotect Tissue Reagentの容器の蓋を取り、Allprotect Reagent Pumpをねじ込みます。使用後即座にポンプを閉めて容器を密封し、乾燥した場所で上向きに保存します。本試薬は非常に粘性が高くピPETTINGが難しいために、ポンプの使用をお奨めします。

## 操作手順

1. 組織サンプルを切除する前に、**Allprotect Tissue Reagent**中で安定化するサンプルの容量（あるいは重量）を見積もる。
2. 組織サンプルを保存するために必要な**Allprotect Tissue Reagent**の量を決定する。少なくとも、組織サンプルの10倍量の試薬（10 mgの組織に対して約100  $\mu$ l）が必要である。**Allprotect Reagent Pump**を使用すると、最小限の試薬量をコレクション容器に分注できる。

注：Allprotect Tissue Reagentの中に組織片を完全に沈めます。詳細は、英語版 Handbook 9ページの“Important Notes”をお読みください。

反時計回りに回してポンプを開きます。使用後即座にポンプを時計回りに回して閉じます。ポンプを1回押すと約0.5 mlの試薬を分注できます。

注：使用中のAllprotect Tissue Reagentをその日初めて使う場合には、一回目にポンプを押して出てくる試薬は廃棄してください（ポンプ自体を初めて使用する場合には、試薬が残留していないため、この操作は不要です）。廃棄する試薬の量を考慮して、容器には100 ml以上の試薬が入っています。

- 動物から組織サンプルを切除する。必要に応じてサンプルを0.5 cm以下にスライスする、あるいは直径5 mmのティッシュパンチを使用して適切なサイズに組織をカットする。このステップはできるだけ迅速に行ない、直ちにステップ4に進む。

注：核酸とタンパク質を効率的に安定化するために、組織サンプルの厚さは0.5 cm未満にします。ティッシュパンチは、適切なサイズの組織サンプルを得るための簡便な方法です。

- Allprotect Tissue Reagentが入っているコレクション容器（ステップ2）の中に組織片を完全に沈める。

ピンセットを使って組織片を移します。

注：組織サンプルを即座にAllprotect Tissue Reagentに浸して、DNA、RNA、タンパク質を保護します。

- Allprotect Tissue Reagent中に沈めた組織は、2～8℃では最高6ヶ月、15～25℃では最高7日間、37℃では最高1日保存できる。

-20℃での長期保存には、まず試薬中の組織を2～8℃で一晩インキュベートした後、試薬中の組織を-20℃で保存する。

-80℃での長期保存には、まず試薬中の組織を2～8℃で一晩インキュベートした後、組織を試薬から取り出して-80℃で保存する。

注：より低い温度の方がより長く保存できます（室温あるいは37℃の代わりに2～8℃、または長期保存には-20℃か-80℃）。SDS-PAGEやウエスタンブロットよりも感度の高いダウンストリーム・アプリケーションを用いてタンパク質解析を行なう場合には、低温度（2～8℃）で短期間の保存をお奨めします。また各タンパク質で保存条件の確認も併せてお奨めします。

Allprotect Tissue Reagent中の組織サンプルを輸送する際には、チューブを垂直に立てるか、試薬でチューブを完璧に充填することで、輸送中試薬にサンプルが浸っていることを確認してください。

- 保存後、QIAGENキットでDNA、RNA、および／あるいはタンパク質を精製する。

DNA、RNA、および／あるいはタンパク質の精製操作で破碎とホモジナイゼーションを行なう前に、Allprotect Tissue Reagentから組織をピンセットで取り出します。組織表面の過剰なAllprotect Tissue Reagentを取り除きます（ペーパータオルの上で組織を軽く叩くか転がす）。組織表面に残った微量の試薬は、DNA、RNA、および／あるいはタンパク質の精製操作や通常のダウンストリーム・アプリケーションには影響しません。

Allprotect Tissue Reagent中に保存したサンプルは-20℃で凍結しません。低温では試薬の粘性が高くなります。-20℃あるいは-80℃で保存したサンプルは、切除や重量測定前に室温に戻します。

