

F. 接着培養細胞の回収方法

接着細胞の回収には、次の 2 種類の方法のいずれかを用います。最初のプロトコールでは細胞を剥がすためにトリプシン-EDTA 溶液を使用します。2 番目のプロトコールでは、掻き取り法により細胞を回収します。

トリプシン処理による接着細胞の回収

準備するもの

(溶液の組成はセクション VIII.G をご覧ください)

- ・ 1× トリプシン-EDTA 溶液
- ・ 1× PBS

1. 細胞を氷冷した 1× PBS (調製法はセクション VIII.G を参照) で洗浄する。滅菌したトリプシン-EDTA 溶液 (1× PBS に溶解) を準備する。1× PBS による最後の洗浄液を除いた後、細胞の単層培養を覆うに足る程度のトリプシン溶液を添加する (例: 150mm フラスコには 2ml、100mm プレートには 1ml)。培養容器を揺らし、トリプシン溶液が均等に行き渡るようにする。プレートまたはフラスコを 37°C インキュベーターに入れ、細胞が剥がれ始めるまでインキュベートする (通常 1~2 分程度)。
2. 細胞が剥がれ始めたら、すぐにトリプシン溶液を除く (プレートまたはフラスコを傾けて、できる限り溶液をピペットで除去する)。培養容器の底面や側面を手のひらで叩き、残った接着細胞を剥がす。1× PBS で、細胞をリンスする。
3. 500×g で 5 分間遠心し、細胞を滅菌した遠心チューブに回収する。上清を除去する。
4. セクション IV.D 『培養細胞の溶解方法』のステップ 3 に進む。

掻き取り法による接着細胞の回収

マイクロウェルプレートで接着細胞を培養する場合、細胞の種類やウェルの大きさによりますが、1 ウェルあたり $3.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 個の細胞を培養できます。

1. SV RNA Lysis Buffer を添加し、培養容器から手作業で細胞を掻き取る方法を用いると素早く溶解液を調製できます。推奨する SV RNA Lysis Buffer の添加量は、6~96 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 175 μ l、フラスコであれば最少量 (例えば 1~2ml) です。SV RNA Lysis Buffer を添加し、細胞を掻き取り、ピペッティングにより混合する。

備考: 6~12 ウェルプレートでは、SV RNA Lysis Buffer をウェルの培養面にピペッティングで添加し、全ての細胞にかかるようにしてください。個々のウェルに対して掻き取りを行う必要はありません。

2. もしも、溶解液の粘性が高い場合は、20 ゲージの針を通してゲノム DNA をせん断する。175 μ l の細胞溶解液を 1.5ml のスクリュー式キャップチューブまたは微量遠心チューブに移す。
3. セクション IV.D 『培養細胞の溶解方法』のステップ 5 に進む。

G. バッファーおよび溶液の組成

PBS buffer, 10 × (1 リットル分)

11.5g Na₂HPO₄
2g KH₂PO₄
80g NaCl
2g KCl

1 リットルの滅菌した脱イオン水に溶解する。1 × PBS の pH は 7.4 です。

SV RNA Lysis Buffer

4M GTC
0.01M Tris (pH 7.5)
0.97% β-Mercaptoethanol
(BME) (添加後の濃度)

SV RNA Red Blood Cell Lysis Solution (血液からの RNA 精製用)

5mM MgCl₂
10mM NaCl
10mM Tris-HCl (pH 7.0)

トリプシン-EDTA 溶液、1 ×

0.05% trypsin (w/v)
0.53mM EDTA
1 × PBS に溶解する。

SV DNase Stop Solution (高濃度)

5M guanidine isothiocyanate
10mM Tris-HCl (pH 7.5)
エタノールで希釈すると終濃度は 2M guanidine isothiocyanate、4mM Tris-HCl (pH 7.5)、57% エタノールとなります。

SV RNA Wash Solution (高濃度)

162.8mM 酢酸カリウム
27.1mM Tris-HCl (25°C で pH 7.5)

