

RNA培養細胞HCキット編

QuickGene RNA cultured cell HC kit S (RC-S2)



このシートは、培養細胞からtotal RNAを抽出する手順を、キットハンドブック・取扱説明書からダイジェストしたものです。ご使用前には、キットハンドブック・取扱説明書をよく読み、正しくご使用ください。



適切な保護手袋、および保護めがねを着用して作業を行ってください。

step1 準備

目的のtotal RNA抽出を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備

QuickGene-810 RNA培養細胞HCキット	マイクロピペット	遠沈管 ~16サンプルの場合 15ml 50ml ~72サンプルの場合 50ml 175ml
特級エタノール (>99%) 2-メルカプトエタノール	マイクロチューブ	チューブミキサー
簡易卓上遠心機 手袋		または
ホモジナイザー		または
		ホモジナイザーには、機種ごとに対応するチューブやビーズをお使いください。
		DNase (step1-2参照) ★オプション

2 試薬の準備◆ **溶解液 (LRP)**

使用前に十分に混和してください。折出物が生じた場合は、37℃で溶解してください。

必要量を分注し、LRP 1mlあたり10μlの2-メルカプトエタノール (2-ME) を添加してください。

1サンプルあたり、350μl (後述プロトコルA)、600μl (プロトコルB) または800μl (プロトコルB') を使用します。

※ 温度の高いところで使用しないでください。漂白剤を含む消毒薬と混ぜないでください。

◆ **可溶化液 (SRP)**

使用前に十分に混和してください。

◆ **洗浄液 (WRP)**

未開封のWRPボトルに特級エタノール (>99%) を40ml添加・混合してください。
エタノール添加後は、フタをきちんと閉めて室温で保存してください。

◆ **回収液 (CRP)**

核酸溶出時には、必ずCRPを使用してください。

◆ DNaseを使用する場合の推奨品と調製方法

DNase処理される場合は、下表にしたがい調製してください。（下記は、1カートリッジあたりの容量です）
DNase溶液は、使用直前に調製し、すぐにご使用ください。

製品名	メーカー名	Cat.No.	調製方法	終濃度
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	M6101	1	20U/40µl
DNase I, Amplification Grade	Invitrogen	18068-015		
DNase I, Amplification Grade	Sigma	AMP-D1		
Deoxyribonuclease (RT Grade)	ニッポンジーン	313-03161		
DNase I, RNase-Free	Ambion	2222	2	40U/40µl
RNase-Free DNase Set ^{※1}	QIAGEN	79254	3	3.4Kunitz units/40µl

調製方法 1		調製方法 2		調製方法 3	
1U/µl DNase I	20µl	2U/µl DNase I	20µl	2.7Kunitz units/µl DNase I ^{※2}	1.25µl
10× Reaction Buffer	4µl	10× Reaction Buffer	4µl	Buffer RDD	35µl
ヌクレアーゼフリー水	16µl	ヌクレアーゼフリー水	16µl	ヌクレアーゼフリー水	3.75µl

※1：1,500Kunitz unitsの入ったボトルに添付の550µl RNaseフリー水を添加後、DNaseストック溶液を調製してください。（DNase添付の取扱説明書も参照してください）

※2：QIAGEN社プロトコルどおりにDNase溶液を調製すると、DNase活性が過剰となる可能性があります。上記条件でのDNase溶液調製をおすすめします。

3 自動核酸抽出システムQuickGene-810のパラメータ変更

本キットのハンドブックを参照し、ご使用にならない抽出モードでパラメータの変更を行い、本キット用のモードを設定してください。

4 プロトコール選択

ディッシュサイズと細胞数により、下記表より最適なプロトコール選択し、作業を行ってください。

ディッシュサイズ	細胞の例		対応プロトコール
	細胞種 ^{※1}	細胞数 (×10 ⁶ 個)	
6 cm	HeLa	1.5~3.5	A (→ step2-1 プロトコール Aへ)
	HEK293	3.0~5.0	
	COS-7	0.5~1.5	
	NIH/3T3	1.0~2.5	
	HL60 ^{※2}	3.0~5.0	
10 cm	HeLa	3.5~5.5	B (→ step2-2 プロトコール Bへ)
	HEK293	5.0~8.0 ^{※3}	
	COS-7	2.0~3.0	
	NIH/3T3	3.0~5.0	
	HL60 ^{※2}	5.0~15	B' (→ step2-3 プロトコール B'へ)
	HEK293	8.0~15 ^{※3}	

