

RNeasy® Plus Micro

プロトコールとトラブルシューティング

gDNA Eliminator カラムを用いた以下の微量サンプルからの
トータルRNA精製

動物およびヒト細胞 ($\leq 5 \times 10^5$)

動物およびヒト組織 (≤ 5 mg)

マイクロダイセクション法により採取した凍結切片

およびRNAのクリーンアップと濃縮



目次

プロトコール

動物およびヒト細胞からのトータルRNA精製	3
動物およびヒト組織からのトータルRNA精製	10
マイクロダイセクション法により採取した凍結切片からのトータルRNA精製	17
トラブルシューティング	21

プロトコール：動物およびヒト細胞からのトータル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、正しいスタートサンプル量を使用することが重要です。最大使用量は以下の項目により変動します：

- 細胞の種類によるRNA含有量
- gDNA Eliminator Spin ColumnのDNA除去のための結合容量
- RNeasy MinElute® Spin ColumnのRNA結合容量（45 µg RNA）
- 効率的な溶解に必要なBuffer RLT Plusの量

さらに細胞破片はgDNA EliminatorおよびRNeasy MinElute Spin Columnの結合容量を低下することがあります。処理する細胞がTable 2（英語版Handbook 12ページ）に掲載されていない場合や、RNA含有量に関する情報がない場合には、 5×10^5 個以下の細胞で実験を開始することを推奨します。

RNAの精製の際にDNAが混入する原因となるため、**gDNA Eliminator Spin Column**にオーバーロードしないでください。RNAの収量および純度が顕著に低下するため、**RNeasy MinElute Spin Column**をオーバーロードしないでください。

スタートサンプル量を定量する最も正確な方法は細胞を数えることです。指標として、様々な容器中でコンフルエントになるまで培養したHeLa細胞の数を表4に記載しています。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Plus Micro 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 39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）を参照にして装置を使用してください。
- 細胞ペレットは使用時まで -70 で保存することも、すぐに調製することもできます。凍結する前に細胞数を測定します。ステップ2でチューブを指で軽く叩いて細胞ペレットをルーズにするために、凍結した細胞ペレットは少し解凍します。ステップ3でホモジナイズした細胞ライセートは数ヶ月間 -70 で保存できます。使用する際は凍結したライセートを解凍し、塩類が溶解するまで37 の水浴中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。溶解していない物質が存在する場合には、 $3,000 \sim 5,000 \times g$ で5分間遠心してください。上清を新しいRNeasy フリーのガラス製あるいはポリプロピレン製のチューブに移し、ステップ4に進みます。

表4. 様々な容器で培養したHeLa細胞の数と培養面積

細胞培養容器	培養面積 (cm ²)*	細胞数†
マルチウェル・プレート		
■ 96ウェル	0.32 ~ 0.6	4 ~ 5 × 10 ⁴
■ 48ウェル	1	1 × 10 ⁵
■ 24ウェル	2	2.5 × 10 ⁵
■ 12ウェル	4	5 × 10 ⁵
■ 6ウェル	9.5	1 × 10 ⁶ ‡
ディッシュ		
■ 35 mm	8	1 × 10 ⁶ ‡
フラスコ		
■ 40 ~ 50 ml	25	3 × 10 ⁶ ‡

* ウェルあたり。マルチウェル・プレートを使用する際は、メーカーによりわずかに変動します。

† HeLa細胞（長さ約 15 μm）をコンフルエントになるまで培養した場合の細胞数。細胞数は動物細胞やヒト細胞の種類（長さは 10 ~ 30 μm）により変動します。

‡ この細胞数はRNeasy MinElute Spin Columnの最大結合許容量を超えています。この多数の細胞を処理するには、適切に分割したライセート（各 5 × 10⁶個の細胞以下）をそれぞれRNeasy MinElute Spin Columnにロードします。

- RNeasy Protect[®] Cell Reagent中に保存した細胞もこの精製法に使用できます。保存容器の底に沈殿している物質も含めて全サンプルを遠心チューブに移します。5,000 × gで5分間遠心して細胞をペレットとし、ピペットで上清を除去します（必要があれば遠心操作前にサンプルを解凍する）。すぐにステップ2に進みます。
- Buffer RLT Plusと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は英語版Handbook 6ページをご覧ください。
- この実験の全てのステップは室温（15 ~ 25 °C）で行なってください。操作は手早く進めてください。
- 全ての遠心ステップは一般的なマイクロ遠心機を用いて20 ~ 25 °Cで行なってください。遠心機が20 °C以下に冷却されていないことを確認します。

