

英語版 May 2009 に対応

---

# TissueLyser LT プロトコール

最高 12 生体サンプルの破碎



---

Sample & Assay Technologies

# 目次

<b>重要事項</b>	3
破砕およびホモジナイゼーションに関する一般的な注意事項	3
TissueLyser LT を用いた破砕およびホモジナイゼーション	3
Buffer RLT Plus を用いた破砕およびホモジナイゼーション	6
<b>プロトコール</b>	
動物およびヒト組織からの RNA あるいは複数の分析物の精製	7
植物組織からの RNA 精製	9
バクテリアからの RNA 精製	11
酵母からの RNA 精製	12
動物およびヒト組織からの DNA 精製	13
植物組織からの DNA 精製	14
動物およびヒト組織からのタンパク質精製	16

## 重要事項

### 破碎およびホモジナイゼーションに関する一般的な注意事項

スタートサンプルの効率的な破碎とホモジナイゼーションは、全ての核酸精製にとって非常に重要です。破碎とホモジナイゼーションは 2 つの異なるステップです。

- **破碎**：細胞壁および細胞や細胞小器官の形質膜を完璧に破碎することは、サンプルに含まれている核酸をすべて遊離するために必須です。完璧にサンプルを破碎するためには、サンプルの種類ごとに異なる破碎法が必要です。破碎が不十分な場合、DNA や RNA の収量が大幅に低下します。
- **ホモジナイゼーション**：破碎により作製した細胞ライセートの粘性を減らすためにホモジナイゼーションが必要です。ホモジナイゼーションにより炭水化物が剪断され、均一なライセートになります。ホモジナイゼーションが不完全な場合、核酸が QIAGEN シリカメンブレンや磁性粒子に効果的に結合しないため、DNA および RNA 収量が顕著に低下します。

細胞破碎は核酸精製における最も重要なステップの一つです。物理的な剪断なしに溶解バッファーだけで破碎すると、内因性の DNase および RNase により核酸が分解されることがあります。破碎が不完全な場合、ヌクレアーゼを不活性化する溶解バッファーが細胞内の核酸に作用できません。さらに、破碎されていない細胞片は、収量の低下に繋がり、精製カラムの目詰まりの危険性が増大します。サンプル破碎後は微粒子が観察されない状態にしてください（結合組織、骨、繊維質の植物組織のような硬い非細胞成分を含むサンプルを破碎した場合を除く）。QIAGEN キットおよびプロトコールには、DNA、RNA およびタンパク質の収量および品質を最大にするための最適なサンプル破碎およびホモジナイゼーション法に関するアドバイスが記載されています。

### TissueLyser LT を用いた破碎およびホモジナイゼーション

ビーズミル内では、ビーズと一緒に迅速に攪拌することにより細胞および組織が破碎されます。サンプルとビーズが衝突するため、ビーズの剪断および圧搾作用により破碎とホモジナイゼーションが同時に起こります。以下の要素が破碎効率に影響します：

- ビーズのサイズと材質
- バッファー量とサンプル体積の比率（バッファーを使用する場合）
- スタートサンプルの量
- TissueLyser LT の設定（速度、破碎時間）
- サンプルの硬度
- 破碎容器の種類
- サンプルの温度

## 破碎およびホモジナイゼーション法

TissueLyser LTを QIAGEN の精製用キットと組み合わせて使用する場合、次の 2 つの方法のいずれかで破碎およびホモジナイゼーションを行ないます：

- サンプルを溶解バッファー中で破碎し、ホモジナイズします。新鮮あるいは液体窒素で凍結した動物およびヒト組織用には、サンプルチューブおよび組織サンプルを前もってドライアイスで冷却します。Allprotect Tissue Reagent あるいは、RNAlater<sup>®</sup> RNA Stabilization Reagent 中で適切に安定化され保存されている動物およびヒト組織に関しては、この冷却操作は不要です。
- サンプルを前もって30分以上ドライアイスで冷却した後、溶解バッファーを添加せずに破碎とホモジナイズを行ないます。破碎とホモジナイゼーションの後に溶解バッファーを添加します。サンプルを前もって冷却する場合は、適切な量のサンプルおよび粉碎用ビーズを含むサンプルチューブと同様、TissueLyser LT Adapter のインサート（12 アルミニウムチューブホルダー）もドライアイスで冷却します。

