

total RNA分離 クイックガイド

RNA血液細胞キット編

QuickGene RNA blood cell kit S (RB-S)



このシートは、溶血後の白血球からtotal RNAを分離する手順を、キットハンドブック・取扱説明書から抜粋したものです。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分離を行うために、下記のものをご準備ください。

1 準備

QuickGene-Mini480		マイクロピペット (P-200、P-1000など)	チューブミキサー
RNA血液細胞キット (RB-S)			
特級エタノール (>99%)	マイクロチューブ (1.5ml)		ポルテックス時に5mmジルコニアピースを使用するとより効果的です。 その場合、2mmチューブをお使いください。
2-メルカプトエタノール			
溶血剤(step2参照)			
遠心分離機			
手袋			
保護めがね	DNase (step1-2参照)		

2 試薬の準備

◆ 溶解液 (LRB)

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°Cで溶解してください。

必要量を分注し、溶解液 (LRB) 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LRB (2-ME添加済み) を520µl使用します。

◆ 洗浄液 (WRB)

使用前のWRBボトルに特級エタノール (>99%) を120ml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 (CRB)

核酸溶出時には、必ずCRBを使用してください。

◆ 溶血剤 (HB)

弊社で実施している溶血方法をお使いになる場合は、以下のとおりに調製してください。

NH ₄ Cl	150mM
NaHCO ₃	10mM
EDTA (pH8.0)	0.1mM

◆ 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、次の表に従い調製してください。(記載の値は、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	Thermo Fisher Scientific	18068-015		
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich	AMP-D1	2	60U/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

1U/μl DNase I	60μl
10×Reaction Buffer	12μl
ヌクレアーゼフリー水	48μl

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RNaseフリー水を550μl添加後、DNase ストック溶液を調整してください。(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 サンプルの準備

本キットは、溶血後の白血球 (健常な成人の血液由来で最大 1.5×10^7 個) からのtotal RNAの分離・精製のみに対応します。

本キットで分離した場合の白血球数あたりの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 (血液が由来する方の健康状態等) により変動します)

白血球数 [個]	total RNA回収量 [μg]	A260/A280
1×10^6	0.3	2.1
1×10^7	4.6	2.2
1.5×10^7	6.5	2.1

- ・ 健常な成人の血液1μl中にはおよそ4,000~7,000個の白血球が含まれます。
- ・ 白血球 1.5×10^7 個は白血球数7,000個/μlの方の血液で約2mlに該当します。
- ・ 凍結血液は使用しないでください。

続いてstep2プロトコルを行います。

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。

白血球数が白血球 1.5×10^7 個以下であることをご確認ください。目詰まりした場合は、白血球数を減らしてご検討下さい。
また、全ての作業は室温 (15~28℃) でご使用ください。

1 溶血 (一例として弊社で実施している溶血方法を紹介します)

1) ヒト全血1容量と溶血剤 (HB) 5容量を適当な大きさのチューブ中で転倒混和等でよく混合します。

健康な成人の血液には1 μ あたり4,000~7,000個の白血球が含まれます。
本キットでは白血球数が白血球 1.5×10^7 個までが処理可能です。
白血球 1.5×10^7 個は、白血球数7,000個の方の血液で約2mlに相当します。
血液からRNAを分離するときには、白血球最大数を必ずお守りください。

例: ヒト全血2mlとHB 10mlを15mlチューブ中でよく混合する

※ 白血球数がさらに多い血液を処理する場合には必ず血液量を減らしてください。

例: ヒト全血200 μ lとHB 1mlを1.5mlマイクロチューブ中でよく混合する 等

2) 氷上で10~15分間インキュベートします。
インキュベート中に2回ボルテックスもしくは転倒混和でよく混合します。

赤血球の溶解が進むと、インキュベーション中に混濁した懸濁液が透明になってきます。
必要に応じてインキュベーション時間を20分に延長してください。

3) 4℃、2分間、2,000 \times gで遠心分離後、上清を完全に除去します。

遠心分離後白血球はペレットを形成します。ペレットを壊さないように上清を完全に除去してください。

4) 細胞ペレットに使用した全血量に対して2容量のHBを添加し、細胞をよく懸濁します。

例: step1で全血を2ml使用した場合HBを4ml添加します。

このステップにより赤血球は通常除去されます。大量の赤血球が残留している場合は、この段階で更に氷上で5~10分インキュベートしてください。

5) 4℃、2分間、2,000 \times gで遠心分離後、上清を完全に除去します。

溶血後、速やかに次の処理を行ってください。

2 1.5mlマイクロチューブにペレット化し、LRB (2-ME添加済み) を添加

1) チューブを軽くたたくこと (タッピング) で細胞をルーズにした後、520 μ lのLRB (2-ME添加済み) を添加します。

2) ピペッティングを確実にいき、LRBを十分に混合します。

1.5mlマイクロチューブ以外にペレット化した場合は、上記混合後、1.5mlマイクロチューブに移します。

3 ボルテックス:30秒 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨) で十分混合)

ボルテックスを30秒間最大回転数で行います。
その後、数秒間スピンドア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。

4 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス:5分 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨) で十分混合)

特級エタノール (>99%) を250 μ l添加し、ボルテックスを5分間最大回転数で行います。
その後、数秒間スピンドア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。

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されます。
その際には2mlマイクロチューブをご利用ください。

5 ライセート完成

ライセート完成後、30分以内に分離を行ってください。

続いてstep3分離を行います。

step3 分離

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。

1 QuickGene-Mini480分離フロー

分離フロー中の加圧マーク  は下記操作を意味しています。

- ① ウェイストチューブホルダまたはコレクションチューブホルダ (カートリッジホルダセット済み) をQuickGene-Mini480にセットし、カートリッジの1列目が加圧ノズルの真下にくる位置まで押し込む
- ② 加圧スイッチをONの位置に回して加圧する
- ③ カートリッジ内に液が残っていないことを確認してから加圧スイッチをOFFの位置に戻す
- ④ サンプルがセットされている列数に応じてホルダを押し込み、②と③を繰り返す
- ⑤ ウェイストチューブホルダまたはコレクションチューブホルダ (カートリッジホルダセット済み) をQuickGene-Mini480から取り出す

