

RNeasy® Fibrous Tissue プロトコールとトラブルシューティング

RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit

RNeasy Fibrous Tissue Midi Kit

心臓、骨格筋、大動脈、その他繊維性組織からの
トータルRNA精製

目次

ページ

プロトコール

RNeasy Fibrous Tissue Mini Kitを用いてトータルRNAの精製 2

RNeasy Fibrous Tissue Midi Kitを用いてトータルRNAの精製 8

トラブルシューティング 14



プロトコール：RNeasy Fibrous Tissue Mini Kitを用いて トータルRNAの精製

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 Fibrous Tissue Mini Kitを用いると、通常30 mgまでの組織を処理できます。ほとんどの組織でこれらの組織の量は、RNeasy Spin ColumnのRNA結合容量と、Buffer RLTおよびproteinase Kの溶解容量を超えることはありません。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）。

お客様のスタートサンプルの特性に関する情報がない場合には、10 mg以下の組織で実験を始めることを推奨します。組織サンプルからのRNA収量によっては、最高30 mgまで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 Spin Column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3 mmの立方体（27 mm³）の動物組織の重量は25～35 mgです。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Fibrous Tissue Kits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を取り扱う方はAppendix A（英語版Handbook 30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（日本語版あり）を参照にして装置を使用してください。
- Proteinase K分解を行なうためにRNaseを不活化するBuffer RLTを希釈しなければならぬため、RNaseの豊富な組織（脾臓あるいは腸）ではこのプロトコールを使用しないでください。
- 新鮮、凍結あるいはRNAlater®で安定化した組織を使用できます。組織を凍結保存するためには、液体窒素で急激に凍結させ直ちに-70℃に移せば数カ月保存可能です。Buffer RLT中で破碎するまで、凍結した組織を重量測定や取り扱いの際に解凍させないでください。ステップ4でホモジナイズした組織ライセートは-70℃で数カ月間保存できます。ステップ5を行なう前に、凍結したライセートが完全に解凍し、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。
- 調製したDNase Iをボルテックスしないでください。DNase Iは物理的変性に特に敏感です。チューブを静かに転倒させて混和します。

- Buffer RLTは保存中に沈殿物を生じることがあります。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ので漂白剤を含んだ殺菌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。
- 特別な表記がない限り、この実験の全てのステップは室温で行なってください。操作は手早く進めてください。
- すべての遠心操作は20～25℃で行ないます。遠心操作中に20℃以下にならないように確認してください。

実験開始前の準備事項

- 使用前にβ-メルカプトエタノール（β-ME）を必ずBuffer RLTに添加してください。1 mlのBuffer RLT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は室温で最高1ヶ月間保存できます。

あるいは1 mlのBuffer RLT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は室温で最高1ヶ月間保存できます。

- Buffer RPEは濃縮溶液としてお届けします。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。
- RNase-Free DNase Setを初めて使用する場合は、まずDNase Iストック溶液を準備します。RNase-Free DNase Setの箱に入っているDNase I（1,500 Knitz units）を550 μlのRNaseフリー水で溶解します。DNase I溶液の飛散を避けるために、容器を開けないでください。RNaseフリーの注射針とシリンジを用いて容器にRNaseフリー水を注入します。容器を逆さにして、静かに溶かしてください。ボルテックスで混和しないでください。

DNase Iの長期保存には、ガラス瓶からストック溶液を取り出し、一回分ずつに分注し、-20℃で最高9ヶ月まで保存できます。解凍した溶液は2～8℃で6週間まで保存できます。凍結融解は繰り返さないでください。

操作手順

1. ステップ6でproteinase K分解を行なうために、水浴あるいはヒートブロックを55℃にセットする。
2. TissueLyser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 RNA Stabilization 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。

3. 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。サンプル組織の量を定める。30 mg 以上使用しない。すぐにステップ4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。

RNA^{later} RNA Stabilization Reagent中に保存している組織は、ピンセットで試薬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。

組織をRNA^{later} RNA Stabilization Reagent処理するか、瞬間凍結、あるいはステップ4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。

4. **TissueRupter** (ステップ4a) あるいは**TissueLyser** (ステップ4b) 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 12ページ、“Disrupting and homogenizing starting material” を参照ください。

注：β-メルカプトエタノール (β-ME) がBuffer RLTに添加されていることを確認してください (“実験開始前の準備事項” 参照)。

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 Spin Columnの目詰まりの原因になります。TissueRupterまたは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。

- 4a. **TissueRupter** 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。300 μlのBuffer RLTを添加する。

