

# SV Total RNA Isolation System

日本語プロトコール No. TM048J 2001年 6月作成

カタログ番号 Z3100 および Z3101

## 目次

I. はじめに .....	2
II. キットの構成 .....	2
III. 考慮が必要な事項 .....	3
A. RNA の直接精製 .....	3
B. 精製した RNA のアプリケーション .....	5
C. RNase のない環境作り .....	5
IV. RNA の単離と精製方法 .....	6
A. 溶液の調製 .....	6
B. 30mg 以下の組織からの細胞溶解液の調製方法 .....	7
C. 30mg を越える組織からの細胞溶解液の調製方法 .....	9
D. 培養細胞の溶解方法 .....	9
E. 遠心法による RNA 精製 .....	10
F. 吸引法による RNA 精製 .....	11
V. RNA の収量と精製度の決定 .....	12
VI. 困った時には・・・ .....	14
VII. 参考文献 .....	18
VIII. 付録 .....	19
A. 白血球からの Total RNA の精製 .....	19
B. 植物組織からの Total RNA の精製 .....	20
C. グラム陽性 ( <i>B. subtilis</i> ) および陰性 ( <i>E. coli</i> ) 菌からの RNA の精製 .....	20
D. 酵母からの RNA 精製 .....	21
E. 溶解液調整のためのヒント .....	21
F. 接着培養細胞の回収方法 .....	22
G. バッファーと溶液の組成 .....	23
H. 関連製品の紹介 .....	24
簡易プロトコール .....	27

## I. はじめに

組織や培養細胞から精製した RNA の精製度や完全性は、RT-PCR<sup>®</sup> や RNase protection assay、プライマー伸長、ノーザンブロット解析、Poly(A) + RNA のオリゴ (dT) セレクション、*in vitro* 翻訳、cDNA ライブラリーの構築などのアプリケーションが効率的に行われるために重要です。近年、RT-PCR が、少量の Total RNA や mRNA から特異的な mRNA を同定および定量するための強力な方法として登場しました。RT-PCR を用いれば、cDNA ライブラリーの構築やスクリーニングの必要なく、cDNA のクローニングも可能です。研究手段としての増幅技術の使用が拡大するにつれ、高品質な RNA をゲノム DNA の混入なく少量の開始サンプル（組織や培養細胞）から迅速に単離できる方法が必要とされてきています。SV Total RNA Isolation System は、これらの需要を満たすように作製されています。

SV Total RNA Isolation System は、処理サンプル数にもよりますが、組織や培養細胞、白血球から、1 時間以内に高純度でインタクトな Total RNA を精製するための、簡単かつ迅速な精製方法です (セクション VIII.A 参照)。Wizard® Plus SV DNA Purification System<sup>®</sup> (カタログ番号 A1330) のように、遠心法または吸引法 (Spin or Vacuum; "SV") のいずれの方法でも精製が可能です。組織の種類や機能、RNA の発現レベルによりますが、1 回の精製で 60mg までの組織を処理できます。このシステムはまた、増幅ベースの方法論において妨げとなるゲノム DNA のコンタミを大幅に削減するために DNase 処理を手順に組込んでいます。精製は、フェノール：クロロフォルム抽出やエタノール沈殿などの処理を行うことなく進められ、最終的に調製した RNA への DNase のキャリーオーバーもありません。

SV Total RNA Isolation System では、ゲノム DNA と RNA の両方を同じサンプルから調製することもできます。このシステムを用いた DNA の単離に関する実験方法や追加情報につきましては、参考文献 1、またはプロメガのウェブサイト ([www.promega.com](http://www.promega.com)) をご覧ください。

## II. キットの構成

製品名	サイズ	カタログ番号
SV Total RNA Isolation System	50 回分	Z3100

各システムには、組織や細胞または血液からの 50 回の Total RNA 精製に十分な試薬が含まれます。

- 10 pks Spin Column Assemblies and Elution Tubes (5 each/pack)
- 50ml SV RNA Lysis Buffer
- 20ml SV RNA Dilution Buffer (blue buffer)
- 900µl β-mercaptoethanol (97.4%)
- 1 vial DNase I (lyophilized)
- 250µl MnCl<sub>2</sub>, 0.09M
- 2.5ml Yellow Core Buffer
- 5.3ml SV DNase Stop Solution (concentrated)
- 58.8ml SV RNA Wash Solution (concentrated)
- 13ml Nuclease-Free Water
- 1 Protocol

製品名	サイズ	カタログ番号
SV Total RNA Isolation System, Trial Size	10 回分	Z3101

各システムには、組織や細胞または血液からの 10 回の Total RNA 精製に十分な試薬が含まれます。

- 2 pks Spin Column Assemblies and Elution Tubes (5 each/pack)
- 10ml SV RNA Lysis Buffer
- 4ml SV RNA Dilution Buffer (blue buffer)
- 900µl β-mercaptoethanol (97.4%)
- 1 vial DNase I (lyophilized)
- 250µl MnCl<sub>2</sub>, 0.09M
- 2.5ml Yellow Core Buffer
- 5.3ml SV DNase Stop Solution (concentrated)
- 11.8ml SV RNA Wash Solution (concentrated)
- 1.25ml Nuclease-Free Water
- 1 Protocol



製品名	サイズ	カタログ番号
Miniprep Vacuum Adapters <sup>(b)</sup>	20 個	A1331

製品名	サイズ	カタログ番号
SV RNA Lysis Buffer	50ml	Z3051
SV RNA Red Blood Cell Lysis Solution	200ml	Z3141

**備考：**SV RNA Dilution Buffer および Yellow Core Buffer はそれぞれ青と黄色に着色され、容易に見分けることができるようになっています。Yellow Core Buffer の黄色い色素は、DNase 処理のステップでメンブレンにDNase ミックスが行き渡っているかどうかを確認できるようにしたものです。この色素は、RNA の品質や下流のアプリケーションにおける性能に影響を与えません。

**保存条件：**SV RNA Lysis Buffer は、β-Mercaptoethanol (BME) を加えて 4℃ で保存してください。DNase I の溶解に関してはセクション IV.A の『溶液の調製』をご覧ください。その他のすべての構成成分は 22~25℃ で保存してください。適正な保存および取り扱いをしていただいた場合、この製品は購入後 6ヶ月間保証されます。

**注意：**グアニジンチオシアネートと β-Mercaptoethanol は毒性のある溶液ですので、これらの溶液を取り扱う場合は手袋を着用し、安全規定に従ってください。ヒトまたは感染性の組織または血液サンプルを処理する際には、有害物質の標準的な取り扱い手順や廃棄方法に従ってください。

