

RNA培養細胞キット編

QuickGene RNA cultured cell kit S (RC-S)



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 簡易卓上遠心機	マイクロチューブ	チューブミキサー または
手袋 DNase (step1-2参照) ★オプション		

PBSを使用する場合があります。

2 試薬の準備

◆ 溶解液 (LRC)

使用前に十分に混和してください。析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、溶解液 (LRC) 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LRC (2-ME添加済み) を520μl使用します。

◆ 洗浄液 (WRC)

未開封のWRCボトルに特級エタノール (>99%) を90ml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 (CRC)

核酸溶出時には、必ずCRC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処理をされる場合は、下表に従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	2	40U/40μl
DNase I, RNase-Free	Ambion	2222		
RNase-Free DNase Set ^{*1}	QIAGEN	79254	3	3.4Kunitz units/40μl

※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)

調製方法は、裏面参照

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 ^{※1}	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: QIAGEN社プロトコールどおりに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 サンプルの準備

本キットは、培養細胞（最大 1×10^6 個）からのtotal RNAの抽出・精製に対応します。

本キットで抽出した場合の培養細胞 1×10^6 個あたりのtotal RNA回収例（DNase処理あり）を下表に示します。（収量はサンプルの状態（細胞の種類、培養状態、増殖のステージなど）により変動します）

サンプル	total RNA回収量 [μg]	A260/A280	A260/A230
HL-60細胞	10	2.0	2.1
U937細胞	12	2.0	2.1
HeLa細胞	20	2.0	2.1
HEK293細胞	15	2.0	2.1

回収液量初期値は、100μlです。回収液量は50μlまで下げられますが、その場合、溶出効率が低下する可能性があります。

続いてstep2 プロトコールを行います。

step2 プロトコール

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。
また、全ての作業は、室温（15～28℃）でご使用ください。

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。

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

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 LRC (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

- 1) サンプル数分のLRCと2-MEの混合液を調製します。(LRC 1mlあたり2-ME 10 μ l)
- 2) 520 μ lのLRC (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。
- 3) マイクロチューブに入れます。

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

凍結ペレット使用時は、PBS 20 μ lにて細胞を再分散させます。

- ・接着細胞からペレットを作製する場合
トリプシン処理後、PBSで洗浄し、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。再度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、後で使用するために細胞回収後、速やかに液体窒素中で急速凍結し、-70℃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 LRC (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

- 1) サンプル数分のLRCと2-MEの混合液を調製します。(LRC 1mlあたり2-ME 10 μ l)
- 2) 520 μ lのLRC (2-ME 添加済み) を添加します。
- 3) 数回のピペッティングを行い、マイクロチューブに、細胞を溶解した液を全量入れます。

4 ボルテックス：1分（最大回転数で充分混合）

ボルテックスを1分間最大回転数で行い、ホモジナイズします。
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。

5 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス：5秒～15秒（最大回転数で充分混合）

特級エタノール (>99%) を100 μ l添加し、ボルテックスを5秒～15秒程度最大回転数で行い、充分に混合します。
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（最大回転数で充分混合）

特級エタノール (>99%) を180 μ l添加し、ボルテックスを最大回転数で行い、充分に混合します。
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

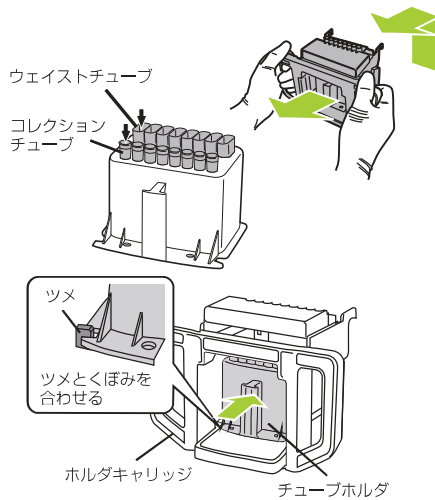
ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

8 step3 抽出 ～ step4 回収と後処理

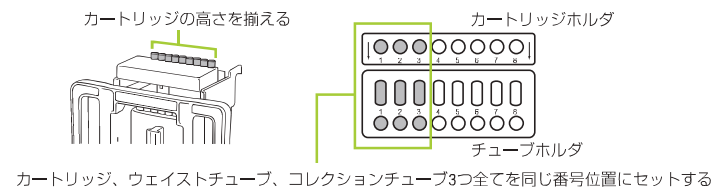
QuickGene-810を使って、total RNAを抽出します。

step3 抽出

1 消耗品のセット (チューブホルダへのセット)

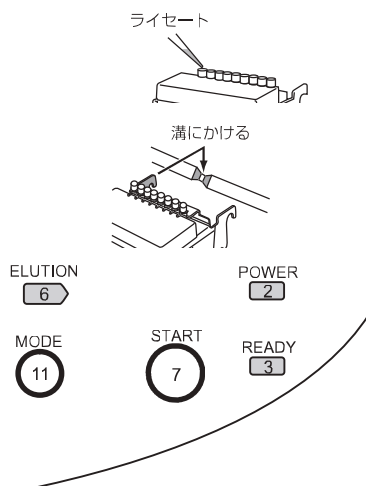


- 1 フロントカバーを開け、ホルダキャリッジを取り外します。ホルダキャリッジからチューブホルダを取り外します。
- 2 チューブホルダに、ウェイトチューブ、コレクションチューブをセットします。
- 3 チューブホルダをホルダキャリッジにセットします。
- 4 カートリッジホルダに専用カートリッジをセットします。



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 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。
- 2 ホルダキャリ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	RNA CELL PLUS
DNase処理を行わない場合	RNA CELL

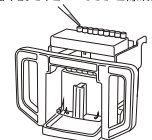
- 4 〔START〕ボタンを押します。

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。
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。
- 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。

調製したDNaseを添加

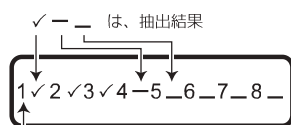


続いてstep4 回収と後処理を行います。

step4 回収と後処理

4 抽出結果確認

抽出結果の表示例



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。

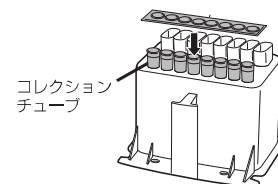
表示	意味
✓ (チェック)	正常終了
- (ハイフン)	抽出不良 (カートリッジのつまり)
- (アンダーバー)	カートリッジがセットされていない、または抽出前にエラーが発生

5 サンプル回収

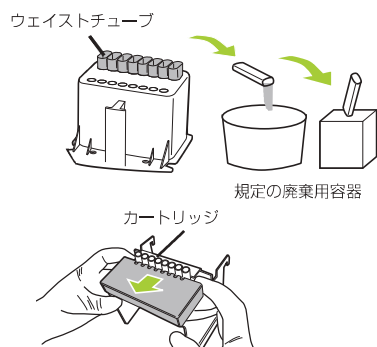
- 1 装置が完全に停止していることを確認した後、フロントカバーを開け、チューブホルダを取り外します。
- 2 コレクションチューブにキャップを付け、取り出し、保存します。

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

回収液量の初期値は、100 μl です。



6 廃棄・消耗品の処分



- 1 ウェイストチューブを取り出し、廃液は規定に従って廃棄し、ウェイス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、溶融、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