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** のディスプレイブル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**TissueRupter** を最高速度で操作する (通常20～40秒)。ステップ5に進む。

注：操作中に**TissueRupter** とディスプレイブル・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。

- 4b. **TissueLyser** を用いた破碎およびホモジナイゼーション：

- ステップ2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存した場合は、室温に置く。チューブあたり300 μlのBuffer RLT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** をセットし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5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。

5. 590 μ lのRNaseフリー水をライセートに添加する。その後proteinase K溶液を10 μ l添加し、ピペッティングにより完全に混合する。
6. 55°Cで10分間インキュベートする。
7. 20～25°C、10,000 x gで3分間遠心操作する。

組織残屑の小さいペレットと共に、上清の表面に薄膜あるいはフィルムが形成されることがあります。

8. 上清（約900 μ l）を、新しい1.5 mlあるいは2 mlのチューブ（別途準備）にピペットで移す。

ペレットが混入しないように気をつけます。少量のペレットの混入であれば、RNeasy操作には影響しません。もし上清の表面に薄膜やフィルムが存在する場合には、薄膜やフィルムの下にピペットチップを入れます。この層は通常ピペットチップの外側に付着し、混入することはありません。

9. 0.5容量（通常450 μ l）のエタノール（96～100%）を清澄化ライセートに添加する。ピペッティングにより混和する。遠心操作は行なわない。

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。

10. 700 μ lのサンプル（形成した沈殿物を含む）を、2 mlコレクションチューブの中にセットしたRNeasy Mini Spin Columnにアプライする。蓋を静かに閉めて、20～25°C、8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心操作する。ろ液*を棄てる。

コレクションチューブはステップ11で再使用します。

11. サンプルの残りをを用いてステップ10を繰り返す。ろ液*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. 350 μ lのBuffer RW1をRNeasy Spin Columnに添加する。蓋を静かに閉めて、メンブレン洗浄のために20～25°C、8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心操作する。ろ液*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。

オプション：カラム上でのDNase処理が必要でない場合には、代わりに700 μ lのBuffer RW1を添加して \geq 8,000 x gで15秒間遠心操作し、ろ液*を棄てます（コレクションチューブは捨てない）。ステップ16に進みます。

* Buffer RLT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。

13. 10 μ lのDNase Iストック溶液を70 μ lのBuffer RDDに添加する。チューブを転倒させて静かにミックスする。チューブの壁に残っている溶液を集めるために、軽く遠心操作する。

注：DNase Iは物理的変性に特に敏感です。チューブを静かに上下して混和させます。ボルテックスで混和しないでください。

14. DNase Iインキュベーション溶液（80 μ l）をRNeasy Spin Columnメンブレンにピペットで直接アプライし、実験台上（20～30℃）で15分間インキュベートする。

注：DNase Iインキュベーション反応液を直接RNeasy Spin Columnメンブレンに添加したことを確認してください。溶液の一部がスピncラムの壁やOリングについていると、DNase分解は不完全になります。

15. 350 μ lのBuffer RW1をRNeasy Spin Columnに添加する。蓋を静かに閉めて、20～25℃、8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心操作する。ろ液*を棄てる。コレクションチューブはステップ16で再使用します。

16. RNeasy Spin Columnに500 μ lのBuffer RPEを添加する。蓋を静かに閉めて、メンブレン洗浄のために20～25℃、8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心操作する。ろ液を棄てる。

コレクションチューブはステップ17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（“実験開始前の準備事項”を参照）。

17. RNeasy Spin Columnに500 μ lのBuffer RPEを添加する。蓋を静かに閉め、メンブレンを洗浄するため、20～25℃、8,000 x g（10,000 rpm）以上で2分間遠心操作する。

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、長時間の遠心操作でスピncラム・メンブレンを乾燥します。残留エタノールはダウンストリーム反応を妨害することがあります。

注：遠心操作後、RNeasy 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。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。

18. オプション：RNeasy Spin Columnを新しい2 mlコレクションチューブ（添付）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを棄てる。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17の後RNeasy Spin Columnの外側にろ液が残っている場合はこのステップを行ないます。

* 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。

19. RNeasy 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。30～50 μ lのRNaseフリー水をRNeasy Spin Columnメンブレンに直接添加する。蓋を静かに閉める。20～25℃、8,000 \times g以上（10,000 rpm以上）で1分間遠心操作を行ないRNAを溶出する。
20. さらに追加で30～50 μ lのRNaseフリー水、あるいはステップ19での溶出液を用いて（高濃度のRNAが必要な場合）ステップ19を再度行なう。ステップ19のコレクションチューブに溶出する。予想収量が>30 μ gの場合、ステップ19を繰り返す必要はない。