### III. 考慮が必要な事項

#### A. RNA の直接精製

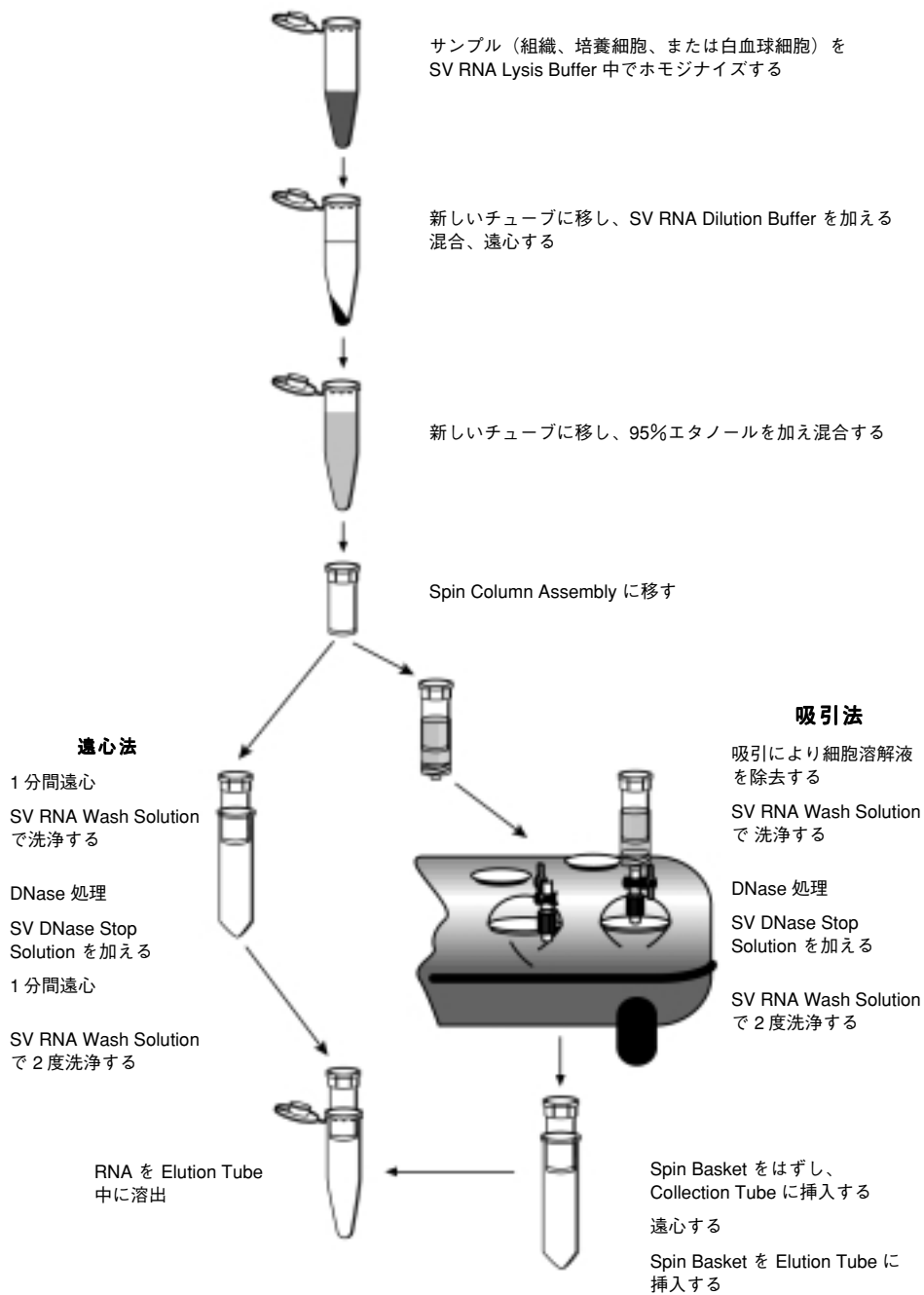
インタクトな RNA を精製するには 4つのステップが重要です。：効率的な細胞・組織の破碎、核タンパク質複合体の変性、内在性のリボヌクレアーゼ (RNase) の不活化および混入した DNA やタンパク質の除去です。最も重要なステップは、細胞破碎に伴い膜結合型オルガネラから放出される内在性 RNase を迅速に不活化する操作です。

SV Total RNA Isolation System では、細胞抽出液中に存在するリボヌクレアーゼを不活化するため、グアニジンチオシアネート (GTC) と β-メルカプトエタノール (BME) の変性特性および保護特性を組み合わせています(2)。GTC は SDS と結合すると核タンパク質複合体を変性する方向に働き、RNA が溶液中に放出されタンパク質の混入なく単離されるようにします。高濃度の GTC の存在下で細胞抽出液を希釈すると、細胞タンパク質が選択的に沈殿し、RNA は溶液中に残ります。細胞溶解液中の沈殿したタンパク質や細胞残さを遠心によって除去した後、エタノールによって RNA を選択的に沈殿させ、Spin Basket 中のガラス繊維のシリカ表面に結合させることによって溶液中から回収します。各 Spin Column Assembly は、Spin Basket と 2ml の Collection Tube から構成されます。細胞溶解液から沈殿したタンパク質や細胞残さを効率良く除けば、これらの細胞溶解液の上清は遠心法または吸引法によって Spin Basket に結合させることができます。この結合はカオトロピック塩によって水分子の構造が壊されることによって急激に起こり、これにより核酸のシリカへの吸着が促進されます。混入したゲノム DNA を消化するため、RNase-Free DNase I を直接シリカメンブレンに添加します。結合した Total RNA は、簡単な洗浄ステップにより混入した塩やタンパク質、細胞中の不純物などからさらに精製されます。最後に、Nuclease-Free Water を添加して Total RNA をメンブレンから溶出します。この手法を用いれば、有機溶媒による抽出や沈殿操作なしに、わずか一度の精製手順で高純度の Total RNA 画分を回収することができます。また、この手法は少量の組織や血液、あるいは培養細胞で容易に実施でき、複数のサンプルを処理するためにもご使用いただけます。

**備考：**SV Total RNA Isolation System を吸引法で行う場合は、Miniprep Vacuum Adapters (カタログ番号 A1331) が必須で、別に購入する必要があります。



SV Total RNA Isolation System の構成成分は、Wizard® Plus または Wizard® Plus SV DNA Purification System の構成成分と組み合わせたり、代替品として使用しないで下さい。



所要時間：60 ～ 70 分間

**図 1. SV Total RNA Isolation System の操作手順**

プロトコルの詳細は、セクション IV および VIII.A-D. をご参照ください。

## 処理量の限界

SV Total RNA Isolation System は、広範な RNA 発現レベルを示す組織、血液、または培養細胞から Total RNA を精製するために開発され最適化したものとなっています。マウスの肝臓のように RNA が豊富に存在する組織では、1 回の精製で 30mg の新鮮な組織を処理することができます。肺のように RNA 量の少ない組織から最大限に回収したい場合には、最大で 60mg までの組織から精製することができます（セクション V の表 2 を参照）。過剰量の組織または RNA サンプルの処理は、メンブレンの目詰まりを引き起こしたり、精製度を低下させる原因となりますので避けてください。溶解液の最大処理量は、各 Spin Basket につき 175 $\mu$ l です。組織量が多い場合、複数回に分けて精製し、必要量の Total RNA を精製して下さい。様々な組織について推奨するサンプル量は、セクション IV.B の表 1 に記載がありますのでご参照ください。

## B. 精製した RNA のアプリケーション

SV Total RNA Isolation System を用いて精製した RNA は、RT-PCR やノーザンハイブリダイゼーションを含む多くの分子生物学分野のアプリケーションに適しています。その他の応用例は、*Promega Protocols and Applications Guide*(3) および *Promega RNA Applications Guide*(4) をご覧ください。