最適な組織の破碎とホモジナイゼーションを行なうためには、TissueRuptorあるいはTissueLyserの使用をお奨めします。特にサンプルが大きい場合やTissueRuptorを使用する際は、安定化した組織は新鮮あるいは凍結した組織よりも硬いために、長い破碎時間が必要です。

Allprotect試薬で安定化した組織の破碎とホモジナイゼーションにTissueLyserを使用する場合のガイドラインは、5ページ（RNA、DNA/RNA、DNA/RNA/タンパク質精製用）、7ページ（DNA精製用）、9ページ（タンパク質調製用）のプロトコールに記載されています。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。安定化した組織からのDNA、RNA、および／あるいはタンパク質精製用プロトコールは、キットに添付されているHandbook（日本語プロトコールあり）に記載されています。

DNA、RNA、および／あるいはタンパク質の精製法と同様に、破碎およびホモジナイゼーションに他の方法も使用できますが、組織種類、溶解バッファー、何を精製するか、またダウンストリーム・アプリケーションにより、個々の至適化が必要です。このことはタンパク質を取り扱う際に特に重要です。

# プロトコール：RNA、DNA/RNA、DNA/RNA/タンパク質を精製するための安定化した組織の破碎とホモジナイゼーション

これは、RNeasy® Mini Kitを用いたRNA精製、AllPrep® DNA/RNA Mini Kitを用いたDNA/RNA精製、AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitを用いたDNA/RNA/タンパク質精製のために、Allprotectで安定化した組織をTissueLyserで破碎およびホモジナイズするためのプロトコールです。

## 実験を始める前の重要事項

- 初めてRNAを取り扱う際には、RNeasy Mini Handbook、AllPrep DNA/RNA Mini Handbook、AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Handbook（英語版）のAppendix Aにある“Safety Information”と“Important Notes”をよくお読みください。
- この実験の全てのステップは室温（15～25℃）で行なってください。操作は手早く進めてください。

## 実験を始める前の準備事項

- 使用前にβ-Mercaptoethanol（β-ME）\*をBuffer RLTまたはBuffer RLT Plusに添加します。1 mlのBuffer RLTまたはBuffer RLT Plusあたり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またはBuffer RLT Plusは室温（15～25℃）で1ヶ月間まで保存できます。
- 保存中にBuffer RLTまたはBuffer RLT Plusは沈殿物を形成することがあります。必要な際は温めて沈殿物を溶かした後、室温で使用してください。

## 操作手順

1. **600 μlのBuffer RLTまたはBuffer RLT Plusをマイクロ遠心チューブ（2 ml）に添加する。**

注：使用前にBuffer RLTまたはBuffer RLT Plusにβ-MEを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）。

2. チューブ当たり直径**5 mm**のステンレススチール製ビーズ**1個**を入れる。
3. ピンセットを用いて**Allprotect Tissue Reagent**で安定化した組織を溶液から取り出す。組織表面に残存する試薬を取り除く（例；組織をペーパータオル上で軽く叩くか、転がす）。

-20℃あるいは-80℃で保存した組織は、まず室温に戻します。

粘性が高いために微量の試薬が組織表面に残りますが、RNeasyまたはAllPrepを用いた精製には影響しません。

\* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS（material safety data sheet）をご覧ください。

4. 使用する組織サンプル量を決定する。RNeasyあるいはAllPrep Handbookで推奨されている量を使用する。

必要に応じて、組織を清潔な台上において適切な量をカットしてください。

組織の計量は、量を決める最も正確な方法です。ガイドラインとして、RNeasyまたはAllPrep 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）をご覧ください。

室温（15～25℃）でのカットや重量測定の間はAllprotectで安定化した組織中のDNA、RNA、タンパク質は保護されています。従って氷上やドライアイス、低温室で組織をカットする必要はありません。残った組織はAllprotect Tissue Reagent中で保存できます。また、既に安定化されていた組織はAllprotectに浸すことなくそのまま-80℃で保存できます。

5. 組織サンプルをステップ2のチューブに入れる。
6. TissueLyser Adapter Set 2 x 24にチューブを入れる。
7. TissueLyserにセットして25 Hzで2分間破碎する。

