

## total RNA分離 クイックガイド

## 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。

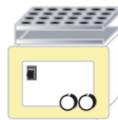


適切な保護手袋、および保護めがねを着用して作業を行ってください。

## 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	チューブミキサー
RNA培養細胞HCキット (RC-S2)		(P-200、P-1000など)	
特級エタノール (>99%)	マイクロチューブ		 または 
2-メルカプトエタノール	(1.5ml)		
DNase (step1-2参照)			
遠心分離機			
保護めがね			
手袋			
ホモジナイザー	 または 	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にお使いください。

## 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。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 (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LRP (2-ME添加済み) を350μl (後述プロトコールA)、600μl (後述プロトコールB) または800μl (後述プロトコールC)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下さい。

## ◆ 洗浄液 (WRP)

使用前の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、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.	調整方法	終濃度
RQ1 RNase-Free DNase Deoxyribonuclease (RT Grade)	Promega ニッポンジーン	M6101 313-03161	1	20U/40μl
DNase I, RNase-Free	Thermo Fisher Scientific	2222	2	40U/40μl
RNase-Free DNase Set <sup>※1</sup>	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 <sup>※2</sup>	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 プロトコール選択

ディッシュサイズと細胞数により、下表より最適なプロトコールを選択し、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 <sup>※1</sup>	細胞数 (×10 <sup>6</sup> 個)	
6cm	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 <sup>※2</sup>	3.0~5.0	
10cm	HeLa	3.5~5.5	B (→ step2-2 プロトコール Bへ)
	HEK293	5.0~8.0 <sup>※3</sup>	
	COS-7	2.0~3.0	
	NIH/3T3	3.0~5.0	
	HL60 <sup>※2</sup>	5.0~15	
	HEK293	8.0~15 <sup>※3</sup>	

※1: 記載のない細胞種から分離される場合は、6cmディッシュのサブコンフルエント相当の細胞数から分離を開始し、最適な細胞数をご確認ください。  
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: 8.0×10<sup>6</sup>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Cを使用してください。  
ペレット化の場合は、15×10<sup>6</sup>個までプロトコールBで処理ができます。

続いてstep2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。

また、全ての作業は、室温(15~28℃)でご使用ください。

## 6 cmデッシュ上で 直接溶解する場合 (接着細胞)

### 1 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 10µl)
- 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。

### 2 LRP (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

- 1) 350µl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、5mmφ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。

## 6 cmデ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)

### 1 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。(LRP1mあたり2-ME 10µl)

- ・接着細胞からペレットを作製する場合  
300×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下さい。

- ・浮遊細胞からペレット作製する場合  
300×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×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を回収後、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。

### 2 LRP (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

350µl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、5mmφ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

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

ホモジナイズ処理後、数秒間スピンドアウンしてマイクロチューブのキャップや壁に付着した液を収集します。

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。

### 4 SRPを添加後、ボルテックス:15秒 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨)) で十分混合

SRPを50µl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、数秒間スピンドアウンしてマイクロ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:1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170µl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、数秒間スピンドアウンしてマイクロ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 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。

## 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。また、全ての作業は、室温 (15~28℃) でご使用ください。

1サンプルにつきカートリッジ2本使用します。

### 10 cmディッシュ上で 直接溶解する場合

#### 1 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 $\mu$ 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。

#### 2 LRP (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

- 1) 600 $\mu$ 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 $\Phi$ 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。

### 10 cmディッシュ相当数の 細胞ペレットを溶解する場合

#### 1 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。(LRP1mあたり2-ME 10 $\mu$ 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を回収後、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。

#### 2 LRP (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

600 $\mu$ 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 $\Phi$ 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

#### 3 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、数秒間スピンドアウンしてマイクロチューブのキャップや壁に付着した液を収集します。

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。

#### 4 SRPと添加後、ボルテックス:15秒 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨)) で十分混合

SRPを100 $\mu$ 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、数秒間スピンドアウンしてマイクロ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: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 $\mu$ 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、数秒間スピンドアウンしてマイクロ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 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。

## Step2-3 プロトコール C

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サンプルにつきカートリッジ2本使用します。

10 cmディッシュ上で直接溶解する場合

### 1 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の混合液を調整します。(LRP 1mlあたり2-ME 10μl)
- 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。

### 2 LRP (2-ME添加済み) を添加し、細胞を溶解

- 1) 800μl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中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

### 3 ホモジナイズ (MS-100の場合:4,300rpm×1分、またはTissueLyserの場合:30Hz 2分×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付着した溶液を収集します。

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。

### 4 SRPと添加後、ボルテックス:15秒 (最大回転数 (2,500rpm以上推奨)) で十分混合

SRPを50μl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マイクロ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: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280μl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マイクロ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 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

QuickGene-Mini480を使って、total RNAを分離します

## 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
- ※プロトコルB、Cにてライセート作製を行った場合、サンプル1個につきカートリッジ2本使用します。**

ライセート完成

カートリッジにライセートを全量アプライし、加圧シールプレートを装着する (ライセート中に凝集物が生じた場合は、凝集物ごとカートリッジへアプライ)

プロトコルB、Cにてライセート作製を行った場合、1本のライセートにつき2本のカートリッジへ半量ずつ添加

加圧

WRP: 750µl

加圧

DNase 処理あり

DNase 処理なし

DNase溶液: 40µl

室温 インキュベーション: 5分

WRP: 750µl

加圧

WRP: 750µl

カートリッジホルダをウェイストチューブホルダより取り外し、コレクションチューブホルダにセットする (セット方法については装置取扱説明書を参照)

CRP: 50µl

室温  
インキュベーション: 4分

加圧

total RNA回収