エタノールで希釈すると終濃度は 60mM 酢酸カリウム、10mM Tris-HCl (25°C で pH 7.5)、60% エタノールとなります。

Yellow Core Buffer

0.0225M Tris (pH 7.5)
1.125M NaCl
0.0025% yellow dye (w/v)

H. 関連製品

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|---|-------|--------|
| One-Way Luer-Lo [®] Stopcocks | 10 個 | A7261 |
| Vac-Mar [®] Laboratory Vacuum Manifold | 1 セット | A7231 |
| Vac-Mar [®] Jr. Laboratory Vacuum Manifold | 1 個 | A7660 |

Total RNA 精製システム

| 製品名 | カタログ番号 |
|--|--------|
| RNAgents [®] Total RNA Isolation System | Z5110 |

このシステムには、6×1g の組織または 6×10⁸ 個の培養細胞から、Total RNA 精製をおこなうために必要とされる試薬がすべて含まれます。

Total RNA からの mRNA 精製

| 製品名 | カタログ番号 |
|---|--------|
| PolyATtract [®] mRNA Isolation System II | Z5200 |

このシステムには、1～5mg の Total RNA から mRNA の精製をそれぞれ 3 回行うために必要とされるすべての試薬が含まれます。

| 製品名 | カタログ番号 |
|--|--------|
| PolyATtract [®] mRNA Isolation System I | Z5210 |

このシステムには、1～5mg の Total RNA から mRNA の精製をそれぞれ 3 回行うために必要とされるすべての試薬が含まれます。Magnetic Separation Stand 付き。

| 製品名 | カタログ番号 |
|--|--------|
| PolyATtract [®] mRNA Isolation System III | Z5300 |

このシステムには、100～1,000μg Total RNA から mRNA の精製を 15 回行うために必要とされるすべての試薬が含まれます。Magnetic Separation Stand 付き。

| 製品名 | カタログ番号 |
|---|--------|
| PolyATtract [®] mRNA Isolation System IV | Z5310 |

このシステムには、100～1,000μg Total RNA から mRNA の精製を 15 回行うために十分なすべての試薬が含まれます。Magnetic Separation Stand は含まれません。

生体サンプルからのダイレクト mRNA 精製

| 製品名 | カタログ番号 |
|--|--------|
| PolyATtract [®] System 1000 (with Magnetic Separation Stand) | Z5420 |

このシステムには、2g の組織または 4×10⁸ 個の組織培養細胞から mRNA の精製を行うために十分なすべての試薬が含まれます。

| 製品名 | カタログ番号 |
|---|--------|
| PolyATtract [®] System 1000 (without Magnetic Separation Stand) | Z5400 |

Magnetic Separation 製品

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|-----------------------------------|-----------|--------|
| MagneSphere® Technology Magnetic | 0.5ml | Z5331 |
| Separation Stand (two-hole) | 1.5ml | Z5332 |
| | 12 × 75mm | Z5333 |
| MagneSphere® Technology Magnetic | 0.5ml | Z5341 |
| Separation Stand (twelve-hole) | 1.5ml | Z5342 |
| | 12 × 75mm | Z5343 |
| PolyATtract® System 1000 Magnetic | | Z5410 |
| Separation Stand | | |

- (a) The PCR process is covered by patents issued and applicable in certain countries. Promega does not encourage or support the unauthorized or unlicensed use of the PCR process.
- (b) Patent Pending.
- (c) U.S. Pat. No. 5,552,302, European Pat. No. 0 422 217 and Australian Pat. No. 646803 have been issued to Promega Corporation for the methods and compositions for production of human recombinant placental ribonuclease inhibitor (PRI). Inhibitors of Angiogenin, which comprises a segment of human PRI, is the subject of U.S. Pat. Nos. 4,966,964, 5,019,556 and 5,266,687 assigned to the President and Fellows of Harvard College and exclusively licensed to Promega Corporation.
- (d) U.S. Pat. No. 5,646,263 has been issued to Promega Corporation for a high efficiency method for isolating target substances using a multisample separation device. U.S. Pat. No. 5,693,784 has been issued to Promega Corporation for methods for creating agglomerates from colloidal particles.
- (e) U.S. Patent No. 5,567,326 has been issued to Promega Corporation for a multisample magnetic separation device.