※1：記載のない細胞種から抽出される場合は、6cmディッシュのサブコンフルエント相当の細胞数から抽出を開始し、最適な細胞数をご検討ください。
細胞種によっては細胞数を増やすことが可能ですが、目詰まりを起こす可能性がありますので、過剰量の細胞数の処理は避けてください。

※2：浮遊細胞の場合は各ディッシュサイズに相当する培養液量で培養した時の細胞数を示しています。

※3：8.0×10⁶個を超える細胞数をディッシュ上で直接溶解する場合は、プロトコールB'を使用してください。
ペレット化する場合は、15×10⁶個までプロトコールBで処理できます。

対応するプロトコールを行います。

step2-1 プロトコール A

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

適切な細胞数でない場合、顕著な収量減少、精度低下、または目詰まりを起こす可能性があります。
目詰まりした場合は、細胞数を減らしてご検討ください。

1 別紙1 洗浄液、回収液の必要量

別紙1を参照し、必要な洗浄液、および回収液を遠沈管に注入し、セットします。

6cmディッシュ上で 直接溶解する場合（接着細胞）

2 ディッシュ内の細胞培養液をできる限り 吸引除去

- 1) サンプル数分のLRPと2-MEの混合液を調製します。（LRP 1mlあたり2-ME 10 μ l）
- 2) 細胞培養液はフラスコまたはディッシュから可能な限り吸引除去します。

3 LRP（2-ME添加済み）を添加し、細胞を溶解

- 1) 350 μ lのLRP（2-ME 添加済み）をフラスコまたはディッシュに加え、セルスクレイパーなどで細胞を表面からはがすとともによく混ぜます。
- 2) 各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに入れます。

マイクロチューブには、5mm ϕ のジルコニアボールを1個あらかじめ入れておき、溶解した液を入れます。

6cmディッシュ相当数の細胞ペレット を溶解する場合（接着細胞・浮遊細胞）

2 細胞培養液を完全に吸引除去した細胞ペレットを、指で軽くたたきルーズにする

サンプル数分のLRPと2-MEの混合液を調製します。（LRP 1mlあたり2-ME 10 μ l）

- ・ 接着細胞からペレットを作製する場合
300 \times gで5分間遠心操作を行い、上清をできるだけ取り除きます。

トリプシン処理により細胞をはがし、細胞数をカウントしてください。

- ・ 浮遊細胞からペレットを作製する場合
300 \times gで5分間遠心操作を行い、上清を捨て、細胞のペレットをPBSにて洗浄します。
300 \times gで5分間遠心操作を行い、上清をできるだけ取り除きます。

細胞ペレットは細胞回収後、速やかに液体窒素中で急速凍結し、 -70°C 以下で保存することも可能です。
凍結する場合は、凍結前に細胞数をカウントしてください。

3 LRP（2-ME添加済み）を添加し、細胞を溶解

350 μ lのLRP（2-ME 添加済み）を添加します。
数回のピペッティングを行い、各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに、細胞を溶解した液を全量入れます。

マイクロチューブには、5mm ϕ のジルコニアボールを1個あらかじめ入れておき、溶解した液を入れます。

4 ホモジナイズ（MS-100の場合：2,800rpm \times 2分、またはTissueLyserの場合：30Hz 2分 \times 2回）

ホモジナイズ処理後、数秒間スピンドウンして、マイクロチューブのキャップや壁についた液を収集します。

それぞれの装置の取扱説明書をよくお読みになり、ホモジナイズしてください。

5 SRPを添加後、ボルテックス：15秒（最大回転数（2,500rpm以上推奨）で充分混合）

SRPを50 μ l添加し、ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

6 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス：1分（最大回転数（2,500rpm以上推奨）で充分混合）

特級エタノール (>99%) を170 μ l添加し、ボルテックスを1分間最大回転数で行います。
その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