**重要：** TissueLyser LT Adapter を使用する場合は、チューブが破損することがあるため、Adapter やサンプルチューブを液体窒素中で凍結しないでください。

**注：** TissueLyser LT を用いた破碎とホモジナイズの後、細胞片がサンプルチューブの蓋に付着することがあります。従って、サンプルチューブの蓋を開ける前に、スピンドウンすることをお奨めします。

### ビーズの選択

ヒト/動物/植物の組織の破碎には、5~7 mm（平均直径）のステンレススチール製ビーズが最適です。破碎されにくい組織の場合には、破碎効率をよくするために 5 mm のビーズではなく 7 mm のビーズの使用を推奨します。バクテリア細胞の破碎には、0.1~0.6 mm（平均直径）、酵母や単細胞の動物細胞では 0.5 mm のガラスビーズが最適です。ガラスビーズは必ず使用前に濃硝酸で洗浄して前処理してください\*。前処理（酸による洗浄）済みのビーズは様々なメーカーから購入できます（例；Sigma, cat. nos. G1145、G1277 および G8772<sup>†</sup>）。本ハンドブックに記載されていないサンプルの破碎パラメーターは実験により決定しなければなりません。

\* 試薬類を取り扱う際には適切な実験着、使い捨て手袋、保護眼鏡を常に着用してください。詳細は製品メーカーの対応する MSDS(material safety data sheet)をご覧ください。

† ここには一部の主要メーカーしか記載されていません。

## TissueLyser LT の取り扱い

TissueLyser LT Adapter を TissueLyser LT のピストンにしっかりと固定します。詳細は英語版 TissueLyser LT User Manual（日本語版ユーザーマニュアルあり）を参照してください。

破碎は高速（最高 50 Hz）の振蕩で行ないます。スタートサンプルや精製する物質により異なりますが、通常 40 秒～5 分間、30～50 Hz の破碎で DNA、RNA、タンパク質の遊離が可能です。

12 個未満のサンプルを処理する場合は、TissueLyser LT Adapter（図 1 参照）のバランスを取ることが重要です。これを行なわないと Adapter の蓋がねじれます。1 サンプルあるいは 11 サンプルを処理する場合は、TissueLyser LT Adapter のバランスを取るために、空のサンプルチューブを準備してセットします。