実験を始める前の準備事項

- RNase含有量の多い細胞株からRNAを精製する際には、使用前にβ-ME (β-mercaptoethanol) を Buffer RLT Plus に添加することをお奨めします。1 ml 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を含むBuffer RLT Plusは室温(15 ~ 25 °C)で1ヶ月間まで保存できます。あるいはBuffer RLT 1 mlあたり20 μlの2 M dithiothreitol (DTT) を添加します。2 MのDTTストック溶液を水で新しく調製し、一回分ずつに分注し直ぐに使用するかあるいは凍結します。DTTを添加したBuffer RLT Plusは室温で最高1ヶ月間保存できます。
- 500個未満の細胞を処理する際、ホモジナイゼーション前にキャリアRNAをライセートに添加可能です(英語版 Handbook 15ページの“Carrier RNA”を参照)。初めて使用する前にキャリアRNA(310 μg)を1 mlのRNaseフリー水で溶解します。このストック溶液は-20 °Cで保存します。RNAプレップごとに、このストック溶液を用いて新しく希釈液を調製します。このストック溶液の濃度は310 μg/ml (= 310 ng/μl)です。10プレップ用のワーキング溶液(4 ng/μl)を調製するためには、5 μlのRNAストック溶液を34 μlのBuffer RLT Plusに添加し、ピペティングにより混和します。この希釈液6 μlを54 μlのBuffer RLT Plusに添加すると、4 ng/μlのワーキング溶液になります。この溶液5 μlをステップ3でライセートに添加します。**oligo-dT**をベースにした増幅に精製RNAを用いる場合には、ライセートにキャリアRNA添加してはいけません。
- Buffer RPEは濃縮液でお届けします。キットを初めて使用する場合は、まず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。
- 本キットを初めて使用する前に、まず24 mlのエタノール(96 ~ 100%)と6 mlのRNaseフリー水(キットに添付)を混和して80%エタノールを調製します。本操作では70%エタノールも必要ですが、エタノール(96 ~ 100%)を蒸留水(別途準備)で希釈して調製できます。
- 保存中にBuffer RLT Plusは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、室温にして使用します。

操作手順

1. ステップ1aあるいは1bに従って細胞を回収する。
 - 1a. 浮遊細胞(細胞は 5×10^5 個以上使用しない):
細胞数を数え、使用量を決定する。適切な細胞数を遠心チューブ(別途準備)中で**300 x g**で5分間遠心操作を行ない、細胞をペレット化する。上清を注意深く完全に吸引除去してからステップ2に進む。
注: 細胞培養液を完全に除去しないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、DNA除去やRNA精製の条件が変化し、その結果、RNA収量や純度が低下することがあります。

1b. 単層培養細胞（細胞は 5×10^5 個以上使用しない）：

単層培養細胞は培養容器（直径 **10 cm** まで）中で直接溶解するか、あるいはトリプシン処理を行ない、細胞ペレットとして回収後溶解することができる。細胞培養フラスコの付着細胞は必ずトリプシン処理を行なう。

直接細胞溶解：

細胞数を数え、使用量を決定する。細胞培養液を完全に吸引後、すぐにステップ2に進む。

注：細胞培養液を完全に除去しないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、DNA除去やRNA精製の条件が変化し、その結果、RNAの品質や収量が低下します。

細胞のトリプシン処理および細胞の回収：

細胞数を数え、使用量を決定する。培養液を吸引除去し、**PBS**で細胞を洗浄する。**PBS**を吸引除去し、**0.10 ~ 0.25 %**トリプシンを含む**PBS**を加える。ディッシュあるいはフラスコから細胞を剥離後、培養液（トリプシンを不活性化するために血清を含む）を添加し、細胞を**RNase**フリーのガラス製あるいはポリプロピレン製の遠心チューブ（別途準備）に移し、**300 x g**で5分間遠心する。上清を完全に吸引除去してからステップ2に進む。

注：細胞培養液を完全に除去しないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、DNA除去やRNA精製の条件が変化し、その結果、RNAの品質や収量が低下します。

2. Buffer RLT Plusを添加して細胞を破碎する。

ペレット化した細胞はチューブを指で軽く叩き細胞ペレットをルーズにする。**350 μ l**の**Buffer RLT Plus**を添加する。ボルテックスあるいはピペットで混和して、ステップ3に進む。

1×10^5 個以下の細胞を処理する場合には、代わりに75 μ lの**Buffer RLT Plus**を添加できます。この操作でより小さなチューブ内で細胞のピペッティングが可能になります。ピペットで溶液を吸排出して細胞を溶解します。

注：細胞ペレットが完全に懸濁されていないと効率的に溶解されず、収量が低下します。

付着細胞の直接溶解には**350 μ l**の**Buffer RLT Plus**を培養ディッシュに添加する。ゴム製のポリスマンで細胞ライセートを回収する。ライセートをマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで入れる。ボルテックスあるいはピペットで混和し、細胞塊がないことを確認してからステップ3に進む。

1×10^5 個以下の細胞を処理する場合には、代わりに75 μ lの**Buffer RLT Plus**を添加できます。この操作はマルチウェルプレートあるいは培養シャーレが必要です。ピペットで溶液を吸排出して細胞を溶解します。

3. 細胞ライセートをステップ 3a、3bあるいは3cに従ってホモジナイズする。

ホモジナイゼーション法の詳細に関しては、英語版 Handbook 13 ページの “Disrupting and homogenizing starting material” を参照してください。 1×10^5 個以下の細胞を調製する場合には、細胞を 1 分間ボルテックスすればホモジナイズできます。ホモジナイゼーション後にステップ 4 に進んでください。

注：ステップ 2 で 75 μ l の Buffer RLT Plus を使用した場合には、ライセートを新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブに移し、Buffer RLT Plus を用いて最終量を 350 μ l に調製します。1 分間ボルテックスしてホモジナイズし、ステップ 4 に進みます。

注：500 個未満の細胞を処理する際、ホモジナイゼーションの前にライセートに 20 ng のキャリア RNA (4 ng/ μ l の溶液を 5 μ l) を添加可能です。“実験開始前の準備事項” に記述されているようにキャリア RNA を準備します。

注：不完全なホモジナイゼーションは RNA 収量の低下や、gDNA Eliminator Spin Column や RNeasy MinElute Spin Column の目詰まりの原因になります。TissueRuptor や QIAshredder を用いたホモジナイゼーションは、シリンジと注射針を使った方法よりも RNA の収量が一般的に増加します。