注：破碎時間は処理する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します。

注：不完全なホモジナイゼーションはDNAやRNA収量の著しい低下や、AllPrepおよびRNeasyスピнкаラムの目詰まりの原因になります。

注：長時間のホモジナイゼーション、また高速のホモジナイゼーションにより、DNAの断片化が起こります。

8. 内側のチューブを外側に、外側のチューブを内側に置き換える。TissueLyserにセットし25 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。

9. チューブ（ホモジネート液とビーズを含む）を最高速度で3分間遠心する。上清（清澄化ライセートなど）を新しいマイクロ遠心チューブにピペットで静かに入れる。

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。

10. RNeasy Mini Kitを用いたRNA精製、AllPrep DNA/RNA Mini Kitを用いたDNA/RNA精製、AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitを用いたDNA/RNA/タンパク質精製には清澄化ライセートを使用する。

RNeasyあるいはAllPrep Handbook（日本語プロトコールあり）の動物組織用プロトコールに従って操作します。RNeasy Mini Kitを使用する場合は、ライセートをRNeasyスピнкаラムにアプライする前にエタノールを添加します。AllPrep Kitを使用した場合は、ライセートをAllPrepスピнкаラムに直接アプライします。

# プロトコール：DNA精製のための安定化した組織の 破碎とホモジナイゼーション

これは、DNeasy® Blood & Tissue KitあるいはQIAamp® DNA Mini Kitを用いたDNA精製のために、Allprotectで安定化した組織をTissuelyserで破碎およびホモジナイズするためのプロトコールです。

## 実験を始める前の重要事項

- DNeasy Blood & Tissue KitあるいはQIAamp DNA Mini Kitに添付されている英語版 Handbookの“Safety Information”と“Important Notes”をよくお読みください。
- この実験の全てのステップは室温（15～25℃）で行なってください。

## 実験を始める前の準備事項

- Buffer ATLは保存中に沈殿物を形成することがあります。その際は、56℃で加熱して沈殿物を完全に溶かします。

## 操作手順

1. 2 mlのマイクロ遠心チューブ1本あたり、180 µlのBuffer ATLを添加する。
2. チューブあたり直径5 mmのステンレススチール製ビーズ1個を入れる。
3. ピンセットを用いてAllprotect Tissue Reagentで安定化した組織を溶液から取り出す。組織表面に残存する試薬を取り除く（例；組織をペーパータオル上で軽く叩くか、転がす）。

-20℃あるいは-80℃で保存したサンプルは、まず室温に戻します。

粘性が高いために微量の試薬が組織表面に残りますが、DNeasyあるいはQIAamp操作には影響しません。

4. 使用する組織サンプル量を決定する。10 mgの組織で実験を始めることを推奨。この量で十分な操作を行なえた場合、次の操作で最高25 mgまでの組織を使用できる。

必要に応じて、組織を清潔な台上に置いて適切な量をカットします。

組織の計量は、量を定める最も正確な方法です。

室温（15～25℃）でのカットや重量測定の間はAllprotectで安定化した組織中のDNA、RNA、タンパク質は保護されています。従って氷上やドライアイス、低温室で組織をカットする必要はありません。残った組織はAllprotect Tissue Reagent中で保存できます。また、既に安定化されていた組織はAllprotectに浸すことなくそのまま-80℃で保存できます。

5. 組織サンプルをステップ2のチューブに入れる。
6. Tissuelyser Adapter Set 2 x 24にチューブを入れる。

**7. TissueLyser にセットして 15 Hz で 20 秒間破碎する。**

注：長時間のホモジナイゼーション、また高速のホモジナイゼーションにより、DNAの断片化が起こります。

**8. チューブ（ホモジネート液とビーズを含む）のふたの内側についた水滴を除去するために、簡単に遠心操作をする。**

**9. 40  $\mu$ l の Proteinase K を添加後、ボルテックス操作して混和し、シェーカー付のインキュベーターで 56 °C、1 時間インキュベート（最高速度）し、組織を完全に溶解させる。**

溶解時間は使用する組織タイプにより変動します。通常、溶解は1時間で完了します。サンプルを振盪することにより溶解が促進され、その結果、溶解時間が短縮されインタクトなDNAの収量が増加します。