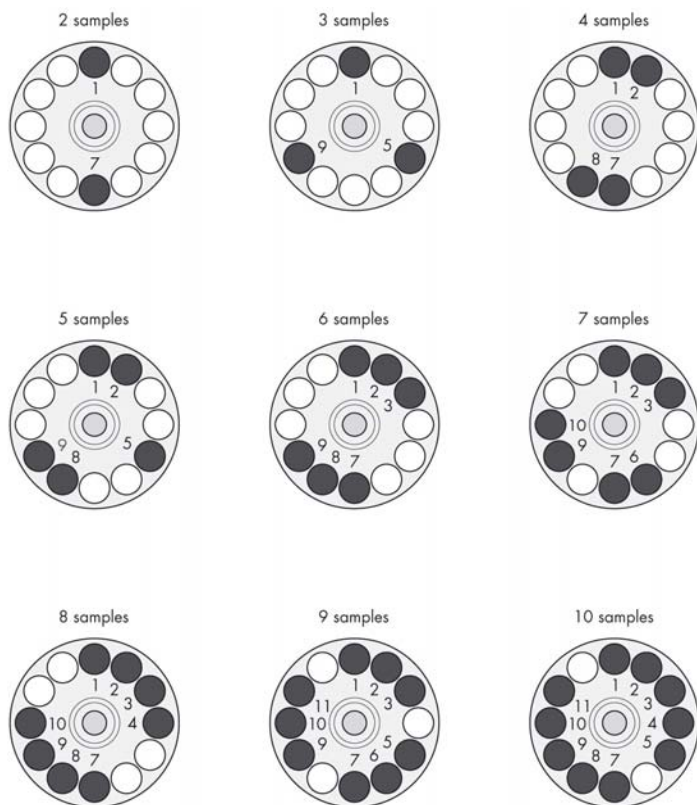


図 1. TissueLyser LT Adapter のセット

上図のようにサンプルをアブライして TissueLyser LT Adapter のバランスを取る。

## Buffer RLT Plus を用いた破碎およびホモジナイゼーション

RNeasy Plus Kit およびいくつかの AllPrep<sup>®</sup> Kit には Buffer RLT Plus が付いています。このバッファーは、最適なサンプル溶解および、gDNA Eliminator Column あるいは AllPrep DNA Column への DNA の最適な結合条件を実現します。Buffer RLT Plus 中で組織を破碎、ホモジネートすると、泡が過剰に生じることがあります。破碎とホモジナイゼーションの前に最終濃度が 0.5% (v/v) になるように Reagent DX を Buffer RLT Plus に添加すると、泡の発生を抑えられます。Reagent DX を RNeasy Plus Kit および AllPrep Kit で十分に検証した結果、RNA 純度あるいはリアルタイム RT-PCR のようなダウンストリームアプリケーションへの影響がありませんでした。Reagent DX を含む Buffer RLT Plus は、室温 (15~25°C) で少なくとも 9 ヶ月は保存できます。Reagent DX は別売りです; 英語版 Handbook 33 ページ ordering information を参照してください。

# プロトコール：動物およびヒト組織からの RNA あるいは複数の分析物の精製

このプロトコールはRNA精製、DNAとRNA精製、あるいはDNA、RNA、タンパク質を同時精製するための動物やヒト組織の破碎に関するガイドラインを示しています。QIAGENのサンプル精製キット(英語版Handbook 7、8、10 ページのTable 1、2、6)を用いる場合にはキットに添付のHandbookを参照ください。サンプル破碎および精製に関するプロトコールがすべて記載されています(日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり)。

## 実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に 3 ページの“重要事項”をお読みください。
- TissueLyser LT User Manual (日本語版ユーザーマニュアルあり)を参照して、TissueLyser LT の取り扱いを確認してください。
- QIAGEN のサンプル精製キットを使用する場合には、事前にハンドブックをお読みください。
- RNAlater RNA Stabilization Reagent あるいは Allprotect Tissue Reagent 中で保存した組織は多少硬くなります。Buffer RLT 中で破碎する場合には、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) のプロトコールに従ってこのバッファー量を増やすことを推奨します。さらに、破碎時間の延長が必要になることがあります。
- 破碎されにくいサンプルの場合、破碎効率を良くするために 5 mm のステンレススチール製ビーズ 1 個ではなく 7 mm のステンレススチール製ビーズを 1 個か 2 個の使用を推奨します。

## 操作手順

1. ステンレススチール製ビーズ (平均直径 5 mm) 1 個が入った 2 ml のマイクロ遠心チューブをドライアイスで 15 分以上冷却する。TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)を室温 (15~25°C) に置く。
2. 30 mg までの新鮮あるいは冷凍組織を、冷却済みチューブに入れ、ドライアイスでさらに 15 分間インキュベートする。

RNAlater RNA Stabilization Reagent あるいは Allprotect Tissue Reagent で安定化した組織サンプルを取り扱う場合は、ドライアイスで冷却する必要はありません。
3. TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)にチューブをセットする。ステップ 4 での溶解バッファーの凍結を回避するため、室温で 2 分間インキュベートする。

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。

4. 各チューブに適切な量の溶解バッファー(例; Buffer RLT、Buffer RLT Plus、QIAzol Lysis Reagent)を即座に添加する。