3a. 2 ml のコレクションチューブにセットした QIAshredder Spin Column (別途準備) にライセートを直接ピペットで添加し、最高スピードで 2 分間遠心操作する。ステップ 4 に進む。

3b. TissueRuptor のディスプレイザブル・プローブのチップをライセート中に入れ、ライセートが均一になるまで (通常 30 秒) TissueRuptor を最高速度で操作する。ステップ 4 に進む。

注：操作中に TissueRuptor とディスプレイザブル・プローブへの損傷を避けるため、プローブの先端をバッファーに必ず沈めてください。

3c. RNase フリーのシリンジに取り付けた先の尖っていない注射針 (20-G、直径 0.9 mm) にライセートを少なくとも 5 回通す。ステップ 4 に進む。

4. ホモジナイズしたライセートを 2 ml のコレクションチューブ (添付) にセットした gDNA Eliminator Spin Column に入れる。8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 30 秒間遠心操作する。カラムを捨てて、ろ液を保存する。

注：遠心操作後にカラムのメンブレン上に液体が残留していないことを確認します。必要に応じて、全ての液体がメンブレンを通過するまで同様に遠心操作を繰り返します。

本プロトコールの残りのステップで 200 ヌクレオチド以上の RNA 分子を精製できます。miRNA のような small RNA を含むトータル RNA の精製が必要な場合には、本プロトコールのステップ 5 ~ 11 の代わりに、英語版 Handbook 45 ページの Appendix D のステップ D1 ~ D6 を行ないます。

5. ステップ4のろ液に等量の70%エタノール(通常350 µl)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6に進む。

注: ホモジナイゼーションやDNA除去の際にライセート量が減少した場合には、添加する70%エタノールの量は350 µlより少なくなります。

注: ある種の細胞株からのRNA調製では、エタノール添加後に沈殿物を生じることがあります。これは操作には影響しません。

6. 形成した沈殿物を含むサンプル全てを2 ml コレクションチューブ(添付)の中にセットしたRNeasy MinElute 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。ろ液を捨てる*。

オプション: タンパク質を回収したい場合には、ろ液を氷上で保存し、英語版 Handbook 47 ページ、Appendix E のステップ E1 ~ E5 を行ないます。

コレクションチューブはステップ7で再使用します。

7. 700 µl の Buffer RW1 を RNeasy MinElute Spin Column に添加する。チューブを静かに閉め、スピнкаラム・メンブレン洗浄のために8,000 x g (10,000 rpm) 以上で15秒間遠心操作する。ろ液を捨てる*。

コレクションチューブはステップ8で再使用します。

注: 遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column がろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。コレクションチューブを完璧に空にします。

8. RNeasy MinElute Spin Column へ Buffer RPE 500 µl を添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために8,000 x g (10,000 rpm) 以上で15秒間遠心操作する。ろ液を捨てる。

コレクションチューブはステップ9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(“実験を始める前の準備事項”を参照)。

9. 500 µl の 80 % エタノールを RNeasy MinElute Spin Column に加える。チューブを静かに閉め、RNeasy スピнкаラム・メンブレンを洗浄するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で2分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

エタノール(96 ~ 100 %)および添付のRNase フリー水を用いて80%エタノール液を調製します。

注: 遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column がろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。接触した場合、エタノールのコンタミが生じます。

* Buffer RLT Plus や Buffer RW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook の6ページをご覧ください。

10. **RNeasy MinElute Spin Column**を新しい**2 ml**コレクションチューブ（添付）にセットする。スピncラムの蓋を開け、最大速度で**5分間**遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

蓋の損傷を避けるために、遠心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向けて蓋をセットします（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向けてます）。

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ので、スピncラム・メンブレンを乾燥することは重要です。蓋を開いて遠心することにより、RNA溶出の際にエタノールがキャリアオーバーしません。

11. **RNeasy MinElute Spin Column**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。**RNase**フリー水 **14 μ l**をスピncラム・メンブレンの中央に直接添加する。蓋を静かに閉めて最高速度で**1分間**遠心操作し、**RNA**を溶出する。

より高濃度のRNAが必要な場合には、10 μ lのRNaseフリー水を使用できますが、収量は約20%低下します。スピncラム・メンブレンが十分に水合できないため、10 μ l以下のRNaseフリー水でRNAを溶出ししないでください。

RNeasy MinElute Spin Columnのデッドボリュームは2 μ lです：14 μ lのRNaseフリー水で溶出すると12 μ lの溶出液が得られます。

精製したRNAを用いたRT-PCRやリアルタイムRT-PCRには、特異性や感度の高い結果を実現する至適化済みで即使用可能な幅広いキットを提供しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください（www.qiagen.com/PCR）。限られた量のRNAからの全トランスクリプトーム増幅（WTA）にはQuantiTect® Whole Transcriptome Kitを推奨します。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください（www.qiagen.com/goto/WTA）。

プロトコール：動物およびヒト組織からのトータルRNA精製

本プロトコールは溶解が容易な動物やヒト組織からのトータルRNA精製用です。マイクロダイセクションにより採取した凍結組織切片からのトータルRNA精製に関しては17ページを参照してください。

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、正しいスタートサンプル量を使用することが重要です。一般的には、最高5 mgの新鮮、あるいは凍結した組織、またはRNA/ater[®]やAllprotectで安定化した組織2 ~ 3 mg（一部脱水されている）を調製できます。これらの量はほとんどの組織で、gDNA Eliminator Spin ColumnのDNA除去容量、RNeasy MinElute Spin ColumnのRNA結合容量やBuffer RLT Plusの溶解容量を超えません。様々な組織からのRNA収量をTable 2に掲載しています（英語版Handbook 12ページ）。