## C. RNase のない環境作り

リボヌクレアーゼは、不活化するのが非常に困難です。精製過程中に、あるいは精製後の RNA に不用意に RNase 活性を持ち込まないよう注意してください。これは、サンプルが二度と手に入らないものであったり、貴重なものであったりした場合には特に重要です。サンプル中への偶発的な RNase の混入を防ぐために、以下の注意事項をご覧ください。

1. RNase 混入のおもな原因となるのは、研究者の手と塵粒子として空気中に浮遊しているバクテリア、またはカビです。これらに起因するコンタミネーションを防ぐために、キットとして提供される試薬を取り扱う際には無菌操作を行います。また、常に手袋を着用してください。
2. RNA を扱う際には、できるだけ使い捨ての滅菌したプラスチック製品を使用します。これらは、一般的に RNase-フリーなので、RNase を不活化するための前処理を必要としません。オートクレーブした Elution Tube はこのシステムに添付されています。
3. 使い捨てではないガラス製品や以前使用したプラスチック製品は、RNase-フリーにするために、使用前に次の処理をします。ガラス製品は 200 $^{\circ}$ C で一晩乾熱処理する。プラスチック製品は 0.1N NaOH, 1mM EDTA 溶液、続いて RNase-フリー水で入念にリンスする。
4. ご自分で溶液を調製される場合は、diethyl pyrocarbonate (DEPC) を 0.1% 添加し、一晩室温でインキュベートした後、残存する DEPC を除くために、30 分間オートクレーブにかけます。



すべての下流のアプリケーションにおいて、引き続き手袋を着用し、RNase-フリーの溶液や遠心管を用いて RNA サンプルを RNase から守ることが大切です。DEPC は、アミンと急速に反応するため、Tris バッファーを処理するために用いることはできません。



DEPC は発癌物質の疑いがありますので、ヒュームフードの中でご使用ください。

備考：このプロトコールの最後に簡易マニュアルがあります。

## IV. RNAの単離と精製方法

このシステムを使用して、組織からのRNA精製で良い結果を得るためには、新鮮な組織サンプルを用いることが大切です。古いサンプルはTotal RNAの収量を低下させる可能性があります。回収後のサンプルは、必要に応じて直ちに液体窒素中で凍結し、 $-70^{\circ}\text{C}$  で使用直前まで保存します。SV RNA Lysis Buffer 中でホモジナイズしたサンプルは、 $-20^{\circ}\text{C}$  または  $-70^{\circ}\text{C}$  で保存できます。大事なサンプルの場合、RNA精製の際にRNAが取れなかった場合に備えて、一部を  $-70^{\circ}\text{C}$  で保存しておくことをお勧めします。RNA精製過程で使用する化学物質に毒性があることやRNaseが存在することから、溶解および精製手順を通して手袋を着用することが必須となります。

### 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)

- ・小さな組織用のホモジナイザー (例えば Brinkmann、Tissuemizer™ または Omni™ Micro)
- ・RNase-フリーの 95% エタノール
- ・微量遠心機
- ・滅菌済み  $10\times$  phosphate-buffered saline (PBS) (培養細胞用)
- ・20ゲージ滅菌針の付いた皮下注射シリンジ(培養細胞用)
- ・恒温槽またはヒーティングブロック ( $70^{\circ}\text{C}$  に予め加熱)
- ・吸引マニフォールド (プロメガの Vac-Mar® Laboratory Vacuum Manifold、カタログ番号 A7231、または Vac-Mar® Jr. Laboratory Vacuum Manifold、カタログ番号 A7660) および Miniprep Vacuum Adapters (別途購入品、カタログ番号 A1331) (吸引法による RNA 精製に必要)

### A. 溶液の調製

SV Total RNA Isolation System のプロトコールを始める前に、4種類の溶液を調製して下さい。

溶液	調製方法	注意点
<b>SV RNA Lysis Buffer</b>	50回分(カタログ番号Z3100): 0.5mL の $\beta$ -Mercaptoethanol (BME) を 50ml の SV RNA Lysis Buffer に加える。 または 10回分 (カタログ番号 Z3101): 100 $\mu\text{L}$ の $\beta$ -Mercaptoethanol (BME) を 10ml の SV RNA Lysis Buffer に加える。	<b>BME</b> を添加した後、このステップを行ったボトルに印をつける。SV RNA Lysis Buffer を $4^{\circ}\text{C}$ に保存する。
<b>DNase I</b>	50回分 (カタログ番号 Z3100): Nuclease-Free Water (添付) を凍結乾燥した DNase I の入った DNase バイアルに記載されている量だけ添加する。 または 10回分 (カタログ番号 Z3101): Nuclease-Free Water (添付) を凍結乾燥した DNase I の入った DNase バイアルに記載されている量だけ添加する。	バイアルの溶液をゆっくり回しながら混ぜる。 <b>ボルテックスはしないでください。</b> 溶解した DNase は、RNase-フリー微量遠心チューブに使用量ずつ分注しておくことをお勧めします (例えば 5~10回分に)。1回の RNA 精製に、溶解した DNase I が 5 $\mu\text{l}$ 必要となります。溶解した DNase I は $-20^{\circ}\text{C}$ で保存してください。



DNase I 溶液はボルテックスしないでください。



溶解した DNase I 溶液は、3回以上凍結融解を繰り返さないでください。

溶液	調製方法	注意点
<b>SV RNA Wash Solution</b>	50 回分 (カタログ番号 Z3100): 58.8ml の濃縮した SV RNA Wash Solution が入ったボトルに、95% エタノールを 100ml 添加する。 または 10 回分 (カタログ番号 Z3101): 11.8ml の濃縮した SV RNA Wash Solution が入ったボトルに、95% エタノールを 20ml 添加する。	<b>エタノールを添加した後、このステップを行ったボトルに印を付ける。</b> この溶液はしっかり蓋をすれば 22~25℃ で安定に保存できます。
<b>SV DNase Stop Solution</b>	50 回または 10 回分 (カタログ番号 Z3100 または Z3101): 8ml の 95% ethanol を 5.3ml の濃縮した SV DNase Stop Solution に添加する。	<b>エタノールを添加した後、このステップを行ったボトルに印を付ける。</b> この溶液はしっかり蓋をすれば 22~25℃ で安定に保存できます。

セクション IV. B、C、D には、様々なサイズの組織や細胞サンプルから溶解液を調製するための手順を記載しています。セクション IV. B には 30mg 以下の組織サンプルからの、セクション IV. C には 30mg 以上の組織サンプルからの溶解とホモジナイゼーションのプロトコルを記載しています。組織溶解液の調製方法に関する詳細はセクション VIII. E に示します。接着または浮遊培養細胞の溶解については、セクション IV. D にプロトコルを示します。セクション IV. E および IV. F ではそれぞれ、スピン法または吸引法を用いた溶解液からの RNA 精製プロトコルを示します。白血球細胞、植物組織、酵母やバクテリアなどの細胞から Total RNA を単離する場合は、セクション VIII. A~D をご覧ください。