7 ライセート完成

ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

8 step5 抽出と回収 ～ step6 後処理

QuickGene-810を使って、total RNAを抽出します。

step2-2 プロトコール B

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

適切な細胞数でない場合、顕著な収量減少、精度低下、または目詰まりを起こす可能性があります。
目詰まりした場合は、細胞数を減らしてご検討ください。

1サンプルにつきカートリッジを2本使用します。

1 別紙1 洗浄液、回収液の必要量

別紙1を参照し、必要な洗浄液、および回収液を遠沈管に注入し、セットします。

10cmディッシュ上で 直接溶解する場合

2 ディッシュ内の細胞培養液をできる限り 吸引除去

- 1) サンプル数分のLRPと2-MEの混合液を調製します。(LRP 1mlあたり2-ME 10 μ l)
- 2) 細胞培養液はフラスコまたはディッシュから可能な限り吸引除去します。

3 LRP (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

- 1) 600 μ lのLRP (2-ME 添加済み) をフラスコまたはディッシュに加え、セルスクレイパーなどで細胞を表面からはがすとともによく混ぜます。
- 2) 各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに入れます。

マイクロチューブには、5mm ϕ のジルコニアボールを1個あらかじめ入れておき、溶解した液を入れます。

10cmディッシュ相当数の 細胞ペレットを溶解する場合

2 細胞培養液を完全に吸引除去した細胞ペ レットを、指で軽くたたきルーズにする

サンプル数分のLRPと2-MEの混合液を調製します。
(LRP 1mlあたり2-ME 10 μ l)

- ・ 接着細胞からペレットを作製する場合
300 \times gで5分間遠心操作を行い、上清をできるだけ取り除きます。

トリプシン処理により細胞をはがし、細胞数をカウントしてください。

- ・ 浮遊細胞からペレットを作製する場合
300 \times gで5分間遠心操作を行い、上清を捨て、細胞のペレットをPBSにて洗浄します。
300 \times gで5分間遠心操作を行い、上清をできるだけ取り除きます。

細胞ペレットは細胞回収後、速やかに液体窒素中で急速凍結し、-70 $^{\circ}$ C以下で保存することも可能です。
凍結する場合は、凍結前に細胞数をカウントしてください。

3 LRP (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

600 μ lのLRP (2-ME 添加済み) を添加します。
数回のピペッティングを行い、各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに、細胞を溶解した液を全量入れます。

マイクロチューブには、5mm ϕ のジルコニアボールを1個あらかじめ入れておき、溶解した液を入れます。

トミー精工製

キアゲン製

4 ホモジナイズ (MS-100の場合 : 4,300rpm \times 1分、またはTissueLyserの場合 : 30Hz 2分 \times 2回)

ホモジナイズ処理後、数秒間スピンドウンして、マイクロチューブのキャップや壁についた液を収集します。

それぞれの装置の取扱説明書をよくお読みになり、ホモジナイズしてください。

5 SRPを添加後、ボルテックス：15秒（最大回転数（2,500rpm以上推奨）で充分混合）

SRPを100 μ l添加し、ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

6 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス：1分（最大回転数（2,500rpm以上推奨）で充分混合）

特級エタノール (>99%) を300 μ l添加し、ボルテックスを1分間最大回転数で行います。
その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

7 ライセート完成

ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

8 step5 抽出と回収 ~ step6 後処理

QuickGene-810を使って、total RNAを抽出します。

step2-3 プロトコール B'

目的の収量を得るため、必ず下記の手順で作業を行ってください。

適切な細胞数でない場合、顕著な収量減少、精度低下、または目詰まりを起こす可能性があります。
目詰まりした場合は、細胞数を減らしてご検討ください。

1サンプルにつきカートリッジを2本使用します。

1 別紙1 洗浄液、回収液の必要量

別紙1を参照し、必要な洗浄液、および回収液を遠沈管に注入し、セットします。

10cmディッシュ上で直接溶解する場合

2 ディッシュ内の細胞培養液をできるかぎり吸引除去

- 1) サンプル数分のLRPと2-MEの混合液を調製します。(LRP 1mlあたり2-ME 10 μ l)
- 2) 細胞培養液はフラスコまたはディッシュから可能な限り吸引除去します。

