

## total RNA抽出 クイックガイド

## RNA培養細胞キット 植物編

## QuickGene RNA cultured cell kit S (RC-S)



ご使用前には、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抽出を行うために、下記のものをご準備ください。

## 1 準備

QuickGene-Mini80

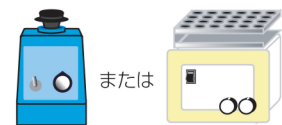
RNA培養細胞キット (RC-S)



マイクロピペット



チューブミキサー



特級エタノール (&gt;99%)

マイクロチューブ



2-メルカプトエタノール

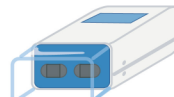
簡易卓上遠心機

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ビーズをお使いください。

液体窒素

ホモジナイザー専用 2.0mlチューブ

DNase (step1-2参照) ★オプション

## 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℃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)

未開封の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製方法

DNase処理をされる場合は、下表に従い調製してください。（下記は、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	Invitrogen	18068-015		
DNase I, Amplification Grade	Sigma	AMP-D1		
Deoxyribonuclease (RT Grade)	ニッポンジーン	313-03161	2	40U/40µl
DNase I, RNase-Free	Ambion	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）

調製方法は、裏面参照

調製方法 1		調製方法 2		調製方法 3	
1U/µl DNase I	20µl	2U/µl DNase I	20µl	2.7Kunitz units/µl DNase I <sup>*1</sup>	1.25µl
10× Reaction Buffer	4µl	10× Reaction Buffer	4µl	Buffer RDD	35µl
ヌクレアーゼフリー水	16µl	ヌクレアーゼフリー水	16µl	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。

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。

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 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50mgと4.8mmφステンレスビーズ2個を入れます。
- 2)以下の方法で凍結を行います。
 

液体窒素の場合：30秒間  
ドライアイスイタノールの場合：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（トミー精工社製 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（トミー精工社製 MS-100）で3,600rpm 30秒ホモジナイズを行います。



ホモジナイザー内部



凍結前



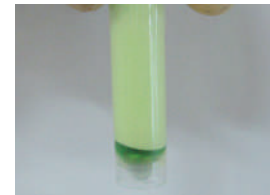
凍結後



チューブをセット



チューブ固定板をスライド後、  
パワーノブを締める



ホモジナイズ後

### 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。



遠心分離後

### 3 特級エタノール (>99%) を添加後、ボルテックス：60秒（最大回転数で充分混合）

特級エタノール (>99%) を280 $\mu$ l添加し、ボルテックス60秒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分以内に抽出を行ってください。

続いてstep3 抽出を行います。

## step3 抽出

QuickGene-Mini80を使って、total RNAを抽出します。

### 1 QuickGene-Mini80抽出フロー

抽出フロー中の加圧マーク  は下記操作を意味しています。

- ① チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80にセットする
- ② 加圧スイッチを手前に回して加圧開始
- ③ カートリッジ（CA）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元の位置に戻す
- ④ チューブホルダ（カートリッジホルダセット済み）をQuickGene-Mini80から取り出す