肝臓から最大のRNA収量を得るためには、このプロトコールのステップ4において70%エタノールの代わりに50%エタノールを使用します。

脾臓、脳の一部、肺、胸腺などのいくつかの組織は、操作中に沈殿物を生じる傾向があります。しかし、この沈殿物はRNA精製には影響しません。

RNAの精製の際にDNAが混入する原因となるため、**gDNA Eliminator Spin Column**にオーバーロードしないでください。また、**RNA**の収量および純度が顕著に低下するため、**RNeasy MinElute Spin Column**にオーバーロードしないでください。

スタートサンプル量を定量する最も正確な方法は組織重量を測定することです。一般的に、一辺が1.5 mmの立方体(3.4 mm³)の動物組織の重量は3.5 ~ 4.5 mgです。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Plus Micro 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 39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）を参照にして装置を使用してください。
- TissueLyserを使用する場合には、TissueLyser Handbook（英語版）参照にして装置を使用してください。
- 最適な結果を得るには、採取した組織を即座にRNA/ater RNA Stabilization Reagent(RNA/ater Handbook 参照)あるいはAllprotect Tissue Reagent(Allprotect Tissue Reagent Handbook 参照)中で安定化します。安定化試薬中で組織は37 °Cで最高1日、15 ~ 25 °Cで最高7日、あるいは2 ~ 8 °CでRNA/aterでは最高4週間、Allprotectでは最高6ヶ月保存できます。あるいは-20 °Cか-80 °Cで組織を長期保存できます。

- 新鮮、凍結した組織、あるいはRNA^{later}/Allprotectで安定化した組織ともに使用できます。組織は-70 で数ヶ月保存できます。液体窒素で瞬間凍結した組織は即座に-70 に移します。重量測定あるいはBuffer RLT Plus中で破砕するまでのサンプル取り扱いの際に、凍結した組織を融解させないでください。ステップ2でのホモジナイズした組織ライセートも-70 で数カ月保存できます。ステップ3を行なう前に、凍結したライセートは37 の水浴中で完全に解凍し、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。
- Buffer RLT Plusと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は英語版Handbook 6ページをご覧ください。
- 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。
- 全ての遠心ステップは一般的なマイクロ遠心機を用いて20 ~ 25 で行なってください。遠心機が20 以下に冷却されていないことを確認します。

実験を始める前の準備事項

- 使用前にβ-メルカプトエタノール（β-ME）をBuffer RLT Plusに添加しなければなりません。1 ml Buffer RLT Plusあたりβ-ME 10 μl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を含むBuffer RLT Plusは室温（15 ~ 25 ）で1ヶ月間まで保存できます。あるいはBuffer RLT Plus 1 mlあたり20 μlの2 M dithiothreitol（DTT）を添加します。2 MのDTTストック溶液を水で新しく調製し、一回分ずつに分注し直ぐに使用するかあるいは凍結します。DTTを添加したBuffer RLT Plusは室温で最高1ヶ月間保存できます。
- 約2 μg以下の組織を処理する際には、ホモジナイゼーション前にキャリアRNAをライセートに添加します（英語版Handbook 15ページの“Carrier RNA”を参照）。初めて使用する前にキャリアRNA（310 μg）を1 mlのRNaseフリー水で溶解します。このストック溶液は-20 で保存します。RNAプレップごとに、このストック溶液を用いて新しく希釈液を調製します。このストック溶液の濃度は310 μg/ml（= 310 ng/μl）です。10プレップ用のワーキング溶液（4 ng/μl）を調製するためには、5 μlのRNAストック溶液に34 μlのBuffer RLT Plusを添加し、ピペティングにより混和します。この希釈液6 μlを54 μlのBuffer RLT Plusに添加すると、4 ng/μlのワーキング溶液になります。この溶液5 μlをステップ2でライセートに添加します。**oligo-dT**をベースにした増幅に精製**RNA**を用いる場合には、ライセートにキャリア**RNA**を添加しないでください。
- Buffer RPEは濃縮液でお届けします。キットを初めて使用する場合は、まず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。

- 本キットを初めて使用する前に、まず24 mlのエタノール(96 ~ 100%)と6 mlのRNaseフリー水(添付)を混和して80%エタノールを調製します。本操作では70%エタノールも必要ですが、エタノール(96 ~ 100%)を蒸留水(別途準備)で希釈して調製できます。
- 保存中にBuffer RLT Plusは沈殿物を形成することがあります。必要な場合には、温めて沈殿物を溶解した後、室温で使用してください。

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。使用する組織量を決定する。**5 mg**以上使用しない。すぐにステップ2に進む。

組織サンプルの重量の測定が、組織量を決定する最も正確な方法です。必要に応じて、組織を清潔な台の上に置いてカットし、使用する切片の重量を測定します。

RNAlaterあるいは**Allprotect**で安定化された組織：ピンセットで安定化試薬液から組織を取り出し、保存中に生じた結晶を確実に除去します。RNAlaterあるいはAllprotectで安定化した組織内のRNAは、室温(15 ~ 25 °C)でカットしたり、重量測定している間保護されています。従って氷上やドライアイスあるいは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RNAlater RNA Stabilization ReagentあるいはAllprotect Reagentに入れて保存します。既に安定化されている組織は安定化試薬無しでそのまま-80 °Cで保存できます。