3 LRP (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

- 1) 800 μ lのLRP (2-ME 添加済み) をフラスコまたはディッシュに加え、セルスクレイパーなどで細胞を表面からはがすとともによく混ぜます。
- 2) 各ホモジナイザーに対応したマイクロチューブに入れます。

マイクロチューブには、5mm ϕ のジルコニアボールを1個あらかじめ入れておき、溶解した液を入れます。

4 ホモジナイズ (MS-100の場合 : 4,300rpm \times 1分、またはTissueLyserの場合 : 30Hz 2分 \times 2回)

ホモジナイズ処理後、数秒間スピンドウンして、マイクロチューブのキャップや壁についた液を収集します。

それぞれの装置の取扱説明書をよくお読みになり、ホモジナイズしてください。

5 SRPを添加後、ボルテックス : 15秒 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨) で充分混合)

SRPを50 μ l添加し、ボルテックスを15秒間最大回転数で行います。
その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

6 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス : 1分 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨) で充分混合)

特級エタノール (>99%) を280 μ l添加し、ボルテックスを1分間最大回転数で行います。
その後、数秒間スピンドウンしてチューブのキャップや壁に付着した溶液を収集します。

7 ライセート完成

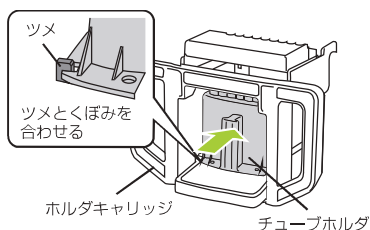
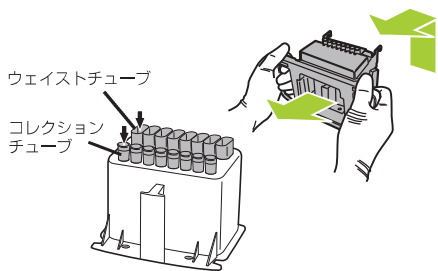
ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

8 step3 抽出と回収 ~ step4 後処理

QuickGene-810を使って、total RNAを抽出します。

step3 抽出と回収

1 消耗品のセット (チューブホルダへのセット)

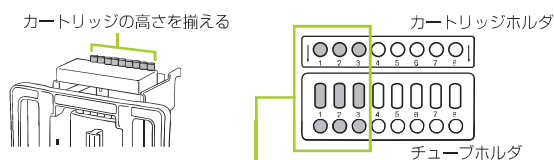


- 1 フロントカバーを開け、ホルダキャリアッジを取り外します。ホルダキャリアッジからチューブホルダを取り外します。
- 2 チューブホルダに、ウェイストチューブ、コレクションチューブをセットします。

プロトコール B、またはプロトコール B' の場合

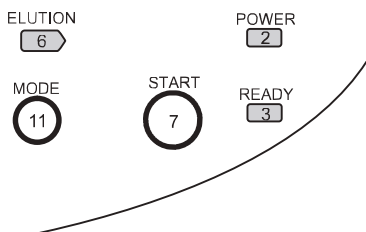
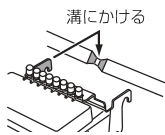
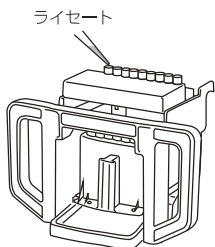
1サンプルにつき、カートリッジ・ウェイストチューブ・コレクションチューブを2本ずつセットしてください。

- 3 チューブホルダをホルダキャリアッジにセットします。
- 4 カートリッジホルダに専用カートリッジをセットします。



カートリッジ、ウェイストチューブ、コレクションチューブ3つ全てを同じ番号位置にセットする

2 サンプル抽出



1 プロトコール A の場合

カートリッジに、ライセートを、マイクロピペットを用いて全量アプライします。

プロトコール B、またはプロトコール B' の場合

サンプル1個につき2本のカートリッジに、ライセートを、マイクロピペットを用いてピペティング後、半分ずつアプライします。

- 2 ホルダキャリアッジを装置へセットします。

- 3 オペレーションパネルに目的の抽出モードが表示されるまで、〔MODE〕ボタンを数回押します。

DNase処理を行う場合	ISOLATE C
DNase処理を行わない場合	ISOLATE B

- 4 〔START〕ボタンを押します。

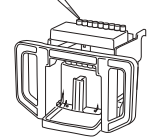
抽出処理中にフロントカバーを開いた場合、装置が一旦停止状態となりますが、抽出処理を再開することができます。詳細は、取扱説明書をご参照ください。

