

RNA組織キットII編

QuickGene RNA tissue kit S II (RT-S II)



このシートは、動物組織から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組織キットII	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 または
マイクロ遠心機 手袋		
ホモジナイザー		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 (LRT)

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、LRT 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、500μl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 (SRT)

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。

◆ 洗浄液 (WRT)

未開封のWRTボトルに特級エタノール (>99%) を280ml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 (CRT)

核酸溶出時には、必ずCRT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
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

1U/μl DNase I	20μl
10×Reaction Buffer	4μl
ヌクレアーゼフリー水	16μl

調製方法 2

2U/μl DNase I	20μl
10×Reaction Buffer	4μl
ヌクレアーゼフリー水	16μl

調製方法 3

2.7Kunitz units/μl DNase I ^{※2}	1.25μl
Buffer RDD	35μl
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 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、ISOLATE B, ISOLATE C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 使用組織量を定める

本キットは、動物組織5～30mgからのtotal RNA抽出・精製に対応しています。
下表、および本キットのハンドブックを参考に使用組織量を決定してください。

1) total RNAの収量例 (Balb/cマウス (メス、7週齢) 正常組織)
(DNase処理あり、ボールミル型ホモジナイザー (トミー精工製Micro Smash MS-100またはキアゲン製TissueLyser) でホモジナイズ)

組織	最大処理検体量	total RNA収量例 ^{※2}	
肝臓	Liver	30mg	100～120μg
脳	Brain	40mg	15～20μg
肺	Lung	30mg	20～25μg
腎臓	Kidney	30mg	50～60μg
脾臓	Spleen	30mg	40～50μg
胸腺 ^{※1}	Thymus	30mg	40～60μg
心臓 ^{※1}	Heart	30mg	15～20μg

2) ホモジナイザー種による 処理可能量
(Balb/cマウス (メス、7週齢) 正常組織)

組織	ボールミル	Rotor-Stator	ペッスル
肝臓	30mg	15mg	15mg
脳	40mg	40mg	20mg
肺	30mg	15mg	15mg
腎臓	30mg	5mg	×
脾臓	30mg	20mg	10mg
胸腺	30mg ^{※3}	5mg	5mg
心臓	30mg ^{※3}	5mg	×

※1：心臓・胸腺の場合は、他の組織と比べてホモジナイズ条件を強くする必要があります。

※2：収量は組織の状態、部位などにより変動します。

※3：トミー精工製MicroSmash MS-100の場合は、ホモジナイズ時間を長くしないと、最悪の場合目詰まりのおそれがあります。

Rotor-Statorホモジナイザー、ペッスルホモジナイザーの場合は、ボールミル型ホモジナイザーから予想される収量より30～50%収量が低下することがあります。

下記の場合は、組織量10mgで予備実験を行ってください。

- 初めてQuickGene シリーズで抽出するサンプルの場合
- 初めて抽出を行うサンプルの場合
- 上表に載っていない組織種の場合

組織をすぐに使用しない場合は、液体窒素で急速に凍結させ、直ちに-80℃にて保存してください。

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。

動物から採取した新鮮な組織、または凍結保存組織（-80℃）を使用します。

回収液量の初期値は100 μ lです。最低回収液量は50 μ lまで設定可能ですが、溶出効率が低下する可能性があります。

適切な組織量でない場合、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、組織量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。

2 組織の測量

- 1) サンプル数分のLRTと2-MEの混合液で調整します。（LRT 1mlあたり2-ME 10 μ l）
- 2) 組織を1.5~2mm角のブロックに小さくカットし、重量を測定します。
- 3) 必要量をホモジナイザーに対応のチューブに入れます。
（ボールミル型ホモジナイザーを使用する場合は、あらかじめ5mm ϕ ジルコニアボールをチューブに入れておき組織を入れます。）

凍結保存組織使用の場合は、RNAの分解を避けるため、ドライアイスや液体窒素中に凍結サンプルが入ったチューブを立てるなどして、できるだけ凍結状態を保ったまま秤量してください。

3 LRT（2-ME添加済み）を添加後、ホモジナイズ

1) ボールミル型ホモジナイザーの場合

組織を入れたチューブに500 μ lのLRT（2-ME添加済み）を添加し、装置添付の説明書に従って、サンプルが均一になるまでホモジナイズします。ホモジナイズ条件例は下記のとおりです。

組織量5~15mgの場合の条件例

	トミー精工製 MicroSmash MS-100	キアゲン製 TissueLyser
肝臓	3,800rpm 120秒	30Hz 5分×2回
脳		
肺		
腎臓	3,800rpm 300秒	
脾臓		
胸腺		
心臓		

組織量15~30mgの場合の条件例

	トミー精工製 MicroSmash MS-100	キアゲン製 TissueLyser
肝臓	3,800rpm 300秒	30Hz 5分×2回
脳		
肺		
腎臓		
脾臓	3,800rpm 240秒×2回*	
胸腺		
心臓	3,800rpm 300秒×3回	

* 胸腺の場合、トミー精工製MicroSmashではMS-100R（冷却機付）の方が収量が高いことがあります。

2) Rotor-Statorホモジナイザーの場合

組織を入れたチューブに500 μ lのLRT（2-ME添加済み）を添加し、20,000rpmにて30秒間×2回ホモジナイズします。

7mm ϕ のプロープを用いる場合は、2mlマイクロチューブなどを使用してください。
10mm ϕ 以上のプロープの場合はさらに大きなサイズのチューブが必要です。