注： Buffer RLT Plus を用いる場合には、泡が過剰に発生するのを回避するために Reagent DX を添加することを推奨します。詳細は 6 ページの“Buffer RLT Plus を用いた破碎およびホモジナイゼーション”を参照ください。

5. サンプルチューブのに入ったインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)を、TissueLyser LT に装着された TissueLyser LT Adapter のベースにセットする。インサートの上から TissueLyser LT Adapter の蓋をして、蓋が完全に閉まるまでノブを締める。

6. TissueLyser にセットして 50 Hz で 2~5 分間破碎する。

破碎およびホモジナイゼーション時間は、処理する組織により異なりますが、組織片が見えなくなるまで延長することができます。

繊維性組織を処理する場合、完全に破碎およびホモジナイズすることが不可能な場合があります。しかし、少量の破片は QIAGEN キットを用いた RNA 精製に影響はなく、Proteinase K 処理で通常は分解されます。

7. RNA、DNA/RNA、DNA/RNA/タンパク質の精製を続けて行なう。

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。



# プロトコール：植物組織からの RNA 精製

このプロトコールは RNA 精製を行なうための植物組織の破碎に関するガイドラインを示しています。RNA 精製に QIAGEN キット(英語版 Handbook 9 ページ、Table 3)を用いる場合にはキットに添付の Handbook を参照ください。サンプル破碎および RNA 精製に関する全プロトコールが記載されています(日本語版プロトコールとトラブルシューティングあり)。

## 実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に 3 ページの“重要事項”をお読みください。
- TissueLyser LT User Manual (日本語版ユーザーマニュアルあり)を参照して、TissueLyser LT の取り扱いを確認してください。
- QIAGEN の RNA 精製キットを使用する場合には、キットに添付の Handbook を事前に読んでください。
- ハナタバコやシロイヌナズナなどの植物の軟らかく新鮮な組織では、溶解バッファー中での破碎およびホモジナイゼーションが多くの場合可能です。硬い組織(例:木質植物)は凍結および凍結条件下での破碎が必要ことがあります。
- 破碎されにくいサンプルの場合、破碎効率を良くするために 5 mm のステンレススチール製ビーズ 1 個ではなく 7 mm のステンレススチール製ビーズを 1 個か 2 個の使用を推奨します。

## 操作手順

1. ステンレススチール製ビーズ(平均直径 5 mm)1 個が入った 2 ml のマイクロ遠心チューブを TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)に入れる。ドライアイスで 30 分以上インキュベートする。
2. 新鮮な植物サンプルの量を計る。100 mg 以上のサンプルは使用しない。  
組織サンプルの計量が、組織量を決定する最も正確な方法です。
3. 計量した組織を、冷却済みチューブに入れて、ドライアイスでさらに 30 分間インキュベートする。

あるいは、冷却済みのチューブに移す前に植物組織を液体窒素で瞬間凍結することも可能です。この場合、2 回目の 30 分間のドライアイスでのインキュベーションは不要です。

注：チューブが破損することがあるため、アダプターとチューブを液体窒素中で凍結しないでください。

4. サンプルチューブの入った冷却済みのインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)を、TissueLyser LT 上に装着された TissueLyser LT Adapter のベースにセットする。インサートの上から TissueLyser LT Adapter の蓋をして、蓋が完全に閉まるまでノブを締める。

**5. TissueLyser LT ですぐに 50 Hz、2~5 分間破碎する。**

**注：**破碎およびホモジナイゼーション時間は、処理する組織により異なりますが、組織片が見えなくなるまで延長することができます。TissueLyser LT を 2 分間以上操作する場合は、2 分ごとに装置をストップし、TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)とサンプルチューブをドライアイス上で数分間冷却します。これにより、RNA 収量や品質の低下の原因となるサンプルの解凍を回避することができます。

**6. TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)からサンプルチューブを取り外す。室温 (15~25°C)で 1 分間インキュベートすることにより、ステップ 7 での溶解バッファーの凍結を回避する。**