3 DNase処理モードで抽出した場合のDNase処理方法

- 1 オペレーションパネルの表示が【START SW → RESTART】になったことを確認します。
- 2 フロントカバーを開け、ホルダキャリッジを取り外します。
- 3 カートリッジに、step1で調製したDNaseを、40 μ l/カートリッジ添加します。
(DNase I, Amplification Gradeを調製した場合は、120 μ l/カートリッジを添加)
- 4 ホルダキャリッジを装置へセットします。
- 5 フロントカバーを閉じ、〔START〕ボタンを押します。
- 6 5分後に自動的に抽出動作が再開され、オペレーションパネルの表示が【PROCESSING】に変わります。

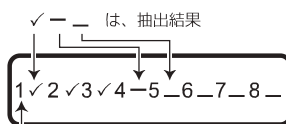
メンブレンがDNase溶液に浸せるように添加してください。
チップの先端でメンブレンを破らないように注意してください。

調製したDNaseを添加



4 抽出結果確認

抽出結果の表示例



数字は、カートリッジの列番号

例では、 1~3列目：正常
4列目：不良
5~8列目：カートリッジセットなし

- 1 ピピーッと音が鳴れば抽出終了です。
オペレーションパネルに抽出結果が表示されます。

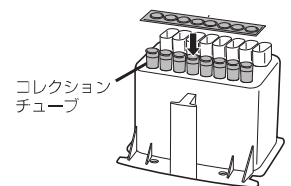
表示	意味
✓ (チェック)	正常終了
- (ハイフン)	抽出不良 (カートリッジのつまり)
- (アンダーバー)	カートリッジがセットされていない、 または抽出前にエラーが発生

5 サンプル回収

- 1 装置が完全に停止していることを確認した後、フロントカバーを開け、チューブホルダを取り外します。
- 2 コレクションチューブにキャップを付け、取り出し、保存します。

プロトコール B、またはプロトコール B' の場合

1個のサンプルにつき、2本の回収容器にtotal RNAが回収されますので、1本にまとめてください。



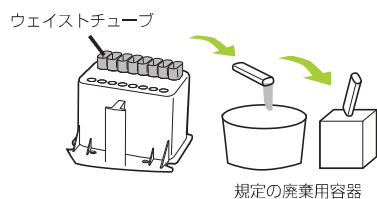
すぐにtotal RNAを使用しない場合は、-20℃、または-80℃で保存します。

回収液量の初期値は、50 μ lです。

続いてstep6 後処理を行います。

step4 後処理

6 廃棄・消耗品の処分



1 ウェイトチューブを取り出し、廃液は規定に従って廃棄し、ウェイトチューブも廃棄してください。

2 ホルダキャリアッジを取り外します。

3 カートリッジホルダを取り外し、カートリッジを処分します。

カートリッジホルダの上部をスライドさせ、カートリッジを下に落とし、処分します。



バイオハザード

感染性のおそれのあるサンプルを使用し、使用后廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、熔融、滅菌、消毒などの処理をしてください。また、委託して行う場合は、特別管理産業廃棄物処分量の免許を持った業者に、特別管理産業廃棄物管理表（マニフェスト）を添えて処理依頼をしてください。

7 後処理

- 1** ディスチャージトレイを確認します。廃液が溜まっていれば、廃棄します。
 - ・キットを変える場合 ⇒ 別紙2（キット変更時のディスチャージ）
 - ・終了して一週間以上、装置を使用しない場合 ⇒ 別紙2（1週間以上使わない場合のディスチャージ）
 - ・続けて作業する場合 ⇒ 下記2以降
- 2** ホルダキャリアッジにカートリッジホルダ、チューブホルダをセットし、装置に戻します。
- 3** フロントカバーを閉じ、step2からの作業を行います。

8 作業終了