© 1997, 1998 Promega Corporation.

All Rights Reserved. MagneSphere, PolyATtract, RNAsents, RNasin, Vac-Manand Wizard are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Series 9600 is a trademark of Promega Corporation.

Luer-Lok is a registered trademark of Becton Dickinson. Omni is a trademark of Omni International.
Tissuemizer is a trademark of Tekmar, Inc.

All prices and specifications are subject to change without prior notice. Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

SV Total RNA Isolation System: 簡易プロトコール

この簡易プロトコールは、SV Total RNA Isolation System に習熟したユーザーが簡単に流れを追えるように意図して作製されました。初めて SV Total RNA Isolation System をお使いになるときは、詳細なプロトコールにしたがってください（セクション IV）。

| <p>実験を始める前に</p> | <p>β-Mercaptoethanol (BME) が SV RNA Lysis Buffer に添加されているかどうか、また SV RNA Wash Solution および SV DNase Stop Solution にエタノールが添加されているかどうかを確認する（セクション IV.A を参照）。凍結乾燥した DNase I に、バイアルに指示された量の Nuclease-Free Water を添加する。ボルテックスは行わないでください。Vacuum Adapters（カタログ番号 A1331）は吸引法で行う際に必要となります。</p> | | | | | | | | |
|------------------------------------|--|----|--------------------------|--------------------|------------|---------------------------|-----------|---------|-----------|
| <p>遠心法 (セクション IV.E)</p> | <ol style="list-style-type: none"> SV RNA Lysis Buffer (BME 添加) を滅菌したチューブに 175μl 添加する。バッファーを含めた重量を測定し、記録する(a)。 溶解する組織、血液または細胞サンプルを準備する。 組織を 175μl の Lysis Buffer の入っているチューブに素早く移し入れる。転倒混和によりよく混合する。 組織と Lysis Buffer を含めたチューブの重さを測定する(b)。Lysis Buffer と組織重量の割合が 30mg/175μl となるようにしてください。必要であれば、この割合になるように Lysis Buffer を組織に添加してください。 $\text{組織重量} = \text{--- (b)} - \text{--- (a)} = \text{---}$ SV RNA Dilution Buffer (青色) を 350μl 添加する。3~4 回転倒混和する。70$^{\circ}$C の恒温槽に入れて、3 分間インキュベートする。 12,000~14,000 $\times g$ で 10 分間遠心する。ピペティングで上清を新しいチューブに移す。 95% エタノールを 200μl 添加し、3~4 回ピペティングして混ぜる。 この混合液を Spin Basket Assembly に移し、12,000~14,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。溶出液を捨てる。 SV RNA Wash Solution (エタノール添加) を 600μl 加え、12,000~14,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。溶出液を捨てる。 以下に示した表を参考に DNase 反応ミックスを調製する。 <table border="1" data-bbox="544 1429 1428 1556"> <thead> <tr> <th>溶液</th> <th>溶液量 \times サンプル数 = 総液量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Yellow Core Buffer</td> <td>40μl</td> </tr> <tr> <td>MnCl₂, 0.09M</td> <td>5μl</td> </tr> <tr> <td>DNase I</td> <td>5μl</td> </tr> </tbody> </table> <p>ピペティングで穏やかに混合する。ボルテックスしないでください。</p> この溶液 50μl を Spin Basket 内部のメンブレンに直接添加する。室温で 15 分間インキュベートする。 200μl の SV DNase Stop Solution (エタノール添加済み) を Spin Basket に添加し、12,000~14,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。 SV RNA Wash Solution 600μl を添加し、12,000~14,000 $\times g$ で 1 分間遠心する。Collection Tube を空にする。 SV RNA Wash Solution を 250μl 添加し、高速で 2 分間遠心する。Spin Basket を Collection Tube から Elution Tube に移し変える。 Nuclease-Free Water をメンブレンに 100μl 添加する。12,000~14,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、RNA を溶出する。精製した RNA は、-20$^{\circ}$C から -70$^{\circ}$C で保存する。 | 溶液 | 溶液量 \times サンプル数 = 総液量 | Yellow Core Buffer | 40 μ l | MnCl ₂ , 0.09M | 5 μ l | DNase I | 5 μ l |
| 溶液 | 溶液量 \times サンプル数 = 総液量 | | | | | | | | |
| Yellow Core Buffer | 40 μ l | | | | | | | | |
| MnCl ₂ , 0.09M | 5 μ l | | | | | | | | |
| DNase I | 5 μ l | | | | | | | | |