組織が解凍し RNA 分解の要因になるので 1 分間以上のインキュベートは行なわないでください。

**7. 各チューブに適切な量の溶解バッファー(例; Buffer RLT、Buffer RLC)を添加し、RNA 精製を行なう。**

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。

## プロトコール：バクテリアからの RNA 精製

このプロトコールは RNA 精製を行なうためのバクテリア破碎に関するガイドラインを示しています。RNA 精製に RNeasy Protect Bacteria Kit (英語版 Handbook 9 ページ、Table 3) を用いる場合には添付の RNAprotect® Bacteria Reagent 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) を参照ください。サンプル破碎および RNA 精製に関する全プロトコールが記載されています。

### 実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に 3 ページの“重要事項”をお読みください。
- TissueLyser LT User Manual (日本語版ユーザーマニュアルあり) を参照して、TissueLyser LT の取り扱いを確認してください。
- RNA 精製に RNeasy Protect Bacteria Kit を使用する場合には、キットに添付の Handbook を事前に読んでください。
- ビーズミルはほとんどのグラム陽性菌およびマイコバクテリアを含むグラム陰性菌を破碎します。グラム陽性菌は、グラム陰性菌よりも過酷な分解条件 (例 ; 酵素分解時間の延長や温度の上昇) および機械的な処理を通常必要とします。詳細は RNAprotect Bacteria Reagent Handbook を参照ください。

### 操作手順

1. 遠心操作によりバクテリア細胞をペレット化する。各チューブに適切な量の溶解バッファー (例 ; Buffer RL1) を即座に添加し、激しくボルテックスする。
2. 酸で洗浄済みの 25~50 mg ガラスビーズ (平均直径 150~600  $\mu\text{m}$ ) が入った 2 ml マイクロ遠心チューブに各サンプルを移す。
3. TissueLyser LT Adapter のインサート (12 アルミニウムチューブホルダー) にチューブを入れる。
4. サンプルチューブの入ったインサート (12 アルミニウムチューブホルダー) を、TissueLyser LT 上に装着された TissueLyser LT Adapter のベースにセットする。インサートの上から TissueLyser LT Adapter の蓋をして、蓋が完全に閉まるまでノブを締める。
5. TissueLyser で 50 Hz、5 分間破碎する。  
破碎およびホモジナイゼーション時間は、処理するサンプルにより異なりますが、塊が見えなくなるまで延長できます。
6. RNA 精製を続けて行なう。

# プロトコール：酵母からの RNA 精製

このプロトコールは RNA 精製を行なうための酵母細胞破碎に関するガイドラインを示しています。RNA 精製に RNeasy Mini Kit（英語版 Handbook 9 ページ、Table 3）を用いる場合にはキットに添付の 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）を参照ください。サンプル破碎および RNA 精製に関するプロトコールがすべて記載されています。

## 実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に 3 ページの“重要事項”をお読みください。
- TissueLyser LT User Manual（日本語版ユーザーマニュアルあり）を参照して、TissueLyser LT の取り扱いを確認してください。
- RNA 精製に RNeasy Mini Kit を使用する場合には、キットに添付の Handbook を事前に読んでください。

## 操作手順

1. 遠心操作により酵母細胞をペレット化する。各チューブに適切な量の溶解バッファー（例；Buffer RLT）を即座に添加し、激しくボルテックスする。
2. 酸で洗浄済みの 600  $\mu$ l ガラスビーズ（平均直径 450~550  $\mu$ m）が入った 2 ml マイクロ遠心チューブに各サンプルを移す。
3. TissueLyser LT Adapter のインサート（12 アルミニウムチューブホルダー）にチューブを入れる。
4. サンプルチューブの入ったインサート（12 アルミニウムチューブホルダー）を、TissueLyser LT 上に装着された TissueLyser LT Adapter のベースにセットする。インサートの上から TissueLyser LT Adapter の蓋をして、蓋が完全に閉まるまでノブを締める。
5. TissueLyser で 50 Hz、5 分間破碎する。  
破碎およびホモジナイゼーション時間は、処理するサンプルにより異なりますが、塊が見えなくなるまで延長できます。
6. RNA 精製を続けて行なう。