安定化されていない新鮮な組織あるいは凍結組織：組織をRNAlaterあるいはAllprotect Reagentで処理、瞬間凍結、あるいはステップ2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は保護されていません。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。関連した操作はできるだけ迅速に行なってください。残った新鮮な組織はRNA安定化のためにRNAlater Reagent内で、あるいはDNA、RNA、タンパク質を安定化するためにAllprotect Tissue Reagent内で保存できます。しかし、既に凍結した組織ではこの試薬内での解凍がゆっくりすぎるため、試薬の組織への浸潤が迅速に行なわれず、RNA分解を十分に防止することができません。

2. ステップ2a、2b、2cに従って組織を破碎し、**Buffer RLT Plus**(組織は**5 mg**以下を使用)中で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 13ページの“Disrupting and homogenizing starting material”を参照ください。

注：使用前にβ-ME(あるいはDTT)をBuffer RLT Plus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)。

注：2 µg未満の組織を処理する場合には、ホモジナイゼーションの前にライセートに20 ngのキャリアRNA(4 ng/µlの溶液を5 µl)を添加します。“実験開始前の準備事項”に記述されているようにキャリアRNAを準備します。

RNA/aterあるいはAllprotect Reagent中で保存した組織は、新鮮/凍結組織より多少固くなっていることがあります。一般的な破碎/ホモジナイゼーション方法を用いて問題なく処理できます。

注：不完全なホモジナイゼーションはRNA収量の低下や、gDNA Eliminator Spin ColumnやRNeasy MinElute Spin Columnの目詰まりの原因になります。TissueRuptorあるいはTissueLyserを用いたホモジナイゼーションの方が他の方法よりRNA収量が一般的に増加します。

2a. TissueRuptorを用いた破碎およびホモジナイゼーション：

- 組織を適切な大きさの容器に入れる。350 µlのBuffer RLT Plusを添加する。
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。
- TissueRuptorのディスプレイ・プローブのチップを容器に入れて、ライセートが均一になるまでTissueRuptorを最高速度で操作する（通常30秒）、ステップ3に進む。
注：操作中にTissueRuptorとディスプレイ・プローブへの損傷を避けるため、プローブの先端をバッファに必ず沈めてください。
ホモジナイゼーションの際に気泡が生じることがあります。気泡が形成した場合には、ホモジネートを室温で2～3分放置し、泡が消えてから次のプロトコール・ステップに進みます。

2b. TissueLyserを用いた破碎およびホモジナイゼーション：

- 直径5 mmのステンレススチール製ビーズ1個が入った2 mlのマイクロ遠心チューブに組織を入れる。
新鮮あるいは凍結した組織サンプルを取り扱う際は、チューブをドライアイス上に置きます。
- チューブを室温に移し、チューブあたり350 µlのBuffer RLT Plusを即座に添加する。
- TissueLyser Adapter Set 2 x 24にチューブを入れる。
- TissueLyserにセットして20 Hzで2分間破碎する。
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を継続します。
- 内側のコレクションチューブを外側に、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3に進む。

ステンレススチール製ビーズは再使用しないでください。

2c. 乳鉢と乳棒を用いて破碎した後に **QIAshredder** ホモジナイザーあるいは注射針とシリンジを用いてホモジナイゼーション：

- 計量した組織を迅速に液体窒素の中に入れて、乳鉢と乳棒を用いて細かい粉末にする。

- 液体窒素で冷却済みの **RNase** フリーの **2 ml** マイクロ遠心チューブ（別途準備）に粉末状組織と液体窒素をデカントにより入れる。液体窒素は蒸発させるが、組織が融解しないようにする。

- **350 μ l** の **Buffer RLT Plus** を添加する。

- **2 ml** のコレクションチューブにセットした **QIAshredder Spin Column** にライセートを直接ピペットで添加し、最高スピードで **2** 分間遠心操作する。あるいは **RNase** フリーのシリンジに取り付けた先端が尖っていない注射針（**20-G**）にライセートを最低 **5** 回出し入れする。ステップ3に進む。

3. ライセートを最高速度で **3** 分間遠心する。ピペットで注意深く上清を採取し、**2 ml** のコレクションチューブ（添付）にセットした **gDNA Eliminator Spin Column** に入れる。**8,000 x g**（**10,000 rpm**）以上で **30** 秒間遠心操作する。カラムを捨て、ろ液を保存する。

最初の遠心ステップは **gDNA Eliminator Spin Column** の目詰りや DNA 除去を妨害する原因となる不要物を除去するための重要なステップです。3 分間の遠心操作後に非常に微量の不溶物質が存在するために、ペレットが見えないサンプルもあります。

注：遠心操作後にカラムのメンブレン上に液体が残留していないことを確認します。必要に応じて、全ての液体がメンブレンを通過するまで同様に遠心操作を繰り返します。

4. ステップ3のろ液に等量の **70%** エタノール（通常 **350 μ l**）を添加し、ピペットでよく混和する。遠心操作は行わない。すぐにステップ5に進む。

注：ホモジナイゼーションや DNA 除去の際にライセート量が減少した場合には、添加する **70%** エタノールの量は **350 μ l** より少なくなります。

注：エタノール添加後に沈殿物を生じることがありますが、これは本調製法に影響はありません。

注：肝臓から最大限の RNA 収量を得るには、**70%** エタノールの代わりに **50%** エタノールを使用します。

5. 形成した沈殿物を含むサンプル全てを **2 ml** コレクションチューブ（添付）の中にセットした **RNeasy MinElute 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。ろ液を捨てる*。

オプション：タンパク質を回収したい場合には、ろ液を氷上で保存し、英語版 Handbook 47 ページ、Appendix E のステップ E1 ~ E5 を行ないます。