## B. 30mg 以下の少量の組織からの細胞溶解液の調製方法

このプロトコルは、少量の組織サンプル処理のためのものです。一般的に 175 $\mu$ l の SV RNA Lysis Buffer で溶解し、ホモジナイズする手順では組織量を 30mg 以下としますが、組織によっては調節できます (表 1 に組織別の推奨量を示します)。

- 175 $\mu$ l の SV RNA Lysis Buffer (BME 添加済み) を組織サンプルを入れる滅菌した微量遠心チューブに移す。RNase のコンタミを防ぐために、RNase-フリーのピペットを使用し、手袋を着用してください。
- SV RNA Lysis Buffer を含むチューブの重さを量り、記録する。
- 滅菌したメスの刃で、手早く組織を切り刻み、液体窒素で凍結した後、液体窒素下で乳鉢とすり棒ですりつぶす。液体窒素およびすり潰した組織を適当なサイズの滅菌チューブに移し、液体窒素を飛ばした後、直ちに 175 $\mu$ l の SV RNA Lysis Buffer を含むチューブに組織を移す。転倒混和によりよく混ぜる。

4. 組織および SV RNA Lysis Buffer を含むチューブの重さを測る。ここで出た値からステップ 2 で得た重さを引いて組織量を計算する。一般的に、SV RNA Lysis Buffer に対する組織重量の比率は約 30mg/175 $\mu$ l とするべきですが、組織によっては調整が必要です (組織別の組織量対 SV RNA Lysis Buffer の比率に関しては表 1 をご覧ください)。もし必要であれば、この比率となるように SV RNA Lysis Buffer を添加してください。

**備考:** 脾臓などの溶解サンプルは、核酸、細胞の破片、およびタンパク質を大量に含み、非常に粘性があります。SV RNA Lysis Buffer を添加しても粘性が高くてピペティングが難しいようであれば、ステップ 5 で SV RNA Dilution Buffer を添加する前に、さらに SV RNA Lysis Buffer を加えて希釈してください。溶解液のピペティングを容易にするために、必要最少量の SV RNA Lysis Buffer を添加してください。各 Spin Basket で処理できる溶解液の最大量は 175 $\mu$ l です。RNA レベルが低い組織の場合は、溶解液がピペティングできる範囲内でより濃縮された溶解液を使用してください。

5. 350 $\mu$ l の SV RNA Dilution Buffer (青色) を 175 $\mu$ l の溶解液に添加する。3~4 回転倒混和して混ぜる。恒温槽またはヒートブロックで 70 $^{\circ}$ C で 3 分間インキュベートする。3分間以上インキュベートすると、RNA の完全性が損なわれる可能性があります。
6. 10 分間、12,000 ~ 14,000  $\times g$  で遠心を行った後、遠心法の場合は IV. E へ、吸引法の場合は IV. F へ進む。

**表 1. 細胞溶解液を調製するための組織や細胞の推奨量**

サンプルの種類	30g のマウスから得られる器官の湿重量	175 $\mu$ l Lysis Buffer あたりの最大組織量または細胞数	1ml Lysis Buffer <sup>1</sup> あたりの最大組織量または細胞数
肝臓	940mg	30mg	171mg
腎臓	210mg	20mg	114mg
筋肉 <sup>2</sup>	—	30mg	171mg
脾臓	90mg	15mg	85mg
心臓	150mg	60mg	342mg
脳	463mg	60mg	342mg
肺	200mg	60mg	342mg
RAW264.7 cells	N/A	$1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$	$5.7 \times 10^5 \sim 2.8 \times 10^6$

Spin Column を使用して最も良い結果を得るためには、指定された Lysis Buffer 量に対して上記の組織量および細胞数を用いることをお勧めします。

<sup>1</sup> 効率的に処理できる溶解液の最大量は、Spin Basket あたり 175 $\mu$ l です。溶解液中に Spin Basket の許容量よりも多くの RNA が含まれていると、洗浄ステップで RNA をロスすることになります。器官や組織によってはすべてを処理するために 1ml 未満の Lysis Buffer を用います (例、マウスの心臓や肺)。推奨する比率を使用し、必要に応じて溶解液の粘性を調整してください (例えば、154mg のマウス心臓には 450 $\mu$ l の Lysis Buffer をホモジナイズに用います)。

<sup>2</sup> 全種類の筋肉の重量は記載しません。

N/A: 該当しない



### C. 30mg を越える組織からの細胞溶解液の調製方法

このプロトコールでは 1ml の SV RNA Lysis Buffer を使用した組織のホモジナイゼーションと溶解手順について記載します。組織の種類による推奨サンプル量については表 1 を参照してください。

1. 組織サンプルを入れるチューブに、1ml の SV RNA Lysis Buffer (BME 添加したもの) を移す。RNase の混入を防ぐため、RNase-フリーのピペットを使用し、手袋を着用してください。
2. SV RNA Lysis Buffer が入っているチューブの重さを量って記録する。
3. 組織を摘出後、SV RNA Lysis Buffer の入っているチューブに入れる。できるだけ急いで行ってください。小さなホモジナイザー (Tekmar Tissuemizer™ など) を使用し、組織片が見えなくなるまで、高速で組織をホモジナイズする (溶解液調製に関するその他の情報は VIII.E を参照)。
4. 組織と SV RNA Lysis Buffer の入ったチューブの重さを計る。ここで得た重さから、ステップ 2 で得られた重さを引いて組織の重さを求める。一般的に、SV RNA Lysis Buffer に対する組織重量比は、約 171mg/ml とするべきですが、組織によっては調整が必要です (組織別の SV RNA Lysis Buffer に対する組織重量比の推奨量を表 1 に示します)。もし必要であれば、この比率となるように SV RNA Lysis Buffer をさらに加えてください。

**備考:** 脾臓サンプルなどの溶解液は、核酸、細胞質の破片、およびタンパク質を大量に含み、溶解液の粘性が非常に高くなります。もし、SV RNA Lysis Buffer を添加した後でも、溶解液がピペットで容易に吸引できないくらい粘性が高い場合は、ステップ 5 で SV RNA Dilution Buffer を添加する前に、さらに SV RNA Lysis Buffer を加えて希釈してください。溶解液のピペッティングを容易にするために、必要最少量の SV RNA Lysis Buffer を添加してください。Spin Basket あたりの処理できる溶解液の最大量は 175 $\mu$ l です。RNA 量が少ない組織では、溶解液のピペッティングができる範囲内で、できるだけ高濃度の溶解液を使用してください。

5. 175 $\mu$ l の組織溶解液を 1.5ml 遠心チューブに移す。余った溶解液は、 $-20^{\circ}\text{C}$  または  $-70^{\circ}\text{C}$  で凍結保存する。350 $\mu$ l の SV RNA Dilution Buffer (青色) を添加する。3~4 回転倒混和して混ぜる。恒温槽または、ヒートブロックで  $70^{\circ}\text{C}$  で 3 分間インキュベートする。3 分間以上インキュベートすると、RNA の完全性が損なわれる場合があります。
6. 12,000 ~ 14,000  $\times g$  で 10 分間遠心をした後、遠心法の場合は IV. E へ、吸引法の場合は IV. F へ進む。