# プロトコール：動物およびヒト組織からの DNA 精製

このプロトコールはDNA精製を行なうための動物およびヒト組織の破碎に関するガイドラインを示しています。

## 実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に 3 ページの“重要事項”をお読みください。
- TissueLyser LT User Manual（日本語版ユーザーマニュアルあり）を参照して、TissueLyser LT の取り扱いを確認してください。
- QIAGEN の DNA 精製キットを使用する場合には、キットに添付の Handbook および適切なプロトコールを事前に読んでください。
- 破碎されにくいサンプルの場合、破碎効率を良くするために 5 mm のステンレススチール製ビーズ 1 個ではなく 7 mm のステンレススチール製ビーズを 1 個か 2 個の使用を推奨します。

## 操作手順

1. ステンレススチール製ビーズ（平均直径 5 mm）1 個が入った 2 ml のマイクロ遠心チューブをドライアイスで 15 分以上冷却する。TissueLyser LT Adapter のインサート（12 アルミニウムチューブホルダー）を室温に置く（15～25℃）。
2. 25 mg までの新鮮あるいは冷凍組織を、冷却済みチューブに入れて、ドライアイスでさらに 15 分間インキュベートする。
3. TissueLyser LT Adapter のインサート（12 アルミニウムチューブホルダー）にチューブをセットする。ステップ 4 で溶解バッファの凍結を回避するため、室温で 2 分間インキュベートする。

組織が解凍し DNA 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。

4. 各チューブに適切な量の溶解バッファ（例；Buffer ATL）を即座に添加する。
5. サンプルチューブの入ったインサート（12 アルミニウムチューブホルダー）を、TissueLyser LT Adapter のベースにセットし、TissueLyser LT に装着する。インサートの上から TissueLyser LT Adapter の蓋をして、蓋が完全に閉まるまでノブを締める。
6. TissueLyser で 30 Hz、40 秒間破碎する。

注：組織の種類によっては、このホモジナイゼーション時間および破碎強度を超えると、ゲノム DNA の切断化が顕著に増加することがあります。しかし、破碎しにくい組織では破碎効率を改善するため、ホモジナイゼーション時間の延長および/あるいは破碎強度を強くする必要があるかもしれません。繊維性組織を調製する場合には、破碎開始前に組織を小さくカットすると破碎効率がよくなります。

7. DNA 精製を続けて行なう。

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。

# プロトコール：植物組織からの DNA 精製

このプロトコールはDNA精製を行なうためにTissueLyser LTを用いた植物組織の破碎に関するガイドラインを示しています。DNA精製にQIAGENキット(英語版 Handbook 10 ページ、Table 5)を用いる場合には添付のHandbookを参照ください。サンプル破碎およびDNA精製に関するプロトコールがすべて記載されています。

## 実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に 3 ページの“重要事項”をお読みください。
- TissueLyser LT User Manual (日本語版ユーザーマニュアルあり)を参照して、TissueLyser LT の取り扱いを確認してください。
- QIAGENのDNA精製キットを使用する場合には、実験開始前にキットに添付のHandbookを事前に読んでください。
- 破碎されにくいサンプルの場合、破碎効率を良くするために 5 mm のステンレススチール製ビーズ 1 個ではなく 7 mm のステンレススチール製ビーズを 1 個か 2 個の使用を推奨します。

## 操作手順

1. ステンレススチール製ビーズ(平均直径 5 mm)1 個が入った 2 ml のマイクロ遠心チューブを TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)に入れる。ドライアイスで 30 分以上インキュベートする。
2. 新鮮な植物サンプルの量を決める。100 mg 以上のサンプルは使用しない。組織サンプルの計量が、組織量を決定する最も正確な方法です。
3. 計量した組織を、冷却済みチューブに入れて、ドライアイスでさらに 30 分間インキュベートする。