**10. チューブの蓋の内側に付いた水滴を除去するために、簡単に遠心操作をする。**

オプション：RNAフリーのゲノムDNAが必要な場合は、4  $\mu$ l の RNase A (100 mg/ml ; cat. no. 19101) \* を添加し、ボルテックス操作で混和、室温で2分間インキュベートしてから次のステップに進みます。

**11. DNeasy Blood & Tissue Kit あるいは QIAamp DNA Mini Kit を用いた DNA 精製にライセートを使用する。**

DNeasy Blood & Tissue Kit あるいは QIAamp DNA Mini Kit に添付されている Handbook の動物組織用スピンカラム・プロトコールに従って操作します。Buffer AL をサンプルに添加するステップから始めます。

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。

\* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS (material safety data sheet) をご覧ください。



# プロトコール：トータルタンパク質調製のための安定化した組織の破碎とホモジナイゼーション

これは、Qproteome® Mammalian Protein Prep Kitを用いたトータルタンパク質精製のために、Allprotectで安定化した組織をTissueLyserで破碎およびホモジナイズするためのプロトコールです。

## 実験を始める前の重要事項

- Qproteome Mammalian Protein Preparation Handbookの“Safety Information”を特によく読んでください。
- 調製中は迅速に操作を行なってください。

## 操作手順

1. **10 µlの100x Protease Inhibitor Solutionとオプションで1UのBenzonase®を1 mlのMammalian Cell Lysis Bufferに添加する。この溶液400 µlを2 mlのマイクロ遠心チューブに入れる。**

注：溶解バッファーを増やすことも可能ですが、ホモジナイゼーション効率が低下し、このためにタンパク質量も減少します。

容量を減らすことも可能ですが（例えば200 µl）、タンパク質濃度が高くなります。組織10 mgあたり200 µlのMammalian Cell Lysis Bufferで実験を始めることをお勧めします。

2. チューブあたり直径5 mmのステンレススチール製ビーズ1個を入れる。
3. ピンセットを用いて**Allprotect Tissue Reagent**で安定化した組織を溶液から取り出す。組織表面に残存する試薬を取り除く（例；組織をペーパータオル上で軽く叩くか、転がす）。

-20℃あるいは-80℃で保存したサンプルは、まず室温に戻します。

粘性が高いために微量の試薬が組織表面に残りますが、Qproteome Mammalian Protein Prep Kitを用いた精製操作には影響しません。

4. **使用する組織サンプル量を決定する。20 mgの組織で実験を始めることを推奨。**この量で十分な操作を行なえた場合、次の操作で組織量を増やすことが可能。必要に応じて、組織を清潔な台上において必要な量をカットします。

組織の計量は、量を決める最も正確な方法です。

室温（15～25℃）でのカットや重量測定の間はAllprotectで安定化した組織中のDNA、RNA、タンパク質は保護されています。従って氷上やドライアイス、低温室で組織をカットする必要はありません。残った組織はAllprotect Tissue Reagent中で保存できます。また、既に安定化されていた組織はAllprotectに浸すことなくそのまま-80℃で保存できます。

5. 組織サンプルをステップ2のチューブに入れる。
6. **Tissuelyser Adapter Set 2 x 24**にチューブを入れる。
7. **Tissuelyser**にセットして**20 Hz**で**2分間**破碎する。

注：破碎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します。ホモジナイゼーションの時間を延長する場合は、内側のチューブを外側に、外側のチューブを内側に置き換えます（これにより均一なホモジナイゼーションが可能です）。