### D. 培養細胞の溶解方法

浮遊および接着培養細胞の溶解には、以下のプロトコールを使用します。精製には最少で  $1.5 \times 10^3$  個の細胞から、最大で  $5 \times 10^6$  個の細胞を使用してください。細胞の種類や回収時の機能および RNA 発現量などによって、使用する細胞数を調整する必要があります。

1. 接着細胞の回収は、細胞を溶解する前に付録のセクション VIII. F のプロトコールに従って行う。浮遊細胞の場合はステップ 2 に進む。
2. 滅菌した 50ml 遠心チューブに、 $1.5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$  個の細胞を 300  $\times g$  で 5 分間遠心し、回収する。細胞のペレットを 25ml の冷却した 1 $\times$  PBS で洗浄する (作成法はセクション VIII. G を参照)。300  $\times g$  で 5 分間遠心し、細胞を回収する。上清を捨てる。

**備考:** このテクニカルマニュアルの最後に簡易プロトコールがあります。

**備考：**溶解液がピペットで容易に吸引できないくらい粘性が高い場合は、ステップ5でSV RNA Dilution Bufferを添加する前に、さらにSV RNA Lysis Bufferを添加し、希釈して下さい。SV RNA Lysis Bufferは溶解液が容易にピPETTINGできる必要最小量を加えます。



少量のペレット残さの持ちこみによりRNAの精製が損なわれることはありません。残さは上清の上部に固相を形成することがあります。その場合は、ピPETTで上清を吸い上げる前に、ピPETTチップでこの層をチューブの壁面へとよけてください。上清の量はおよそ500 $\mu$ lのはずですが、溶解液中の組織量によって変わります。



ステップ4の前に、Yellow Core Bufferと0.09M MnCl<sub>2</sub>を混合しないでください。

**Yellow Core Bufferと0.09M MnCl<sub>2</sub>は、別々に保存して、各RNAサンプルにつき新たに混合してください。**

3. BMEがSV RNA Lysis Bufferに添加されていることを確認する。洗浄した細胞に175 $\mu$ lのSV RNA Lysis Bufferを添加し、細胞のペレットを攪拌し、ボルテックスおよび（または）ピPETTINGによりよく混ぜる。
4.  $1 \times 10^6$ 個の細胞までなら、175 $\mu$ lのSV RNA Lysis Bufferで容易に溶解できます。 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個の細胞では、ゲノムDNAをせん断するために20ゲージの針を通す必要があります。4~5回繰り返します。1.5mlチューブに細胞溶解液を回収する。
5. 350 $\mu$ lのSV RNA Dilution Buffer（青色）を175 $\mu$ lの細胞溶解液に添加する。3~4回転倒混和して混ぜる。恒温槽または、ヒートブロックに70 $^{\circ}$ Cで3分間置く。3分間以上インキュベートすると、RNAの完全性を損なう場合があります。
6. 12,000~14,000 $\times g$ で10分間、20~25 $^{\circ}$ Cで遠心する。遠心法の場合はセクションIV.Eへ、吸引法の場合はセクションIV.Fへ進む。

## E. 遠心法によるRNA精製

各サンプル毎に一つのSpin Column Assemblyを使用します。パッケージの紙をチューブで穏やかに押すようにして、プラスチックトレイから取り出します。各Spin Column Assemblyは、Spin BasketとCollection Tubeからなります。もし、Spin Basketのキャップが不用な場合は、ねじり取ります。このキャップはSpin Basketから外れるようにデザインされています。もしキャップをSpin Basketにつけたままにする場合は、遠心操作の際には必ず閉めなければなりません。Collection Tubeにラベルをして、Spin Column Assemblyを微量遠心チューブラックに置きます。サンプルの確認をするためにはチューブにラベルをしておくことが重要です。チューブを取り扱う際には手袋を着用してください。

1. 溶解液の上清をピPETTINGで新しい遠心チューブに移す。細胞残さのペレットに触れないように注意してください。
2. 200 $\mu$ lの95%エタノールを上清に添加し、3~4回ピPETTINGして混ぜる。混合液をSpin Column Assemblyに移す。12,000~14,000 $\times g$ で1分間遠心する。
3. Spin Column Assemblyから、Spin Basketを取り外してCollection Tube中の液体を捨てる。Spin BasketをCollection Tubeに戻す。IV.Aで述べたように、SV RNA Wash Solutionがエタノールで希釈されているか確認する。600 $\mu$ lのSV RNA Wash SolutionをSpin Column Assemblyに添加する。12,000~14,000 $\times g$ で1分間遠心する。
4. 前の要領でCollection Tubeを空にし、ラックに置く。単離操作のために滅菌したチューブに1サンプルあたり40 $\mu$ lのYellow Core Buffer、5 $\mu$ lの0.09M MnCl<sub>2</sub>および5 $\mu$ lのDNase I酵素をこの順番で混合してDNase反応ミックスを調製する。DNase反応ミックスは必要量だけ調製し、ピPETTINGは気を付けながら行ってください。**穏やかにピPETTINGして混ぜる。ボルテックスはしないでください。**DNase Iは、氷上で融かします。新しく調製したDNase反応ミックス50 $\mu$ lをSpin Basketのメンブレンに直接添加する。溶液がメンブレン全体にしっかりと行き渡っていることを確認することが重要です。この反応ミックスは見やすくするために黄色く着色されています。
5. 20~25 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートする。インキュベーション終了後、200 $\mu$ lのSV DNase Stop Solution（IV.Aで調製したもの；エタノールが添加してあるかどうかを確認する）をSpin Basketに添加し、12,000~14,000 $\times g$ で1分間遠心する。次のステップまでCollection Tubeを空にする必要はありません。
6. 600 $\mu$ lのSV RNA Wash Solution（エタノール添加したもの）を添加し、12,000~14,000 $\times g$ で1分間遠心する。

- Collection Tube を空にして、250 $\mu$ l の SV RNA Wash Solution (エタノール添加したもの)を添加する。高速で 2 分間遠心する。
- もしまだ行っていない場合は、Spin Basket からキャップをねじり取る。
- 各サンプルについて、パッケージの上から穏やかに押してプラスチックトレイから Elution Tube、1 個を外す。Spin Column Assembly 1 セットに対して、Elution Tube は 1 個しかありません。Spin Basket を Collection Tube から取り外し、Elution Tube へと移す。100 $\mu$ l の Nuclease-Free Water をメンブレンに添加する。メンブレン表面を水が完全にカバーできたかどうか確認する。遠心機に Elution Tube の蓋を外側に向けて Spin Basket Assembly を置く。12,000 ~ 14,000  $\times g$  で 1 分間遠心する。Spin Basket を外し、捨てる。精製した RNA が入っている Elution Tube に蓋をして、-70 $^{\circ}$ C で保存する。

**備考:** 溶出量を 100 $\mu$ l 以下にすることは、お奨めしません。RNA の濃縮が必要な場合は、吸引乾燥した後、少量の水に懸濁することができます。RNA の回収量を最大限にする必要がある場合は、二本目の新しい滅菌チューブに入れ替えて、100 $\mu$ l の Nuclease-Free Water を加え、12,000 ~ 14,000  $\times g$  で 1 分間遠心して溶出することをお奨めします。組織の使用量や RNA 発現量にも依存しますが、10 ~ 20% の RNA をさらに得ることができます。