あるいは、冷却済みのチューブに移す前に植物組織を液体窒素で瞬間凍結することも可能です。この場合、2 回目の 30 分間のドライアイスでのインキュベーションは不要です。

注：チューブが破損することがあるため、アダプターとチューブを液体窒素中で凍結しないでください。

4. サンプルチューブの入った冷却済みのインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)を、TissueLyser LT 上に装着された TissueLyser LT Adapter のベースにセットする。インサートの上から TissueLyser LT Adapter の蓋をして、蓋が完全に閉まるまでノブを締める。

## 5. TissueLyser LT ですぐに 50 Hz、2 分間破碎する。

注：組織の種類によっては、このホモジナイゼーション時間および破碎強度を超えると、ゲノム DNA の切断化が顕著に増加することがあります。しかし、破碎しにくい組織では破碎効率を改善するため、ホモジナイゼーション時間の延長および/あるいは破碎強度を強くする必要があるかもしれません。TissueLyser LT を 2 分間以上操作する場合は、2 分ごとに装置をストップし、TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)とサンプルチューブをドライアイス上で数分間冷却します。これにより、DNA 収量や品質の低下の原因となるサンプルの解凍を回避することができます。

## 6. TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)からサンプルチューブを取り外す。ステップ 7 で溶解バッファーの凍結を回避するため、室温 (15~25°C)で 1 分間インキュベートする。

組織が解凍し DNA 分解の要因になるので、1 分間以上のインキュベートは行わないでください。

## 7. 各チューブに適切な量の溶解バッファー(例 ; Buffer AP1)を添加し、DNA 精製を行なう。

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。

# プロトコール：動物およびヒト組織からのタンパク質精製

このプロトコールは、タンパク質精製を行なうための動物およびヒト組織の破碎に関するガイドラインを示しています。

## 実験を始める前の重要事項

- 操作を始める前に 3 ページの“重要事項”をお読みください。
- TissueLyser LT User Manual（日本語版ユーザーマニュアルあり）を参照して、TissueLyser LT の取り扱いを確認してください。
- QIAGEN のサンプル精製キットを使用する場合には、キットに添付の Handbook を事前にお読みください。
- Allprotect Tissue Reagent 中で保存した組織は多少硬くなります。破碎時間の延長が必要になることがあります。
- 破碎されにくいサンプルの場合、破碎効率を良くするために 5 mm のステンレススチール製ビーズ 1 個ではなく 7 mm のステンレススチール製ビーズを 1 個か 2 個の使用を推奨します。

## 操作手順

1. ステンレススチール製ビーズ(平均直径 5 mm)1 個が入った 2 ml のマイクロ遠心チューブをドライアイスで 15 分以上冷却する。TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)を室温に置く(15~25℃)。
2. 30 mg までの新鮮あるいは冷凍組織を、冷却済みチューブに入れて、ドライアイスでさらに 15 分間インキュベートする。

Allprotect Tissue Reagent で安定化した組織サンプルを取り扱う場合は、ドライアイスで冷却する必要はありません。

3. TissueLyser LT Adapter のインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)にチューブをセットする。ステップ 4 で溶解バッファーの凍結を回避するため、室温で 2 分間インキュベートする。

組織が解凍しタンパク質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なわないでください。

4. 各チューブに適切な量の溶解バッファー(例; Mammalian Cell Lysis Buffer)を即座に添加する。
5. サンプルチューブの入ったインサート(12 アルミニウムチューブホルダー)を、TissueLyser LT 上に装着された TissueLyser LT Adapter のベースにセットする。インサートの上から TissueLyser LT Adapter の蓋をして、蓋が完全に閉まるまでノブを締める。



**6. TissueLyser で 50 Hz、2～5 分間破碎する。**

破碎およびホモジナイゼーション時間は、処理する組織により異なりますが、組織片が見えなくなるまで延長できます。

**7. タンパク質精製を続けて行なう。**

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。

— Memo —

---



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

“RNAlater<sup>®</sup>” 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使用することはできません。

© 2009 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

