

PureYield™ RNA Midiprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z3740 AND Z3741

Quick
PROTOCOL

* 注意: この製品の使用には、スイングローターが必要です。RNA を取り扱いますので、必ず手袋を着用し、無菌操作で行ってください。器具は、RNase フリーのプラスチック製を使用し、再利用は避けてください。

<試薬の調製>

RNA Lysis Solution (RLA)

* 注意: β -メルカプトエタノールを添加した RNA Lysis Buffer (RLA) は 4°C で、1 ヶ月は安定に保存できます。長期間にわたって使用する場合は、RLA を分注し、使用時に 20 μ l/ml になるように β -メルカプトエタノールを添加してください。

キットサイズ	β -メルカプトエタノール添加量
2 回分; カタログ番号 Z3742 5ml RNA Lysis Buffer (RLA).	100 μ l
10 回分; カタログ番号 Z3740 50ml RNA Lysis Buffer (RLA).	1ml
50 回分; カタログ番号 Z3741 100ml RNA Lysis Buffer (RLA)	2ml

RNA Wash Solution (RWA)

* 注意: 95% エタノールを添加した RNA Wash Solution (RWA) は、しっかりとフタを閉めて、室温で保存してください。

キットサイズ	95% エタノール添加量
2 回分; カタログ番号 Z3742 11.8ml concentrated RNA Wash Solution (RWA)	20ml
10 回分; カタログ番号 Z3740 206ml concentrated RNA Wash Solution (RWA)	350ml
50 回分; カタログ番号 Z3741 206ml concentrated RNA Wash Solution (RWA)	350ml

<用意するもの>

- ・70°C ヒートブロック あるいは ウォーターバス
- ・15ml, 50ml ポリプロピレン チューブ
- ・スイングローター (50ml チューブ用)

<ライセートの調製>

各サンプルでの前処理

・組織サンプル

* 注意: RNA Lysis Solution (RLA) は氷上 (4°C) で冷やす。

1. β -メルカプトエタノールを添加した氷冷 RNA Lysis Buffer (RLA) を組織サンプルに加える。
2. RLA を含んだ重量を測定し、表 1 の条件を満たすようにサンプル量を調整する。(150mg/ml 以下が望ましい)
3. できるだけ手早く組織をホモジナイズする。
* 注意: ホモジナイズの際、泡立ったり、溶解が不十分な場合は、RNA 収量の低下の原因になります。

4. 氷上 (4°C) で 10 分間インキュベーションして完全に溶解する。脾臓サンプルなど核酸や細胞残渣を多く含み、細胞溶解の際、粘性が高いサンプルの場合には、RLA を 2 倍量になるように添加し、十分に溶解する。
5. クリアーライセートの調製ステップに進む。

・培養細胞サンプル

* 注意: 1×10^7 cells から最大 5×10^7 cells までの細胞数から RNA の精製ができるが、表 1 の最大ライセート濃度を超えないように注意する。回収した細胞をすぐに使用しない場合は、-70°C に保管する。

* 注意: RNA Lysis Solution (RLA) は氷上 (4°C) で冷やす。

1. $1 \sim 5 \times 10^7$ cells を 50ml 遠心チューブを用いて、300 x g で 5 分間 (4~23°C) 遠心して細胞を集める。上清を捨て、25ml の滅菌氷冷 PBS を添加し、穏やかに細胞を洗浄して、再度 300 x g で 5 分間 (4~23°C) 遠心して細胞を集める。上清を捨てて、細胞ペレットを氷上に置く。
2. 2ml の β -メルカプトエタノールを添加した氷冷 RNA Lysis Buffer (RLA) を細胞ペレットに加えボルテックスを行う。細胞塊が残る場合は、ホモジナイザーなどを用いて手早く、完全に細胞を溶解する。泡立ないように操作を行い、氷上で 10 分間インキュベーションして完全に溶解させる。
* 注意: ホモジナイズの際、泡立ったり、溶解が不十分な場合は、RNA 収量の低下の原因になります。
3. クリアーライセートの調製ステップに進む。

・その他のサンプル

PureYield™ RNA Midiprep System は、サンプルの溶解方法を最適化することで、細菌、酵母、植物組織、血液など様々なサンプルからトータル RNA を精製できる。詳しくは TM279 セクション VIII を参照。(ホルマリン固定やパラフィン包埋サンプルなどからの RNA 精製には適していません。)

技術的なお問合せは:

e-mail: prometec@jp.promega.com • Tel: 03-3669-7980 • Fax: 03-5614-6097

Revised 08/06



表 1. 推奨するライセートの最大濃度

サンプルの種類	マウス 1 尾(30g)あたりの各組織重量(参考情報)	最大サンプル処理量	組織ライセートの最大濃度
肝臓	940mg	300mg	150mg/ml
腎臓	210mg	200mg	100mg/ml
筋肉	—	300mg	150mg/ml
脾臓	90mg	150mg	75mg/ml
心臓	150mg	300mg	150mg/ml
脳	463mg	300mg	150mg/ml
肺	200mg	300mg	150mg/ml
培養細胞	—	5 × 10 ⁷ cells	2.5 × 10 ⁷ cells/ml
細菌	—	1 × 10 ¹⁰ cells	5 × 10 ⁹ cells/ml
植物組織	—	300mg	150mg/ml
酵母	—	5 × 10 ⁸ cells	2.5 × 10 ⁸ cells/ml
血液	—	20ml	—