## F. 吸引法による RNA 精製

Spin Column Assembly をサンプル毎に 1 個ずつプラスチックトレーの紙の部分から押して取り出します。各 Spin Column Assembly は、Spin Basket と Collection Tube からなります。**Spin Basket の蓋を軽くねじって外し、捨てます。**吸引法では、吸引マニフォールドを使用する際に蓋が邪魔になるため、外さなければなりません。**Collection Tube にラベルをした後、ステップ 10 まで取っておきます。**サンプルを識別できるようにするために正確にラベルすることが重要です。Spin Basket へのラベルは、トップバンドの側面にして下さい。Basket の横につけた印は、エタノールによる洗浄ステップで消えてしまう可能性があります。Spin Basket が、吸引法の手順中で詰まってしまった場合は、遠心法へと RNA 精製手順を変更してください (セクション IV.E)。

- Miniprep Vacuum Adapter をマニフォールドの Luer-LoK<sup>®</sup> に取り付ける。SV RNA Spin Basket をきちんと収まるまで、ゆっくり Miniprep Vacuum Adapter へ押し込む。
- 溶解液の上清をピペティングにより新しい微量遠心チューブに移す。細胞残さのペレットに触れないよう注意してください。
- 200 $\mu$ l の 95% エタノールを上清に添加し、3 ~ 4 回ピペティングして混ぜる。この混合液を Spin Column Assembly に移す。
- 少なくとも 15 inches (37.5mm) mercury の吸引を使用し、溶解液が Spin Basket を通過するようにする。IV.A で述べたように SV RNA Wash Solution がエタノールで希釈されているかどうかを確認する。900 $\mu$ l の SV RNA Wash Solution を添加し、Spin Basket を通過させる。
- 吸引を止め、真空をとくためにマニフォールドの使用していないポートを開ける。次のステップへ進む前に、全ての吸引圧が無くなったことを確認してください。カラムへの逆流を防ぐため、吸引装置のところで吸引を止めることが重要です。



溶出液の量を 100 $\mu$ l 以下にすることはお奨めしません。RNA の濃縮が必要な場合は、吸引乾燥して少量の水に懸濁することができます。

**注意:** このプロトコールでは、Miniprep Vacuum Adapters (カタログ番号 A1331) が必要となります。Miniprep Vacuum Adapter を再利用される場合は、使用前に 0.1N NaOH、1mM EDTA で十分リンスした後、Nuclease-Free Water でさらにリンスしてください。



少量の細胞残さペレットの持ちこみにより RNA の精製が損なわれることはありません。残さは上清の上部に固相を形成することがあります。その場合は、ピペットで上清を吸い上げる前に、ピペットチップでこの層をチューブの壁面へとよけてください。上清の量はおよそ 500 $\mu$ l のはずですが、溶解液中の組織量によって変わります。



ステップ6の前に、Yellow Core Buffer と 0.09M MnCl<sub>2</sub> を混合しないでください。

**Yellow Core Buffer と 0.09M MnCl<sub>2</sub> は、別々に保存して、各 RNA サンプルにつき新たに混合してください。**



溶出量を 100μl 以下にすることはお薦めしません。もし、RNA の濃縮が必要な場合は、真空乾燥の後に少量の Nuclease-Free Water で溶出して下さい。

6. 上記のように Collection Tube を空にしてラックに置く。単離操作のために滅菌したチューブに1サンプルあたり 40μl の Yellow Core Buffer、5μl の 0.09M MnCl<sub>2</sub> および 5μl の DNase I 酵素をこの順番で混合して DNase 反応ミックスを調製する。DNase 反応ミックスは必要量だけ調製し、ピペティングは気を付けながら行ってください。**穏やかにピペティングして混ぜる。ボルテックスはしないでください。** DNase I は、氷上で融かします。新しく調製した DNase 反応ミックス 50μl を Spin Basket のメンブレンに直接添加する。溶液がメンブレン全体にしっかりと行き渡っていることを確認することが重要です。この反応ミックスは見やすくするために黄色く着色されています。
7. 20～25℃ で 15 分間インキュベートする。インキュベーション後、200μl の SV DNase Stop Solution (IV.A で用意したもの。エタノールが添加されていることを確認する) を Spin Basket に添加する。使用していないポートを閉めてから吸引し、溶液を Spin Basket に通過させる。
8. 900μl の SV RNA Wash Solution (エタノール添加済み) を添加し、Spin Basket を通過させる。この洗浄を繰り返す。
9. 吸引を止め、マニフォールドを真空状態から解除するために、使用していないポートを開く。各 Spin Basket をマニフォールドから外し、予めよけておいた Collection Tube に移す。残存している Wash Solution を除くため、Spin Basket と Collection Tube を 12,000～14,000 × g で 1 分間遠心する。
10. 各サンプルについて、プラスチックトレイからパッケージを上から穏やかに押して Elution Tube 1 個を外す。Spin Column Assembly 1 セットに対して、Elution Tube は 1 個しかありません。Spin Basket を Collection Tube から取り外し、Elution Tube へと移し変える。
11. RNA を溶出するために、100μl の Nuclease-Free Water を Spin Basket に添加する。メンブレンの表面が完全に覆われているのを確認する。
12. 12,000～14,000 × g で 1 分間遠心する。Spin Basket を取り外して捨てる。精製した RNA の入った Elution Tube は蓋をして -70℃ で保存する。

**備考:** 100μl 以下の Nuclease-Free Water で溶出を行うと、RNA 収量が下がる場合があります。RNA の濃縮が必要な場合は、真空乾燥した後、少量の水に溶解することができます。RNA の回収量を最大限にする必要がある場合は、二本目の新しい滅菌チューブに替えて、100μl の Nuclease-Free Water を加え、2 回目の溶出を行うことをお奨めします。組織の使用量や RNA 発現量にも依存しますが、10～20% の RNA をさらに得ることができます。

## V. RNA 収量と精製度の決定

### 収量と精製度

SV Total RNA Isolation System は、様々な組織や細胞から、インタクトな RNA を精製するために使用できます。得られた Total RNA の収量は、260nm における吸光度により決定でき、1 absorbance unit (A<sub>260</sub>) を、40μg の一本鎖 RNA/ml と等しいものとします。精製度は、230、260、および 280nm の吸光度比 (すなわち、A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> と A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>) から推定できます。

SV Total RNA Isolation System で精製した RNA は、ほとんど DNA フリーで、タンパク質の混入がないことから、セクション III. B に記載している用途に直接使うことができます。精製した RNA は A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> = 2.0 という値を示します。

しかし、個々の材料や手法の違いにより、RNA を A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> の範囲は、1.7～2.1 となることが予測されます。もし、RNA の精製度が 1.7 以下であった場合、RNA の精製度を改善するために可能な原因と解決方法をセクション VI でご確認ください。表 2 は、各種細胞および組織を材料として、Total RNA を SV Total RNA Isolation System で精製した際の収量および A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> の値です。この手法を用いた場合、RNA は通常 A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> で 1.8～2.2 を示します。A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> の値が低い場合、グアニジンの混入が考えられ、下流のアプリケーションに影響が出ることがあります。RNA が十分量得られれば、変性アガロースゲル電気泳動によって RNA の完全性を確認してください。ホルムアルデヒド (5,6) または グリオキサール (6,7) を変性剤として使用した数種類の方法が適しています。真核生物の 28S および 18S リボソーム RNA の比率は、エチジウムブロマイド染色するとおよそ 2:1 になるはずで、この結果から RNA 全体の分解が起きていないことが分かります。RNA サンプルは、分解されると 28S リボソーム RNA が 18S と類似の RNA 種になるという特徴からこの比は逆転します。RNA の分解を避けるためには、セクション III および VI のヒントをご確認ください。

