

total RNA分離 クイックガイド

RNA培養細胞キット編 植物編

QuickGene RNA cultured cell kit S (RC-S)



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培養細胞キット (RC-S)			
特級エタノール (>99%)	マイクロチューブ (1.5ml) 		 または 
2-メルカプトエタノール			
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 	ホモジナイザーには、機種ごとに対応するチューブやピースにお使いください。	
液体窒素		ホモジナイザー専用 2.0mlチューブ	

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°C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600µl使用します。

◆ 洗浄液 (WRC)

使用前の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整方法

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	Promega	M6101	1	20U/40μl
DNase I, Amplification Grade	Thermo Fisher Scientific	18068-015		
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich	AMP-D1		
Deoxyribonuclease (RT Grade)	ニッポンジーン	313-03161	2	40U/40μl
DNase I, RNase-Free	Thermo Fisher Scientific	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. 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

※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。

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、細胞数を減らしてご検討ください。

1 ホモジナイズした後、組織溶解を行います。

- 1) ホモジナイザー専用2.0mlチューブに植物組織と4.8mmφステンレスビーズ2個入れます。
- 2) 以下の方法で凍結を行います。

液体窒素の場合：30秒間
ドライアイス+エタノールの場合：10分以上
-80℃冷凍庫の場合：2時間以上
- 3) ビーズミル型ホモジナイザー（トミー精工製 MS-100）で3,600rpm 30秒ホモジナイズを行います。
- 4) 直ちにLRC（2-ME添加済み）600μlを添加します。
- 5) ビーズミル型ホモジナイザー（トミー精工製 MS-100）で3,600rpm 30秒ホモジナイズを行います。

2 組織破片の分離と溶液の分取

- 1) 溶解残渣分を分離除去するために遠心します（15,000rpm、10分、室温）。
- 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、ホモジネート上清520μlを新しい1.5mlチューブに移します。

3 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス：60秒（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60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。

4 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