クリアーライセートの調製

- * 注意: サンプルから調製したライセートは、必ずクリアーライセートの調製を行ってください。
- * 注意: サンプル量を変更する場合は、サンプル量と試薬量の比を変えないでください。

- 15mlのディスポーザブルのフタ付きチューブに前処理したサンプル 2mlを入れる。
* 注意: 溶解液の液量が 2ml の倍数でない場合は、適切な量の RNA Lysis Buffer を加えて、2ml の倍数にする。
- RNA Dilution Buffer (青色) 4ml を加えて、3~4 回転倒混和した後、ボルテックスで混合する。
- 白色の Clearing Agent を均一の懸濁液になるまでボルテックスで混合する。
* 注意: チューブを逆さまにして混合されていない部分がないように確認してください。この操作は数分かかります。
* 注意: Clearing Agent は、時間がたつにつれて元の状態に戻りますので、サンプルに添加する前に、再度ボルテックスします。よく混合されていれば、スムーズにピペットで溶液を取ることができます。容器を軽く叩き、上下に転倒混和して、Clearing Agent resin が容器の底に凝集していないことを確認してください。
* 注意: Clearing Agent Resin が完全に懸濁していない場合、total RNA の収量が低下し、回収した RNA にゲノム DNA が混入します。
- Clearing Agent 1ml を添加し、2~3 回転倒混和後、均一になるまでボルテックスで混合する。
* 注意: RNA Dilution Buffer と Clearing Agent をあらかじめ混ぜておくことは避けてください。Clearing Agent は、白い粉末を形成することがあり、こぼれ落ちた場合は、湿ったペーパータオルで集めて無害な廃棄物として処理できます。
- サンプルを 70°C のヒートブロックに 5 分間置く。
* 注意: ヒートブロックにサンプルを置く前に、70°C になっていることを確認してください(許容温度範囲: 65~75°C)。加熱後のサンプルは、凝集した沈殿物を形成します。サンプルと Clearing Agent の混合物を低温で加熱すると、サンプルにゲノム DNA が混入します。
- 室温に少なくとも 5 分間放置してサンプルを冷却する。
* 注意: Clearing Column にサンプルをアプライする前に冷却が不十分な場合、精製した RNA にゲノム DNA が混入します。
- 新しい手袋を着用して、50ml コレクションチューブの上に Clearing Column をセットする。
- サンプルが均一の溶液になるようにボルテックスなどで十分に攪拌する。
- Clearing Column にサンプルをアプライする。室温(22~25°C) 2,000xg、2 分間遠心する。
* 注意: サンプルの残渣は、Clearing Column のメンブレン上に塊として残ります。青緑色のクリアーライセートがコレクションチューブに得られ、このクリアーライセートに RNA が含まれます。
- Clearing Column を捨てる。コレクションチューブに残渣ペレットが見られるようであれば、クリアーライセートだけを新しい 50ml チューブに移す。
- 遠心法もしくは吸引法のプロトコールに進む。

PureYield™ RNA Midiprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z3740 AND Z3741

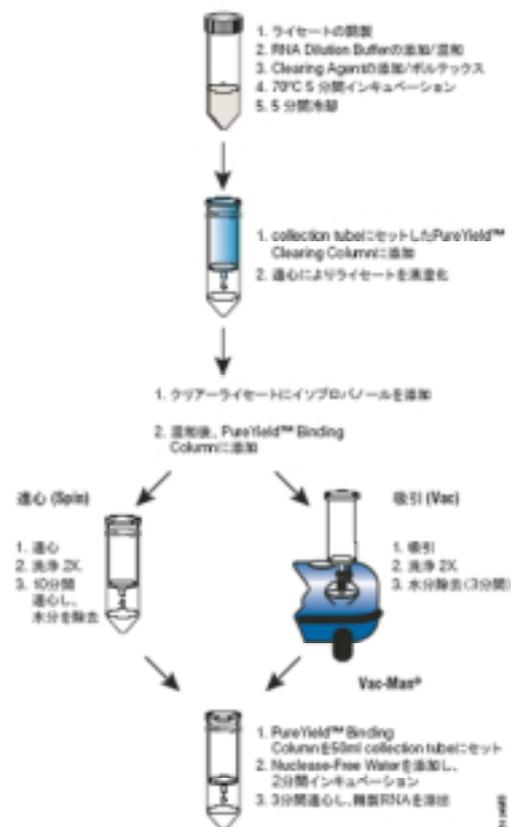
Quick
PROTOCOL

RNA 精製 遠心法

1. 新しい手袋を着用し、Binding Column を50mlコレクションチューブの上にセットする。
2. クリアーライセートに 4ml のイソプロパノールを添加し、キャップをして十分に混合する。Binding Column にクリアーライセートを注ぐ。
* 注意: イソプロパノールとの混合の際、ボルテックスは使用しないでください。
3. 2,000xg、室温、10 分間スイングローターで遠心する。
4. Binding Column をコレクションチューブから外し、コレクションチューブ内の溶液を捨てて、再度 Binding Column をセットする。
5. エタノールを添加した RNA Wash Solution(RWA) 20ml を Binding Column に加え、2,000 x g、室温、5 分間遠心する。
6. ステップ 4 と同様に、コレクションチューブを空にして、ステップ 5 と同様に RWA10ml を添加する。2,000 x g、室温、10 分間遠心する。