コレクションチューブはステップ6で再使用します。

6. **700 µl** の **Buffer RW1** を **RNeasy MinElute Spin Column** に添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために **8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒間** 遠心操作する。ろ液を捨てる*。

コレクションチューブはステップ7で再使用します。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column がろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。コレクションチューブを完璧に空にします。

7. **RNeasy MinElute Spin Column** へ **Buffer RPE 500 µl** を添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために **8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒間** 遠心操作する。ろ液を捨てる。

コレクションチューブはステップ8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（“ 実験を始める前の準備事項 ” を参照）。

8. **500 µl** の **80 %** エタノールを **RNeasy MinElute Spin Column** に加える。チューブを静かに閉め、**RNeasy スピнкаラム・メンブレン** を乾燥するため、**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **2 分間** 遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

エタノール (96 ~ 100 %) および添付の RNase フリー水を用いて **80 %** エタノール液を調製します。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column がろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。接触した場合、エタノールのコンタミが生じます。

9. **RNeasy MinElute Spin Column** を新しい **2 ml** コレクションチューブ（添付）にセットする。スピнкаラムの蓋を開け、最大速度で **5 分間** 遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

蓋の損傷を避けるために、遠心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向けて蓋をセットします（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向けます）。

* Buffer RLT Plus や Buffer RW1 を含んだろ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。

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ので、スピncラム・メンブレンを乾燥することは重要です。蓋を開いて遠心することにより、RNA 溶出の際にエタノールがキャリーオーバーしません。

10. **RNeasy MinElute Spin Column** 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。RNase フリー水 **14 μ l** をスピncラム・メンブレンの中央に直接添加する。蓋を静かに閉めて最高速度で **1 分間** 遠心操作し、**RNA** を溶出する。

より高濃度の RNA が必要な場合には、10 μ l の RNase フリー水を使用できますが、収量は約 20 % 低下します。スピncラム・メンブレンが十分に水和できないため、10 μ l 以下の RNase フリー水で RNA を溶出しないでください。

RNeasy MinElute Spin Column のデッドボリウムは 2 μ l です：14 μ l の RNase フリー水で溶出すると 12 μ l の溶出液が得られます。

精製した RNA を用いた RT-PCR やリアルタイム RT-PCR には、特異性や感度の高い結果を実現する至適化済みで即使用可能な幅広いキットを提供しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください (www.qiagen.com/PCR)。限られた量の RNA からの全トランスクリプトーム増幅 (WTA) には、QuantiTect Whole Transcriptome Kit を推奨します。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください (www.qiagen.com/goto/WTA)。

プロトコール：マイクロダイセクション法により採取した凍結切片からのトータルRNA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動物やヒトの凍結組織からのトータルRNA精製用です。マイクロダイセクションにより採取したホルマリン固定サンプルからのトータルRNA精製にはRNeasy FFPE Kit (cat. no. 74404) を推奨します。

非常に微量のスタートサンプルから核酸を精製しなければならないために、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からの核酸分離は研究者にとって大きな課題です。さらに固定と染色ステップにおいてRNAが分解されることがあります。この問題を最低限に抑えるために固定化プロトコールを改良するか、あるいは瞬間凍結標本から切片作製する必要性が生じることがあります。

標本からの切片作製、染色、マイクロダイセクション用の様々な機器および消耗品はLeica® (www.leica-microsystems.co.jp) およびP.A.L.M. Microlaser Technologies (www.palm-mikrolaser.com) から入手できます。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Plus Micro 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 39ページ)をお読みください。
- RNA分解を最低限に抑えるために、サンプルの室温での保存は避けてください。組織中のRNAは液体窒素中で瞬間凍結を行なうまで保護されていません。
- ステップ3でホモジナイズした組織ライセートは-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は37℃の水浴中で完全に解凍し、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。
- Buffer RLT Plusと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は英語版 Handbook 6ページをご覧ください。
- 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。
- 全ての遠心ステップは一般的なマイクロ遠心機を用いて20~25℃で行なってください。遠心機が20℃以下に冷却されていないことを確認します。

実験を始める前の準備事項

- 使用前にβ-Mercaptoethanol (β-ME) を Buffer RLT Plus に添加します。Buffer RLT Plus 1 ml あたり 10 μl のβ-ME を添加してください。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 を含む Buffer RLT Plus は室温 (15 ~ 25 °C) で1ヶ月間まで保存できます。あるいは Buffer RLT Plus 1 ml あたり 20 μl の 2 M dithiothreitol (DTT) を添加します。2 M の DTT ストック溶液を水で新しく調製し、一回分ずつに分注し直ぐに使用するかあるいは凍結します。DTT を添加した Buffer RLT Plus は室温で最高1ヶ月間保存できます。
- 500 個未満の細胞を処理する際、ホモジナイゼーション前にキャリア RNA をライセートに添加可能です (英語版 Handbook 15 ページの “Carrier RNA” を参照)。初めて使用する前にキャリア RNA (310 μg) を 1 ml の RNase フリー水で溶解します。このストック溶液は -20 °C で保存します。RNA プレップごとに、このストック溶液を用いて新しく希釈液を調製します。このストック溶液の濃度は 310 μg/ml (= 310 ng/μl) です。10 プレップ用のワーキング溶液 (4 ng/μl) を調製するためには、5 μl の RNA ストック溶液に 34 μl の Buffer RLT Plus を添加し、ピペティングにより混和します。この希釈液 6 μl を 54 μl の Buffer RLT Plus に添加すると、4 ng/μl のワーキング溶液になります。この溶液 5 μl をステップ 2 でライセートに添加します。**oligo-dT** をベースにした増幅に精製 RNA を用いる場合には、ライセートにキャリア RNA を添加しないでください。
- Buffer RPE は濃縮液でお届けします。キットを初めて使用する場合は、まず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。
- 本キットを初めて使用する前に、まず 24 ml のエタノール (96 ~ 100 %) と 6 ml の RNase フリー水 (添付) を混和して 80 % エタノールを調製します。本操作では 70 % エタノールも必要ですが、エタノール (96 ~ 100 %) を蒸留水 (別途準備) で希釈して調製できます。
- 保存中に Buffer RLT Plus は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、室温にして使用します。