ステップ19の溶出液を用いた場合の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¹が、RNAの最終濃度は高くなります。

プロトコール：RNeasy Fibrous Tissue Midi Kitを用いて トータルRNAの精製

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 Fibrous Tissue Midi Kitを用いて、最高250 mgの組織を通常処理できます。ほとんどの組織でこれらの組織の量は、RNeasy Spin ColumnのRNA結合容量と、Buffer RLTおよびproteinase Kの溶解容量を超えることはありません。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）。

お客様のスタートサンプルの特性に関する情報がない場合には、100 mg以下の組織で実験を始めることを推奨します。組織サンプルからのRNA収量によっては、最高250 mgまで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 Spin Column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5 mmの立方体（125 mm³）の動物組織の重量は150～175 mgです。

実験を始める前の重要事項

- RNeasy Fibrous Tissue Kits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。またRNeasy Fibrous Tissue Midi Kitを使用する場合は、スイング型ローターにセットした15 ml遠心チューブを3,000～5,000 x gで遠心可能な遠心機が必要です（英語版Handbook 10ページの“Equipment and Reagents to Be Supplied by User”参照）。
- 初めてRNAを取り扱う方はAppendix A（英語版Handbook 30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）を参照にして装置を使用してください。
- Proteinase K分解を行なうためにRNaseを不活化するBuffer RLTを希釈しなければならぬため、RNaseの豊富な組織（脾臓あるいは腸）ではこのプロトコールを使用しないでください。
- 新鮮、凍結あるいはRNA laterで安定化した組織を使用できます。組織を凍結保存するためには、液体窒素で急激に凍結させ直ちに-70℃に移せば数カ月保存可能です。Buffer RLT中で破砕するまで、凍結した組織を重量測定や取り扱いの際に解凍させないでください。ステップ4でホモジナイズした組織ライセートは-70℃で数カ月間保存できます。ステップ5を行なう前に、凍結したライセートが完全に解凍し、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。

- 調製したDNase Iをボルテックスしないでください。DNase Iは物理的変性に特に敏感です。チューブを静かに転倒して混和させます。
- Buffer RLTは保存中に沈殿物を生じることがあります。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ので漂白剤を含んだ殺菌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。
- 特別な表記がない限り、この実験の全てのステップは室温で行なってください。操作は手早く進めてください。
- すべての遠心操作は20～25℃で行ないます。遠心機は20℃以下にならないように確認してください。

実験開始前の準備事項

- 使用前にβ-メルカプトエタノール（β-ME）を必ずBuffer RLTに添加してください。1 mlのBuffer RLT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は室温で最高1ヶ月間保存できます。

あるいは1 mlのBuffer RLT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は室温で最高1ヶ月間保存できます。

- Buffer RPEは濃縮溶液としてお届けします。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。
- RNase-Free DNase Setを初めて使用する場合は、まずDNase Iストック溶液を準備します。RNase-Free DNase Setの箱に入っているDNase I（1,500 Knitz units）を550 μlのRNase フリー水で溶解します。DNase I溶液の飛散を避けるために、容器を開けないでください。RNase フリーの注射針とシリンジを用いて容器にRNase フリー水を注入します。容器を逆さにして、静かに溶かしてください。ボルテックスで混和しないでください。

溶解したDNase Iを長期保存するためには、ガラス容器からストック溶液を取り出し、1回に使用する量を分注すると、-20℃で最高9ヶ月まで保存できます。解凍した溶液は2～8℃で6週間まで保存できます。凍結融解は繰り返さないでください。

操作手順

1. ステップ6で **proteinase K** 分解を行なうために、水浴あるいはヒートブロックを **55°C** にセットする。
2. **TissueLyser** 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 RNA Stabilization 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。
3. 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。サンプル組織の量を決める。**250 mg** 以上使用しない。すぐにステップ4に進む。

TissueLyser を使用する場合、最適な溶解を行なうためには **150 mg** 以下の組織を推奨します。臓器、組織の種類により、最高 **250 mg** の組織を処理可能です。

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。

RNA/later RNA Stabilization Reagent 中に保存している組織は、ピンセットで試薬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。

組織を **RNA/later RNA Stabilization Reagent** 処理するか、瞬間凍結、あるいはステップ4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。