組織破片が見られる場合は、処理時間を延長してください。

3) マイクロチューブ用ペッスルホモジナイザーの場合

組織を入れたチューブに200 μ lのLRT (2-ME添加済み) を添加し、専用モーターにペッスルを取り付け、速やかに1分間以上ホモジナイズします。ペッスルをチューブの底に押し付けてはやや浮かす、を繰り返して、十分ホモジナイズします。

ホモジナイズ完了後300 μ lのLRT (2-ME添加済み) を添加し、ボルテックスを15秒行います。

※ 腎臓、心臓などの組織では使用できませんのでご注意ください。

4 組織破片の分離と溶液の分取

1) $\geq 17,000 \times g$ ($\geq 15,000$ rpm) で3分、室温にて遠心します。

組織破片を持ち込むと、目詰まりの可能性があります。組織破片がうまく分離できないときや、泡が気になる場合は、遠心の回転数および遠心時間を増やしてください。

2) 底に沈んだ組織破片などを吸い込まないように注意して、

- ・ 組織量 5~15mgの場合 : ホモジネート上清350 μ lを新しい1.5mlチューブに移します。
- ・ 組織量 15~30mgの場合 : ホモジネート上清385 μ lを新しい1.5mlチューブに移します。

5 SRTを添加後、ボルテックス：15秒（最大回転数で充分混合）

SRTを175 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。

ホモジネートをロスした場合は、SRT液量、およびエタノール液量比を

- ・ 組織量 5~15mgの場合 : 「ホモジネート：SRT：エタノール = 2：1：1」に調製してください。
- ・ 組織量 15~30mgの場合 : 「ホモジネート：SRT：エタノール = 11：5：4」に調製してください。

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

1) 組織量 5~15mgの場合 : 特級エタノール (>99%) を175 μ l添加します。

組織量 15~30mgの場合 : 特級エタノール (>99%) を140 μ l添加します。

2) ボルテックスを1分間最大回転数で行います。

3) 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

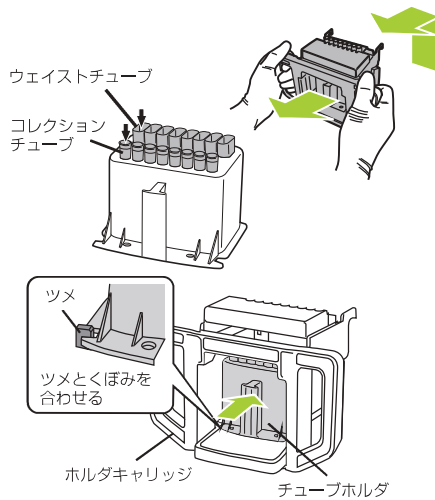
ライセート完成後、30分以内に抽出を行ってください。

8 step3 抽出 ~ step4 回収と後処理

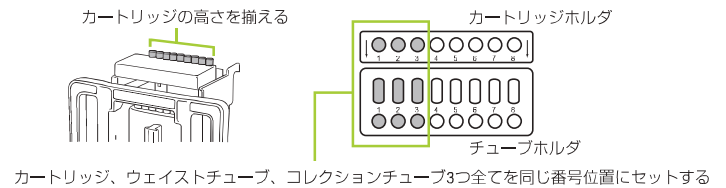
QuickGene-810を使って、total RNAを抽出します。

step3 抽出

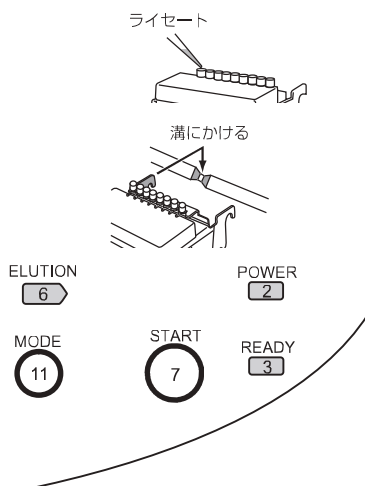
1 消耗品のセット (チューブホルダへのセット)



- 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。



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

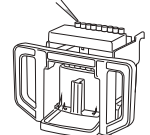
- 4 〔START〕ボタンを押します。

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、ホルダキャリア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 ホルダキャリア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

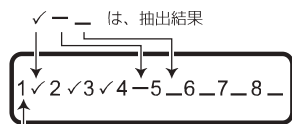


続いてstep4 回収と後処理を行います。

step4 回収と後処理

4 抽出結果確認

抽出結果の表示例



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。

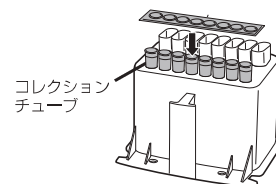
表示	意味
✓ (チェック)	正常終了
- (ハイフン)	抽出不良 (カートリッジのつまり)
- (アンダーバー)	カートリッジがセットされていない、または抽出前にエラーが発生

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。

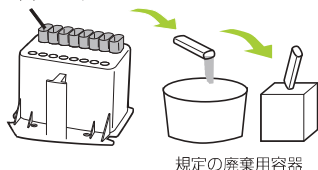
すぐにtotal RNAを使用しない場合は、-20℃、または-80℃で保存します。

回収液量の初期値は、100µlです。



6 廃棄・消耗品の処分

ウェイトチューブ



カートリッジ



- 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、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業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