操作手順

1. サンプルを適切な量の **Buffer RLT Plus** に直接採取する (容量はマイクロダイセクションに使用した収集容器によるが、**65 μl [Leica の装置]** あるいは **300 μl [その他の装置]** 以上使用しない)。

注: 使用前にβ-ME (あるいは DTT) を Buffer RLT Plus 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)。

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 ml** のチューブ) に移す。**Buffer RLT Plus** で最終容量を **350 μl** に調製する。

注: 500 個未満の細胞を処理する際、ホモジナイゼーションの前にライセートに 20 ng のキャリア RNA (4 ng/μl の溶液を 5 μl) を添加可能です。“実験開始前の準備事項” に記述されているようにキャリア RNA を準備します。

3. サンプルを **30 秒間ボルテックス**する。
追加のホモジナイゼーションは不要です。
4. サンプルを **2 ml**のコレクションチューブ（添付）にセットした **gDNA Eliminator Spin Column**に入れる。**8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **30 秒間遠心**操作する。カラムを捨てて、ろ液を保存する。
注：遠心操作後にカラムのメンブレン上に液体が残留していないことを確認します。必要に応じて、全ての液体がメンブレンを通過するまで同様に遠心操作を繰り返します。
5. ステップ4のろ液に等量の **70 %エタノール**（通常 **350 μ l**）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6に進む。
注：ホモジナイゼーションやDNA除去の際にライセート量が減少した場合には、添加する70 %エタノールの量は350 μ lより少なくなります。
注：エタノールの添加後、沈殿物が見られることがあります。これは操作には影響しません。
6. 形成した沈殿物を含むサンプル全てを **2 ml** コレクションチューブ（添付）の中にセットした **RNeasy MinElute 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。ろ液を捨てる*。
コレクションチューブはステップ7で再使用します。
7. **700 μ l**の **Buffer RW1** を **RNeasy MinElute Spin Column** に添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために **8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒間遠心**操作する。ろ液を捨てる*。
コレクションチューブはステップ8で再使用します。
注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column がろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。コレクションチューブを完璧に空にします。
8. **RNeasy MinElute Spin Column** へ **Buffer RPE 500 μ l** を添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために **8,000 x g (10,000 rpm)** 以上で **15 秒間遠心**操作する。ろ液を捨てる。
コレクションチューブはステップ9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（“ 実験を始める前の準備事項 ” を参照）。

* Buffer RLT Plus や Buffer RW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook のページをご覧ください。

9. 500 μ l の 80 % エタノールを **RNeasy MinElute Spin Column** に加える。チューブを静かに閉め、**RNeasy** スピнкаラム・メンブレンを洗浄するため、**8,000 x g** (**10,000 rpm**) 以上で 2 分間遠心操作する。ろ液とコレクションチューブを棄てる。

エタノール(96 ~ 100 %) および添付の RNase フリー水を用いて 80 % エタノール液を調製します。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column がろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。接触した場合、エタノールのコンタミが生じます。

10. **RNeasy MinElute Spin Column** を新しい 2 ml コレクションチューブ (添付) にセットする。スピнкаラムの蓋を開け、最大速度で 5 分間遠心操作する。ろ液の入ったコレクションチューブを捨てる。

蓋の損傷を避けるために、遠心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向けて蓋をセットします (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向けます) 。

残存エタノールはダウストリームの反応を妨害することがあるので、スピнкаラム・メンブレンを乾燥することは重要です。蓋を開いて遠心することにより、RNA 溶出の際にエタノールがキャリアオーバーしません。

11. **RNeasy MinElute Spin Column** 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。**RNase** フリー水 14 μ l をスピнкаラム・メンブレンの中央に直接添加する。蓋を静かに閉めて最高速度で 1 分間遠心操作し、**RNA** を溶出する。

より高濃度の RNA が必要な場合には、10 μ l の RNase フリー水を使用できますが、収量は約 20 % 低下します。スピнкаラム・メンブレンが十分に水和できないため、10 μ l 以下の RNase フリー水で RNA を溶出ししないでください。

RNeasy MinElute Spin Column のデッドボリュームは 2 μ l です：14 μ l の RNase フリー水で溶出すると 12 μ l の溶出液が得られます。

精製した RNA を用いた RT-PCR やリアルタイム RT-PCR には、特異性や感度の高い結果を実現する至適化済みで即使用可能な幅広いキットを提供しています。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください (www.qiagen.com/PCR)。限られた量の RNA からの全トランスクリプトーム増幅 (WTA) には QuantiTect Whole Transcriptome Kit を推奨します。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください (www.qiagen.com/goto/WTA)。