表 2. 組織および細胞からの Total RNA 精製後の平均収量

サンプル	サンプルの 最大量	平均収量 ( $\mu$ g) / 1 回	平均収量 ( $\mu$ g) / 1mg 組織	A <sub>260</sub> / A <sub>230</sub> 平均値	A <sub>260</sub> / A <sub>280</sub> 平均値
<b>マウス組織</b>					
肝臓	30mg	131	4.4	2.4	1.9
腎臓	20mg	44	2.2	2.1	1.9
脾臓	15mg	79	5.3	2.3	1.9
脳	60mg	39	0.65	2.1	2.1
筋肉	30mg	22	0.73	1.8	2.1
<b>ラット組織</b>					
脾臓	30mg	100	3.5	2.2	1.9
心臓	60mg	16	0.27	1.8	2.1
肺	60mg	36	0.60	2.0	2.1
<b>バクテリア</b>					
大腸菌	$\sim 1 \times 10^9$ cells	36	N/A	1.6	2.0
<b>酵母</b>					
S. cerevisiae	$\sim 4 \times 10^7$ cells	19	N/A	1.7	2.1
<b>植物</b>					
トマト葉	30mg	4.6	0.15	1.4	2.0
<b>株化細胞</b>					
RAW 264.7 細胞	$5 \times 10^6$ cells	51	N/A	2.0	2.1

N/A:該当しない

表 2 の値は、プロメガで得られた結果を平均値として表したものです。収量は組織の種類や細胞およびサンプルの代謝状態にも依存します。株化細胞および脾臓サンプルの値は、それぞれ 2～3 回の精製結果の平均値です。その他全てのサンプルの値は、少なくとも 6 回の精製を行って得られた平均値です。

これらの平均値は、表にある腎臓、肝臓、脾臓および株化細胞を除いたラットおよびマウス組織サンプルで、遠心法および吸引法の両方の手法を使用して計算した値です。細菌、植物、酵母サンプルは、遠心法で行った結果のみについて評価しました。

心臓と肺を除く組織の RNA 収量はマウスの組織で行っています。心臓と肺の RNA 収量は、ラット組織で得たものです。株化細胞は、10% ウシ胎児血清および 1mM ビルビン酸を添加した Dulbecco's modified Eagle's 培地で、コンフルエントになるまで培養したマウスマクロファージの株化細胞 RAW264.7 を使用しました。

## VI. 困ったときには・・・(続き)

トラブルの症状	可能性のある原因	コメント
A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> の値が低い	一般的にはタンパク質の混入	RNA 溶液中から混入したタンパク質を除去する方法はいくつかあります。最も便宜的な方は、フェノール/クロロフォルム抽出です。この有機溶媒精製法により、A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> は上がります。しかし、RNA の収量は下がることが予想されます (最大40%程度)。
A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> の値が低い	一般的にはグアニジンチオシアン酸の混入	NaCl を終濃度 0.1M となるよう添加して、RNA を沈殿させます。2.5 倍量のエタノールを添加して、-20℃ で30 分間インキュベートします。4℃ で 10,000 × g、15 分間遠心して RNA を回収します。RNA を Nuclease-Free Water に懸濁します。
A <sub>260</sub> の値が低い (RNA の収量が低い)	-20℃ または -70℃ で保存していた組織または組織溶解液サンプルを使用した	凍結保存された組織または細胞溶解液は、Total RNA 量が減っている場合があります。最大収量を得るためには、サンプル溶解液を調製したできるだけ早く RNA を精製してください。
	組織中の Total RNA 量が少ない	組織や細胞により湿重量あたりの精製できる RNA 量は異なります。Total RNA の収量が低い場合は、処理する開始サンプル量を増やしてください。
	サンプルの完全性が低い	サンプルは摘出後に直ちにホモジナイズまたは凍結しないと、RNA の収量が低く、完全性が減少することがあります。もし、すぐに精製ができない場合は、組織を液体窒素で直ちに凍結し、-70℃ で保存してください。ホモジナイズしたサンプルは、-20℃ または -7℃ で保存してください。
	Spin Basket のメンブレンの結合容量を超えている	もしサンプル溶解液中の RNA が Spin Basket の許容量を超えていたら、超えた分の RNA は洗浄ステップで除かれてしまいます。最大の回収量が必要である場合には、サンプル溶解液を分けて精製を複数回行います。得られた RNA 溶液はひとつに集めて、最終的な収量を決定します。

## VI. 困ったときには・・・(続き)

トラブルの症状	可能性のある原因	コメント
A <sub>260</sub> の値が低い (RNA の収量が低い)(続き)	希釈したホモジネートを、70℃ で熱処理しなかった (セクション IV.B、ステップ 5。セクション IV.C、ステップ 5。およびセクション IV.D、ステップ 5)	Total RNA を最大量回収するために、この混合液は 70℃ で 3 分間、熱処理しなければなりません。熱処理をしないと収量を上げることになります。
	手順通りに正しく行っていないか、間違った試薬を使っている	SV Total RNA Isolation System は、複数のステップで構成されており、正しい試薬を正しい順番で使用していただく必要があります。そうすることで、精製過程を通じて RNA がメンブレンに結合したまま保たれるようになります。Wizard® Plus SV DNA Purification System のバッファーは、このシステムには適さないので、ご使用できません。
	エタノールを SV DNase StopSolution または SV RNA Wash Solution に添加していなかった	実験を始める前に、セクション IV.A の指示に従って溶液を調製してください。
	組織をホモジナイズする間に、ライセートが温まってしまった	できるだけ素早く処理を行います。サンプル調製中にライセートを氷上に置いておくことができます。温度の上昇が原因である場合は、収量と安定性を改善するために氷冷した SV RNA Lysis Buffer をホモジナイゼーションに使用します。ホモジナイザーの先端が、ホモジナイズしている間、ライセート中にあるようにしてください。
組織溶解液が泡立ってしまう	ホモジナイザーによっては組織をホモジナイズする際に泡立ってしまうことがある	泡が消えてからピペティングを行います。ホモジナイズは目で確認できる組織片が無くなるまでとします。
サンプル間の再現性が悪い	残さを除去したライセート(上清)の一部を使っている	上清を分けると回収量にばらつきが出て再現性が悪くなります。上清を移す際に全量をピペティングすれば、最適な収量と再現性が得られます。
	希釈したホモジネートを 70℃ で熱処理しなかった (セクション IV.B、ステップ 5。セクション IV.C、ステップ 5。およびセクション IV.D、ステップ 5)	最大量の Total RNA を回収するためには、この混合液を 70℃ で 3 分間、熱処理しなければなりません。この混合液を熱処理しないと、収量が減り、再現性が低下します。