オプション: エタノールのキャリーオーバーを減らすには、コレクションチューブを再度、空にしてから 2,000 x g、5 分間遠心する。

7. コレクションチューブ内の溶液に Binding Column の先端が触れないように注意深く、取り外し、新しい 50ml コレクションチューブにセットする。
* 注意: もし、コレクションチューブ内の溶液に Binding Column の先端が触れた場合は、再度、空のコレクションチューブにセットして 2,000 x g、1 分間遠心する。
8. 1ml の Nuclease-Free Water をフィルター付きチップで、Binding Columns のメンブレン表面が完全に覆われるように添加する。室温で 2 分間インキュベーションし、2,000 x g、室温、3 分間遠心して、RNA を回収する。
9. Binding Columns を捨てて、得られた RNA 溶液は、RNase-free の低吸着(シリコンコートなど)滅菌チューブに入れて-70°Cで保存する。
* 注意: 遠心法では、エタノールの混入が見られることがあります。その場合は、10 分間、空気にさらして揮発させます。37°Cなど温度を上げることで揮発の割合は増加します。



PureYield™ RNA Systemの操作概要

<RNA 精製 吸引法>

1. 新しい手袋を着用し、Binding Column を吸引マニホールドにセットする。
2. クリアーライセートに 4ml のイソプロパノールを添加し、キャップをして十分に混合する。Binding Column にクリアーライセートを注ぐ。
* 注意: イソプロパノールとの混合の際、ボルテックスは使用しないでください。
3. カラム内のライセートがすべて通過するまで吸引し、コックを閉める
* 注意: ほとんどのサンプルは、2 分以内にカラムを通過します。もし、5-10 分以上、かかる場合は遠心法に切り換えてください。
4. 使用していないポートのコックを開けて、減圧を解除してから吸引ポンプのスイッチを切る。使用していないポートのコックを閉めてから、Binding Columns を付けているコックを開ける。
* 注意: 次の操作を行う前に、必ずこの操作を行ってください。これは、カラムへの逆向きの圧力がかかることを防ぐためです。逆向きの圧力は、メンブレンを浮き上がらせる可能性があります。メンブレンが浮き上がった場合は、RNase-free のチップなどを使用して、メンブレンを元の位置に戻してください。

技術的なお問合せは:

e-mail: prometec@jp.promega.com • Tel: 03-3669-7980 • Fax: 03-5614-6079



Promega

Revised 08/06

PureYield™ RNA Midiprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z3740 AND Z3741

Quick
PROTOCOL

5. エタノールが添加された RNA Wash Solution(RWA) 20ml を Binding Column に添加する。すべての溶液が通過するまで吸引し、コックを閉める。
6. 使用していないポートのコックを開けて、減圧を解除してから吸引ポンプのスイッチを切る。使用していないポートのコックを閉めて、RWA 10ml を Binding Column に添加し、吸引する。
7. Binding Column 内の溶液が全て通過したら、全てのポートを開けて 3 分間メンブレンを乾かす。
8. Binding Columns を新しい 50ml コレクションチューブにセットし、1ml の Nuclease-Free Water をメンブレンの表面が全て覆われるように添加する。室温で 2 分間インキュベーションした後、2,000 × g、3 分間遠心し、RNA を回収する。
9. Binding Columns を外し、得られた RNA 溶液は、RNase-free の低吸着(シリコンコートなど)滅菌チューブに入れて -70°C で保存する。

このシステムを利用して精製した平均的なトータルRNAの収量は以下の通りになります。

表2. トータルRNAの平均収量と純度

サンプルの種類	サンプル量	収量 (μ g)	純度 (A260/A280)
ラット組織			
肝臓	300mg	990.7	1.9
肺	300mg	193.9	2.1
腎臓	200mg	329.0	2.1
脾臓	150mg	430.9	2.1
脳	300mg	305.5	2.1
心臓	300mg	255.3	2.1
筋肉	300mg	115.1	2.1
大腸菌	1×10^{10} cells	782.7	2.1
植物組織	300mg	87.8	2.1
培養細胞			
HEK293T	5×10^7 cells	453.3	1.9
HeLa	5×10^7 cells	329.2	2.0
血液	20ml (10ml/tube)	~10*	*

*白血球数によって値が異なります。 5×10^6 cells/ml 程度の白血球では、収量は 10μ g 程度になります。

技術的なお問合せは:

e-mail: prometec@jp.promega.com • Tel: 03-3669-7980 • Fax: 03-5614-6079



Revised 08/06