トラブルシューティングガイド

コメント

RNeasy MinElute Spin Column の目詰まり

- a) 不完全な破碎および /
あるいはホモジナイ
ゼーション
- 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 13 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。
次の調製にはスタートサンプル量を減らす (各プロトコルを参照) あるいはホモジナイゼーションの時間を増やす。
- b) スタートサンプル量が
多すぎ
- スタートサンプル量を減らす (各プロトコルを参照)。正確なサンプル量で実験を始めることが重要である。
- c) 遠心温度が低すぎる
- 遠心温度は 20 ~ 25 とする。20 に設定しても遠心時に 20 以下になる遠心機もある。これがスピニングカラムの目詰りを起こす沈殿物を形成する原因となる。このような場合には遠心機を 25 に設定する。
gDNA Eliminator Spin Column にライセートを入れる前に、ライセートを 37 で温める。

RNA 収量が低い

- a) 不完全な破碎とホモジ
ナイゼーション
- 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 13 ページ) を参照する。
次回の調製ではスタートサンプル量を減らす (各プロトコル参照) または溶解バッファの量とホモジナイゼーション時間を増やす。
- b) スタートサンプル量が
多すぎ
- 次回の調製ではスタートサンプル量を減らす (各プロトコルを参照)。正確なサンプル量で実験を始めることが重要である。
- c) RNA がスピニングカラム・
メンブレンにまだ結合
している
- RNA 溶出を再度行なうが、RNase フリー水を RNeasy MinElute Spin Column 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。

コメント

- d) エタノールのキャリアオーバー 80%エタノールで洗浄した後、RNeasy MinElute Spin Columnを乾燥するために最高速度で5分間遠心操作を必ず行なう。
遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Columnがろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除く。接触した場合、エタノールのコンタミが起こる。
- e) 細胞培養液の除去が不完全（細胞サンプルの場合） 培養細胞を調製する際は、細胞回収後に培養液を完全に除去する（3ページ、プロトコール参照）。
- f) 80%エタノールをRNaseフリー水で調製していない RNeasy MinElute Spin Columnの洗浄に使用する80%エタノールは必ずRNaseフリー水で調製しなければならない。各プロトコールの“実験開始前の準備事項”に記述されているようにエタノール（96～100%）とキット添付のRNaseフリー水を用いて80%エタノールを調製する。

RNA収量が低いあるいは皆無

- a) RNaseフリー水の添加が不適切 RNeasy MinElute スピнкаラム・メンブレンの中央にRNaseフリー水をピペットでアプライし、完全にメンブレンを覆うようにする。
- b) エタノールのキャリアオーバー 80%エタノールで洗浄した後、RNeasy MinElute Spin Columnを乾燥するために最高速度で5分間遠心操作を必ず行なう。
遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Columnがろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除く。接触した場合、エタノールのコンタミが起こる。

A_{260}/A_{280} 値が低い

- 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 41ページ、Appendix B参照）。

RNAが分解

- a) スタートサンプルの
不適切な取り扱い

組織サンプルが Allprotect Tissue Reagentあるいは、RNA_{later} RNA Stabilization Reagent中で適切に安定化され保存されたことを確認する。

凍結細胞ペレットあるいは凍結組織サンプルは、液体窒素中で瞬間凍結し、-70℃で適切に保存されていたことを確認する。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 39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パツ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 39ページ、Appendix Aを参照する。

RNase処理を含むので、DNA調製に使用した真空乾燥機や遠心機にRNAサンプルを入れない。

- c) 80%エタノールを
RNaseフリー水で調製
していない

RNeasy MinElute Spin Columnを洗浄に使用する80%エタノールは必ずRNaseフリー水で調製しなければならない。各プロトコールの“実験開始前の準備事項”に記述されているようにエタノール（96～100%）とキット添付のRNaseフリー水を用いて80%エタノールを調製する。

DNAがRNAに混入し、ダウンストリーム実験に影響する

- a) 細胞数が多すぎる

ある種の細胞タイプでは、処理する細胞数が多すぎるとgDNA Eliminator Spin ColumnへのDNA結合効率が低下することがある。溶出したRNAにDNAが混入している場合には、細胞数を減らして調製してみる。

コメント

-
- b) 細胞培養液あるいは安定化試薬の除去が不完全
細胞培養液あるいは安定化試薬が完全に除去され、溶解バッファーが希釈されていないことを確認する。溶解バッファーが希釈されると gDNA Eliminator Spin Column は効果的に DNA を結合しない。
- c) 組織が多量の DNA を含む
DNA 含量の非常に高いある種の組織（例；脾臓）では微量の DNA が gDNA Eliminator Spin Column を通過することがある。サンプル量を減らして再度行なう。

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) エタノールのキャリアオーバー
80% エタノールで洗浄した後、RNeasy MinElute Spin Column を乾燥するために最高速度で 5 分間遠心操作を必ず行なう。
遠心操作後、RNeasy MinElute Spin Column がろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除く。接触した場合、エタノールのコンタミが起こる。
- b) 塩が溶出液に混入
バッファーは必ず 20 ~ 30 で使用する。
操作中の各ステップで正しいバッファーを使用したことを確認する。
洗浄ステップ中にコレクションチューブを再利用する際は、きれいなペーパータオル上でチューブを叩き、チューブの縁に付着した残りのろ液を除去する。
- c) 非常に微量の RNA を逆転写反応に使用した
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 以下の RNA からの cDNA 合成用に特別にデザインされた Sensiscript® RT Kit を使用することを推奨する。リアルタイム PCR に使用する cDNA の合成には、幅広い RNA 量（10 pg ~ 1 µg）に対応する QuantiTect Reverse Transcription Kit を推奨する。オーダーインフォメーションは英語版 Handbook 48 ページを参照ください。

— Memo —

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

"RNAlater[™]" is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents.

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製品は全て研究用です。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。

© 2007 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