SV Total RNA Isolation System: 簡易プロトコール

吸引法
(セクション IV.F)

1. SV RNA Lysis Buffer (BME 添加) を滅菌したチューブに 175µl 添加する。バッファーを含めた重量を測定し、記録する(a)。
2. 溶解する組織、血液または細胞サンプルを準備する。
3. 組織を 175µl の Lysis Buffer の入っているチューブに素早く移し入れる。転倒混和によりよく混ぜる。
4. 組織と Lysis Buffer を含めた重さを測定する(b)。Lysis Buffer と組織重量の割合が 30mg/175µl となるようにしてください。必要であれば、この割合になるように Lysis Buffer を組織に添加してください。
組織重量 = __ (b) - __ (a) = __
5. SV RNA Dilution Buffer (青色) を 350µl 添加する。3～4 回転倒混和して混ぜる。70°C の恒温槽に入れて、3 分間インキュベートする。
6. 12,000～14,000 × g で 10 分間遠心する。ピペッティングにより上清を新しいチューブに移す。
7. 95% エタノール、200µl を上清に添加し、3～4 回ピペッティングして混ぜる。Miniprep Vacuum Adapter を Luer-Lok® 結合部を介してマニフォールドのポートのひとつに結合させる。Vacuum Adapter に Spin Basket をゆっくりと挿入する。Spin Basket に溶液を移す。吸引を開始し、溶液を通す。**備考**：Collection Tube にラベルをして、ステップ 13 まで保存してください。
8. SV RNA Wash Solution 900µl を添加する。溶液が無くなるまで吸引する。吸引を止めて使用していないマニフォールドの栓を開放する。**次のステップに進む前に、全ての吸引圧がなくなったことを確認してください。**
9. 以下に示した表を参考に DNase 反応ミックスを調製する。

| 溶液 | 溶液量×サンプル数 = 総液量 |
|---------------------------|-----------------|
| Yellow Core Buffer | 40µl |
| MnCl ₂ , 0.09M | 5µl |
| DNase I | 5µl |

ピペッティングで穏やかに混合する。ボルテックスしないでください。

10. この溶液 50µl を Spin Basket 内部のメンブレンに直接添加する。室温で 5 分間インキュベートする。
11. 200µl の SV DNase Stop Solution (エタノール添加済み) を Spin Basket に添加する。開いているポートを閉じ、吸引を開始し、溶液を Spin Basket に通す。
12. 900µl の SV RNA Wash Solution を添加し、吸引を開始し、溶液を Spin Basket に通す。この洗浄をもう 1 度繰り返す。
13. 吸引を止め、真空を解除する。マニフォールドから Spin Basket を取り外し、準備しておいた Collection Tube に挿入する。これらの Spin Basket と Collection Tube を 12,000～14,000 × g で 1 分間遠心する。
14. Spin Basket を Collection Tube から Elution Tube に移し変える。RNA を溶出するために、100µl の Nuclease-Free Water を Spin Basket に添加し、12,000～14,000 × g で 1 分間遠心する。精製した RNA は、-20°C から -70°C で保存する。