

3-XI-i 章

動物血液からの total RNA分離

RA-a-1

白血球からの total DNA分離

プロトコル

溶血後の白血球を 1.5 ml マイクロチューブ中にペレット化する
(白血球の最大数は 1.5×10^7 個)

↓
チューブをピペティングしてペレットをほぐす

← LRB (2-ME 添加済み) *1 : 520 μ l

ボルテックスでよく混ぜる : 30 秒 (最大回転数)
軽くスピンドウン

← >99% エタノール : 250 μ l

ボルテックスでよく混ぜる : 5 分 (最大回転数) *2
軽くスピンドウン

ライセート完成

↓
QuickGene のカートリッジへ全量添加

↓
使用装置の分離プロトコル参照
QuickGene-810、p.4-5 へ
QuickGene-Mini80、p.4-12 へ

↓
total RNA 回収 (回収液量 : 50 μ l)

*1 1 ml の LRB 当たり 10 μ l の 2-ME を添加してください。

*2 ボルテックス時にビーズ (ジルコニア 5mm ϕ) 1 個を入れると、より効果的にホモジナイズできます。その際には 2 ml マイクロチューブを御利用ください。

結果

電気泳動図

データなし

total RNA の収量

	白血球の数	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社) *1	自動磁気ビーズ法 *2
DNase 処理あり	2×10^6	0.6	0.4	0.7
	1×10^7	4.5	3.8	-
	1.5×10^7	6.5	-	-
DNase 処理なし	1.0×10^7	5.0	4.2	-

*1 : スピнкаラム法に対しては白血球の最大数は 1×10^7

*2 : 自動磁気ビーズ法に対しては白血球の最大数は 2×10^6

タンパク質の混入 : A260/280

	白血球の数	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社) *1	自動磁気ビーズ法 *2
DNase 処理あり	2×10^6	2.20	2.04	2.46
	1×10^7	2.21	2.09	-
	1.5×10^7	2.10	-	-
DNase 処理なし	1.0×10^7	2.17	2.10	-

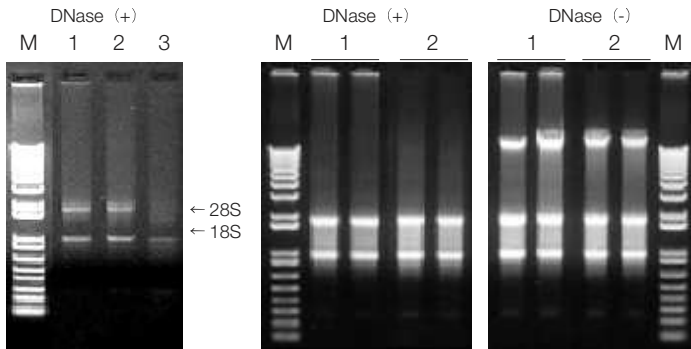
*1 : スピнкаラム法に対しては白血球の最大数は 1×10^7

*2 : 自動磁気ビーズ法に対しては白血球の最大数は 2×10^6

Total RNA の電気泳動

白血球の数 : 2×10^6

白血球の数 : 1×10^7



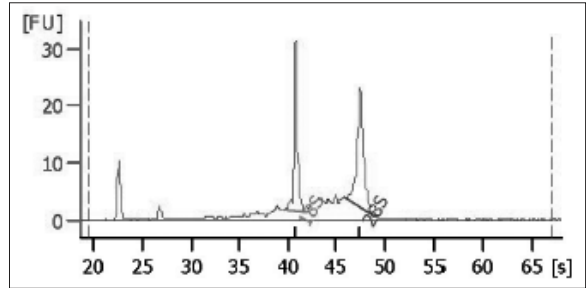
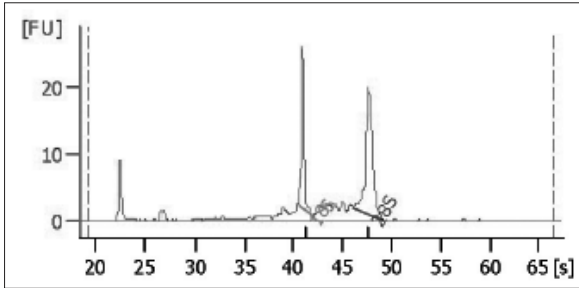
電気泳動条件 : 1% アガロース / $1 \times$ TAE

M : マーカー
(1Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)
1 : QuickGene
2 : スピンカラム法 (A社)
3 : 自動磁気ビーズ法

Total RNA の品質 (DNase 処理あり)

QuickGene (白血球の数 : 1×10^7)

スピンカラム法 (A社) (白血球の数 : 1×10^7)

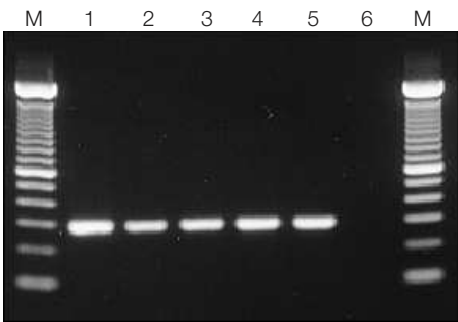


	白血球の数	QuickGene	スピンカラム法 (A社)	自動磁気ビーズ法
RIN	2×10^6	7.7	6.5	5.0
	1×10^7	9.2	8.8	-
28S / 18S	2×10^6	1.5	0.8	0.0
	1×10^7	1.6	1.2	-

RIN (RNA integrity number : アジレント (Agilent)) : アレイ等に対し利用できる RNA 品質の指標になる値 最良値 : RIN=10

その他

• RT-PCR



M : マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)
1 : ポジティブコントロール
2,3 : QuickGene
4,5 : スピンカラム法 (A社)
6 : ネガティブコントロール

• リアルタイム PCR

$1\mu\text{g}$ の total RNA 当たりの GAPDH コピー数 (1×10^7 個の白血球からの分離に対して)

QuickGene	3.15×10^7
スピンカラム法 (A社)	1.11×10^7

使用機種 : リアルタイム PCR システムライトサイクラー (Roche)
使用試薬 : LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I
LightCycler ヒト GAPDH プライマーセット

共通プロトコルサンプル

データなし