4. **TissueRuptor**（ステップ4a）あるいは**TissueLyser**（ステップ4b）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 12ページの“Disrupting and homogenizing starting material”を参照ください。

注：β-メルカプトエタノール（β-ME）がBuffer RLTに添加されていることを確認してください（“実験開始前の準備事項”参照）。

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 Spin Columnの目詰まりの原因になります。**TissueRuptor** または**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。

- 4a. **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。**2 ml** のBuffer RLTを添加する。

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** のディスプレイブル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最高速度で操作する（通常**45～60**秒）。ステップ5に進む。

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、プローブの先端をバッファーに必ず沈めてください。

4b. TissueLyserを用いた破碎およびホモジナイゼーション：

- 組織をステップ2で準備したチューブに入れる。
- チューブをドライアイス上で保存した場合は、室温に置く。チューブあたり1 mlのBuffer RLT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3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をセットし20 Hzでさらに3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。Buffer RLTでサンプル容量を2 mlに調整する。ステップ5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。

5. 4 mlのRNaseフリー水をライセートに添加する。その後65 μ lのproteinase K溶液を添加し、ピペッティングにより完全に混和する。

6. 55°Cで20分間インキュベートする。

7. 20～25°C、3,000～5,000 x gで5分間遠心操作する。

組織残屑の小さいペレットと共に、上清の表面に薄膜あるいはフィルムが形成されることがあります。

8. 上清(約6 ml)を、新しい10～15 mlのチューブ(別途準備)にピペットで移す。

ペレットが混入しないように気をつけます。少量のペレットの混入であれば、RNeasy操作には影響しません。もし上清の表面に薄膜やフィルムが存在する場合には、薄膜やフィルムの下にピペットチップを入れます。この層は通常ピペットチップの外側に付着し、混入することはありません。

9. 清澄化ライセートに0.5容量(通常3 ml)のエタノール(96～100%)を加える。ピペッティングにより混和する。遠心操作は行なわない。

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。

10. 3 mlのサンプル(形成した沈殿物を含む)を15 mlコレクションチューブの中にセットしたRNeasy Midi Spin Columnにアプライする。蓋を静かに閉めて20～25°C、3,000～5,000 x gで5分間遠心する。ろ液*を棄てる。

コレクションチューブはステップ11で再使用します。

* Buffer RLT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。

11. 最初に 3 ml のサンプルで、次に残りのサンプル（約 3 ml）で、ステップ 10 を 2 回繰り返す。ろ液 * 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. 2 ml の Buffer RW1 を RNeasy Spin Column に添加する。蓋を静かに閉めて、20 ~ 25 °C、3,000 ~ 5,000 x g で 5 分間遠心し、メンブレンを洗浄する。ろ液 * 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。

オプション：カラム上での DNase 処理が必要でない場合には、代わりに 4 ml の Buffer RW1 を添加して 3,000 ~ 5,000 x g で 5 分間遠心操作し、ろ液 * を棄てます（コレクションチューブは捨てない）。ステップ 16 に進みます。

13. 20 µl の DNase I ストック溶液を 140 µl の Buffer RDD に添加する。チューブを転倒して静かにミックスする。チューブの壁に残っている溶液を集めるために、軽く遠心操作する。

注：DNase I は物理的変性に特に敏感です。チューブを静かに上下して混和させます。ボルテックスで混和しないでください。

14. DNase I インキュベーション溶液（160 µl）を RNeasy Spin Column メンブレンに直接アプライし、実験台上（20 ~ 30 °C）で 15 分間インキュベートする。

注：DNase I インキュベーション反応液を直接 RNeasy Spin Column メンブレンに添加したことを確認してください。溶液の一部がスピンカラムの壁やリングに付着していると、DNase 分解は不完全になります。

15. 2 ml の Buffer RW1 を RNeasy Spin Column に添加する。蓋を静かに閉めて 5 分間放置し、その後 20 ~ 25 °C、3,000 ~ 5,000 x g で 5 分間遠心する。ろ液 * を棄てる。

コレクションチューブはステップ 16 で再使用します。

16. RNeasy Spin Column へ 2.5 ml の Buffer RPE を添加する。蓋を静かに閉めて、20 ~ 25 °C、3,000 ~ 5,000 x g で 2 分間遠心し、メンブレンを洗浄する。ろ液を棄てる。

コレクションチューブはステップ 17 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（“実験開始前の準備事項”を参照）。

* Buffer RL1 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。

- 17. RNeasy Spin Columnへ2.5 mlのBuffer RPEを添加する。蓋を静かに閉めて、20～25℃、3,000～5,000 x gで5分間遠心し、メンブレンを洗淨する。**