注：ホモジナイゼーションが十分でないとタンパク質収量が顕著に低下します。

注：長時間のホモジナイゼーションや高速のホモジナイゼーションは、タンパク質に機械的ストレスや熱によるストレスを引き起こします。

8. ホモジネートとビーズを含むチューブを、**予め4℃**に冷却したマイクロ遠心機で**14,000 x g**、**20分間**遠心操作する。上清（トータルタンパク質画分など）を、**予め4℃**に冷却した新しいマイクロ遠心チューブにピペットで静かに入れる。  
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。
9. アプリケーションによっては、トータルタンパク質画分の濃縮が必要になる。詳細は**Qproteome Mammalian Protein Preparation 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）を参照。

# トラブルシューティング

## コメント

---

### RNA、DNA、タンパク質の分解

- a) 採取した組織を即座に安定化しなかった  
組織の採取後、即座に適切な容量の Allprotect Tissue Reagent に沈める。
- b) 安定化時のスタート材料が多すぎる  
組織の量を減らす、あるいは Allprotect Tissue Reagent の量を増やす。
- c) 安定化の際に組織が厚すぎる  
直径 5 mm のティッシュパンチで正確な大きさに組織をカットする、または必要に応じてサンプルを 0.5 cm 以下にスライスする。
- d) 組織が完全に Allprotect Tissue Reagent に沈んでいない  
組織が完全に Allprotect Tissue Reagent に沈んでいることを確認する。小さい組織片は蓋や容器の側面に付着することがある。
- e) 安定化の際に凍結した組織を使用  
Allprotect Tissue Reagent での安定化には新鮮で凍結していない材料を用いる。
- f) Allprotect Tissue Reagent での最適な保存期間以上保存した  
Allprotect で安定化した組織は、37℃で1日、15～25℃で7日間、2～8℃で6ヶ月まで保存可能。また -20℃か -80℃では長期保存が可能。できるだけ低温での保存を推奨。
- g) RNA 精製中に RNA が分解  
QIAGEN の RNA 精製用バッファーは、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。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、QIAGEN の RNA 精製用キットに添付されている英語版 Handbook を参照する。
- h) DNA 精製中に DNA が分解  
Proteinase K 分解を行なう前に、7 ページに記載されているように TissueLyser を用いて組織サンプルを破碎する。Proteinase K の量を 2 倍にし、Proteinase K の分解時間を 1 時間まで短縮する。

## コメント

---

### RNA、DNA、タンパク質の収量が低い

- a) 破砕、ホモジナイゼーションが不十分  
組織の破砕とホモジナイズにTissueLyserを使用する。詳細は5、7、9ページのプロトコルを参照する。あるいは、組織の破砕とホモジナイゼーションにTissueRuptorあるいはローター/ステーター方式のホモジナイザーを使用する。Allprotectで安定化した組織は、新鮮あるいは凍結した組織よりも硬いために、ローター/ステーター方式のホモジナイザーでは破砕時間が長くなる。  
次の調製にはスタートサンプル量を減らす。
- b) スタート・サンプル量が多すぎ  
次の調製にはスタートサンプル量を減らす。
- c) 溶解バッファーに混入したAllprotect Tissue Reagent量が多い  
溶解バッファーに大量のAllprotect Tissue Reagentが混入すると、溶解バッファーが希釈され、その結果収量が低下する。ピンセットを用いてAllprotect Tissue Reagentから組織を取り出し、組織表面の過剰なAllprotect Tissue Reagentを取り除く（組織をペーパータオル上で軽く叩くか、転がす）。
- d) 最適なキットでRNAを精製していない  
心臓や筋肉のような繊維質の組織を取り扱う場合は、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kitを使用する。脳や脂肪組織のような脂肪性の組織を取り扱う場合は、RNeasy Lipid Tissue Mini Kitを使用する。
- e) タンパク質抽出バッファーの成分がタンパク質量を妨害するために一定した結果が得られない  
阻害物質を除去するために沈澱ステップ（例えばアセトンを用いた沈澱）\*を行なうか、他のタンパク質量法を用いる。

\* 化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS（material safety data sheet）をご覧ください。







Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, Qproteome®, AllPrep®, DNeasy®, RNeasy® (QIAGEN Group); Benzonase® (Merck KGaA, Germany). Benzonase® Nuclease is manufactured by Merck KGaA and its affiliates.

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。

© 2010 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.co.jp](http://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

