

total RNA抽出 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を抽出する手順を、キットハンドブック・取扱説明書からダイジェストしたものです。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)



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

簡易卓上遠心機

手袋

DNase (step1-2参照) ★オプション

PBSを使用する場合があります。

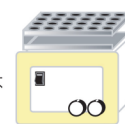
マイクロピペット



チューブミキサー



または



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)

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 ^{*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 ^{*1}	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。

3 サンプルの準備

本キットは、培養細胞（最大 1×10^6 個）からのtotal RNAの抽出・精製に対応します。

本キットで抽出した場合の培養細胞 1×10^6 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。

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 μ l)
- 2) 520 μ 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 μ lにて細胞を再分散させます。

- ・接着細胞からペレットを作製する場合
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。

トリプシン処理によりはがし、細胞数をカウントしてください。

- ・浮遊細胞からペレットを作製する場合
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 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 μ l)
- 2) 520 μ lのLRC (2-ME 添加済み) を添加します。
- 3) 数回のピペッティングを行い、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（最大回転数で充分混合）

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（最大回転数で充分混合）

特級エタノール (>99%) を100 μ 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（最大回転数で充分混合）

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

6 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