RNA 溶出中にエタノールがキャリーオーバーしないように、長時間の遠心操作でスピナラム・メンブレンを乾燥します。残留エタノールはダウンストリーム反応を妨害することがあります。

注：遠心操作後、RNeasy 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。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。

- 18. RNeasy Spin Columnを新しい15 mlコレクションチューブ（添付）にセットする。150 µlのRNaseフリー水をRNeasy Spin Columnメンブレンに直接添加する。蓋を静かに閉める。1分間放置し、20～25℃、3,000～5,000 x gで3分間遠心操作を行ない、RNAを溶出する。**
- 19. さらに追加で150 µlのRNaseフリー水、あるいはステップ18での溶出液（高濃度のRNAが必要な場合）を用いてステップ18を再度行なう。ステップ18のコレクションチューブに溶出する。**

ステップ18の溶出液を用いた場合の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。RNAの最終濃度は高くなります。

トラブルシューティングガイド

コメント

RNeasy Spin Columnが目詰まり

- a) 破砕および／あるいはホモジナイゼーションが不十分
- 破砕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 12 ページ）を参照する。
- 必要に応じて遠心速度と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 11 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 11 ページを参照）。
- c) 遠心操作時の温度が低すぎる
- 遠心温度は 20～25℃に設定する。20℃に設定しても機械は 20℃以下になっている場合もある。これが沈殿物を形成し RNeasy Spin Column 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 Spin Column 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

- a) 不完全な破砕とホモジナイゼーション
- 破砕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 12 ページ）を参照する。
- 必要に応じて遠心速度と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（2 または 8 ページのプロトコール、および英語版 Handbook 11 ページを参照）、あるいは溶解バッファの量と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 11 ページを参照）。

コメント

- c) RNAがRNeasy Spin Columnにまだ結合
RNA溶出を再度行なうが、RNaseフリー水をRNeasy 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。
- d) エタノールのキャリーオーバー
二回目のBuffer RPEによる洗浄（6または13ページのステップ17）で、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kitでは20～25℃、8,000 x g（10,000 rpm）以上で2分間遠心操作、RNeasy Fibrous Tissue Midi Kitでは20～25℃、3,000～5,000 x gで5分間遠心操作して、RNeasy Spin Columnメンブレンを確実に乾燥する。遠心操作後、カラムがろ液と接触しないように気を付けて、カラムをコレクションチューブから取り除く。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る。

RNeasy Fibrous Tissue Mini Kitでエタノール混入の可能性を完全に排除するため、プロトコルのステップ18（6ページ）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分間の遠心操作する。

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 Spin Column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_{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 32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
最適な結果を得るには、組織サンプルをRNA_{later} RNA Stabilization Reagentで安定化し保存する（詳細はRNA_{later} Handbookを参照、日本語プロトコールとトラブルシューティングあり）。
- 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℃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 30ページ）および“Handling and storage of starting material”（英語版Handbook 12ページ）を参照。

コメント

- 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 30 ページ、Appendix Aを参照する。
- RNaseを使用したDNA調製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

- DNase処理していない プロトコールで指示されているように、RNase-Free DNase Setを用いてカラム上DNase分解を行なう。あるいはRNA精製後にDNase分解を行なう（英語版 Handbook 34 ページ、Appendix C）。
- リアルタイム2ステップRT-PCRを行なう場合、cDNA合成の際にゲノムDNA除去機能を持つQuantiTect® Reverse Transcription Kitを使用してRTステップをする。オーダーインフォメーションは英語版 Handbook 38 ページを参照。

RNAが続けて行なう実験で最適に作用しない

- a) 溶出の際に塩類が キャリーオーバー Buffer RPEは必ず20～30℃で使用する。
- b) エタノールのキャリーオーバー 二回目のBuffer RPEによる洗浄（6または13ページのステップ17）で、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kitでは20～25℃、8,000 x g（10,000 rpm）以上で2分間遠心操作、RNeasy Fibrous Tissue Midi Kitでは20～25℃、3,000～5,000 x gで5分間遠心操作して、RNeasy Spin Columnメンブレンを確実に乾燥する。遠心操作後、カラムがろ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除く。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る。
- RNeasy Fibrous Tissue 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18（6ページ）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。

Trademarks: QIAGEN®, RNeasy®, QuantiTect®, TissueRuptor™ (QIAGEN Group).
"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。
© 2002–2008 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

