

## total RNA分離 クイックガイド

## 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培養細胞キット (RC-S)		(P-200、P-1000など)	
特級エタノール (>99%)	マイクロチューブ		
2-メルカプトエタノール	(1.5ml)		または 
DNase (step1-2参照)			
遠心分離機			
手袋			
保護めがね			

※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°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520μl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カード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		
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 <sup>※1</sup>	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。)

調整方法は、裏面参照

## 調製方法. 1

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

## 調製方法. 2

2U/μl DNase I	20μl
10xReaction 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>※1</sup>	1.25μl
Buffer RDD	35μl
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 $1 \times 10^6$ 個) からのtotal RNAの分離・精製に対応します。

本キットで分離した場合の培養細胞 $1 \times 10^6$ 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	9.7	1.94	2.08

回収量初期値は、100μlです。回収量は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。

続いて対応する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°C) でご使用ください。

## ディ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

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 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 $\mu$ l)
- 2) 520 $\mu$ 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)

### 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

凍結ペレット使用時は、PBS 20 $\mu$ lにて細胞を再分散させます。

#### ・接着細胞からペレット作製する場合

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。

トリプシン処理ではがし、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°C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 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 $\mu$ l)
- 2) 520 $\mu$ lのLRC (2-ME添加済み) を添加します。
- 3) 数回のピペティングを行い、マイクロチューブに細胞を溶解した液を全量入れます。

### 3 ボルテックス:1分 (最大回転数で十分混合)

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秒~15秒 (最大回転数で十分混合)

特級エタノール (>99%) を100 $\mu$ 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、十分に混合します。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。

### 5 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス (最大回転数で十分混合)

特級エタノール (>99%) を180 $\mu$ l添加し、ボルテックスを最大回転数で行い、十分に混合します。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。

### 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 準備

プロトコールBでは、追加で以下の準備物がが必要です。

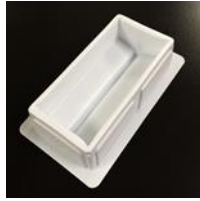
マルチチャンネル  
ピペット\*1



96ディープウェル  
プレート\*2



リザーバー



\*1: 200µl、250µl、750µlの液量操作に対応した8連以上のもの

\*2: 推奨品: Corning® 96 Well Clear V-Bottom 2mL Polypropylene Deep Well Plate, Sterile (Product #3960)

### 2 検体数に応じて、試薬を必要量リザーバーに分取する

	16検体	20検体	24検体	28検体	32検体	36検体	40検体	44検体	48検体
LRC (2-ME添加済)	9.5ml	11.5ml	13.5ml	15.5ml	18ml	20ml	22ml	24ml	26ml
特級エタノール (>99%)	8ml	9ml	10ml	11ml	12ml	13ml	14ml	15ml	16ml
WRC (特級エタノール添加済)	26ml	32ml	38ml	44ml	50ml	56ml	61ml	67ml	73ml
CRC	4ml	4ml	4ml	5ml	5ml	5ml	6ml	6ml	6ml

記載された量より多く分取するとキット付属の試薬が不足する場合があります。

### 3 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

#### ・接着細胞からペレット作製する場合

トリプシン処理後、PBSで洗浄し、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。

トリプシン処理ではがし、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×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、上清をできる限り取り除きます。

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。

裏面に続きます。

#### 4 細胞をPBSに再分散させ、96ディープウェルプレートに移す

- 1) 細胞ペレットにPBS 20 $\mu$ lを添加する。
- 2) タッピングまたはピペティングにて細胞ペレットを十分に懸濁する。
- 3) 96ディープウェルプレートの底に移液する。

細胞懸濁液がプレート穴の底に添加されていることを確認してください。

#### 5 LRC (2-ME添加済み) を添加後、ピペティングで混和する

- 1) サンプル数分のLRCと2-MEの混合液を調製する。(LRC 1mlあたり2-ME 10 $\mu$ l)
- 2) マルチチャンネルピペットで520 $\mu$ lのLRC (2-ME添加済み) を96ディープウェルプレートに添加する。
- 3) ピペティング動作を20回繰り返し混合します。

#### 6 特級エタノール (>99%) を添加後、ピペティングで混和する

- 1) 特級エタノール (>99%) 280 $\mu$ lを96ディープウェルプレートに添加する
- 2) そのままピペティングを10回行う。

#### 7 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<sup>(加圧)</sup>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

