

total RNA分離 クイックガイド

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組織キット II (RT-S2) |  |  |  |
| 特級エタノール (>99%) | マイクロチューブ (1.5ml) | | |
| 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 | 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 (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°Cで溶解してください。

必要量を分注し、溶解液 (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LRT(2-ME添加済み)を500μl使用します。

※ 温度の高いところで使用しないでください。漂白剤を含む消毒液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°Cで溶解してください。

◆ 洗浄液 (WRT)

使用前の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、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 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 | | |
| RNase-Free DNase Set ^{*1} | QIAGEN | 79254 | 3 | 3.4Kunitz units/40μl |



調製方法. 1

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

調製方法. 2

| | |
|--------------------|------|
| 2U/μl DNase I | 20μl |
| 10xReaction Buffer | 4μl |
| ス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 |
| ス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 溶液調整をおすすめします。

3 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の分離・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めてください。

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 [mg] | total RNA 収量例 ^{*2} [μg] |
|-------------------------|--------------|----------------------------------|
| 肝臓 Liver | 30 | 100~120 |
| 脳 Brain | | 15~20 |
| 肺 Lung | | 20~25 |
| 腎臓 Kidney | | 50~60 |
| 脾臓 Spleen | | 40~50 |
| 胸腺 ^{*1} Thymus | | 40~60 |
| 心臓 ^{*1} Heart | | 15~20 |

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 [mg] | Rotor-Stator [mg] | ペッスル [mg] |
|----|------------------|-------------------|-----------|
| 肝臓 | 30 | 15 | 15 |
| 脳 | 40 | 40 | 20 |
| 肺 | 30 | 15 | 15 |
| 腎臓 | 30 | 5 | × |
| 脾臓 | 30 | 20 | 10 |
| 胸腺 | 30 ^{*3} | 5 | 5 |
| 心臓 | 30 ^{*3} | 5 | × |

※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、最悪の場合は目詰まりのおそれがあります。

× : 適用できません

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 シリーズで分離するサンプルの場合
- 初めて分離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°C) を使用します。

回収量の初期値は100µlです。回収量は50µl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 組織の測量

- 1) サンプル数分のLRTと2-MEの混合液で調製します。(LRT 1ml あたり2-ME 10µl)
- 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5mmφ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に、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。

2 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500µlのLRT(2-ME添加済み)を添加し、装置添付の説明書に従って、サンプルチューブ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通りです。

組織量5~15mgの場合の条件例

| 組織 | 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

| 組織 | 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 | 3,800rpm 240秒 × 2回 | |
| 脾臓 | | |
| 胸腺 | | |
| 心臓 | | 3,800rpm 300秒 × 3回 |

※ 胸腺の場合、トミー精工製MicroSmash MS-100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500µl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。

7 mmφのプロープを用いる場合は、2mlマイクロチューブ等々を使用してください。

10mmφ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ベッセルホモジナイザーの場合
組織を入れたチューブに200µlのLRT (2-ME添加済み)を添加し、専用モーターにベッセルを取り付け、速やかに1分間以上ホモジナイズします。ベッセ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、十分にホモジナイズします。
ホモジナイズ完了後300µl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、心臓などの組織は使用できませんのでご注意ください。

3 組織破片の分離と溶液の分取

- 1) $\geq 17,000 \times g$ ($\geq 15,000\text{rpm}$) 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、遠心の回転数及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 μl 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 μl を新しい1.5mlチューブに移します。

4 SRTを添加後、ボルテックス:15秒 (最大回転数で十分混合)

SRTを175 μl 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」に調整してください。
- ・組織量 15~30mgの場合 : 「ホモジネート:SRT:エタノール = 11:5:4」に調整してください。

5 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス:1分 (最大回転数で十分混合)

- 1) ・組織量 5~15mgの場合 : 特級エタノール (>99%) を175 μl 添加します。
・組織量 15~30mgの場合 : 特級エタノール (>99%) を140 μl 添加します。
- 2) ボルテックスを1分間最大回転数を行います。
- 3) 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。

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