## VI. 困ったときには・・・(続き)

トラブルの症状	可能性のある原因	コメント
PCR を行うとゲノム DNA の混入が確認された	PCR 反応に使用するサンプル量が多すぎる	コントロールの PCR 反応に用いる Total RNA 量を 50～100ng に減らす。一般的にまれな mRNA からのその RNA に特異的な産物は、50ng Total RNA を使用した RT-PCR 反応で確認できます。
	サンプル中のゲノム DNA 量が多すぎる	ホモジネートを調製するときに用いる開始組織量を減らします。1 回の精製に使用する量が 30mg またはそれ以下であれば、ほとんどの組織でゲノム DNA の混入は見られません。腎臓組織に関しては 1 回の精製で 20mg、また脾臓組織に関しては 15mg をそれぞれ超えないようにします。培養細胞は、1 回のプレップが $5 \times 10^6$ cells を超えないようにします。 指示通りの組織量をこのシステムで用いていただければ、精製された RNA の RT-PCR で、ほとんどの場合ゲノム DNA の混入は確認されないでしょう。しかし、密度の高い組織や培養細胞では DNA が多く含まれているために除ききれません。もし、サンプル中への DNA の混入が問題であれば、RNA を単離した後に RQ1 RNase-FreeDNase (カタログ番号 M6101) を使用して DNase 処理し、続いてフェノール/クロロフォルム抽出を行うことをお勧めします。詳しい情報については、文献 3 をご覧いただくか、RNAgents® Total RNA Isolation System Technical Bulletin #TB087 をご請求ください。
ゲノム DNA の混入	DNase I 酵素の不活化	セクション IV.A に従い、凍結乾燥品の DNase I を懸濁して保存します。分注を行った後の DNase は、3 回以上凍結融解を繰り返さないでください。
	MnCl <sub>2</sub> または DNase I を Yellow Core Buffer に添加しなかった	各精製を行う際には使用直前に滅菌したチューブ内で 40μl Yellow Core Buffer と 5μl 0.09M MnCl <sub>2</sub> と 5μl DNase I 酵素を混ぜ、調製します。1 回の RNA 精製につき、DNase 反応液を新たに直前調製してください。ボルテックスはしないでください。



## VI. 困ったときには・・・(続き)

トラブルの症状	可能性のある原因	コメント
ゲノム DNA の混入(続き)	消化の間、DNase I 溶液が十分メンブレンに接していなかった	DNase I 溶液が完全にメンブレンを覆っているかどうか、目で確認して下さい。溶液は、容易に確認できるよう黄色く着色されています。
	DNase 処理が省かれていた、または正確に行われていない	DNase 処理は、ホスト DNA の混入の可能性を排除するために行わなければなりません。
Spin Basket が目詰まりした	ライセートの濃度が高すぎる	ホモジナイズした溶解液が容易に吸い上げられないようであれば、細胞溶解液の濃度が高すぎ、SV RNA Dilution Buffer で十分希釈できないということになります。RNA の濃度は組織の機能により組織間で異なります。ライセートの粘性が高いようであれば、SV RNA Dilution Buffer を添加する前に、SV RNA Lysis Buffer で希釈すると良いでしょう。1 回の精製には、175µl 以上のライセートを用いないでください。
	ライセートを遠心した後ペレットに触れてしまった	遠心ステップ後のライセートの上清は、慎重に吸い上げます。沈殿したタンパク質や細胞残さに触らないように気を付けてください。
容易に吸い上げられないほどライセートに粘性がある	最初のライセートの粘性が高すぎる	SV RNA Lysis Buffer で溶解液を希釈します。
	ライセートを氷上に置いている間に粘性が高くなった	短時間、再ホモジナイゼーションし、ゲノム DNA をせん断します。ライセートを再ホモジナイズすると、RNA の収量が下がることがありますので、必要なときのみ行います。
吸引法でライセートが Spin Basket を通過しない	吸引圧が不十分	吸引法で Spin Basket を使用するためには、通すことができなかった 15 inches of mercury より大きい吸引圧が必要です。吸引法を用いて Spin Basket を十分に引けなかった場合は、遠心法に切り替えて行ってください。

## VI. 困ったときには・・・(続き)

トラブルの症状	可能性のある原因	コメント
RNA の分解	操作中の RNase の混入	RNA を操作する際や保存する際には、DEPC 処理したガラス容器や溶液、および使い捨てのプラスチック容器を使用してください。全行程で、手袋を着用してください。溶出後の RNase の混入によっても RNA は分解されます。
	サンプル調製中に RNA が分解した	サンプルを精製する際には、手早く行う必要があります (A <sub>260</sub> が低い、サンプルの完全性が低い" のところのコメントをご覧ください)。

## VII. 参考文献

1. Otto, P. *et al.* (1998) Separate isolation of genomic DNA and total RNA from single samples using the SV Total RNA Isolation System. *Promega Notes* **69**, 19.
2. Chirgwin, J.M. *et al.* (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294.
3. *Protocols and Applications Guide*, Third Edition (1996) Promega Corporation.
4. *RNA Applications Guide* (1997) Promega Corporation.
5. Lehrach, H. *et al.* (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical re-examination. *Biochemistry* **16**, 4743.
6. Ausubel, F.M. *et al.*, eds., (1993) In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley and Sons, New York, NY.
7. McMaster, G.K. and Carmichael G.G. (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4835.

## VIII. 付録

### A. 白血球からの Total RNA の精製

SV Total RNA Isolation System の標準的なプロトコール (セクション IV.B) を使うと、100 $\mu$ l の全血、血漿、または血清から、Total RNA を効率的に直接精製できます。プロトコールの最初の 5 つのステップまでは、100 $\mu$ l を越える全血を使って白血球細胞から RNA を効率的に単離するために非常に重要です。ステップ 6～10 は、SV Total RNA Isolation System を使用した組織サンプルおよび培養細胞からの Total RNA を精製する際の手順と同じです。1ml あたりの血液から得られる標準的な Total RNA 量は、弊社データで 0.75～1.50 $\mu$ g でした。実際に得られる RNA 量は、サンプル中の白血球の数、または病原体の数に依存して変わります。

以下に示す例は、SV Total RNA Isolation System を使用し、遠心チューブに入った 1ml の血液を処理する手順です。この手順は、微量遠心チューブを使って、100 $\mu$ l までスケールダウンできます。

#### 準備するもの

(SV Total RNA Isolation System の溶液をセクション IV.A にしたがって調製します。溶液の組成は、セクション VIII.G に記載されています。)

- 70 $^{\circ}$ C に熱した恒温槽またはヒーティングブロック
- RNase-フリーの 95% エタノール
- 微量遠心機
- SV RNA Red Blood Cell Lysis Solution

(カタログ番号 Z3141、またはセクション VIII.G にしたがって調製)

1. 1ml の全血 (ヘパリンまたは EDTA 処理したチューブに回収したもの) を滅菌したチューブに移す。**備考:** 最大 1ml までの全血ならば、1.5～2ml の微量遠心チューブで処理できます。それよりも大きい容量であれば、15ml のコニカルチューブで卓上遠心機を使って処理します。
2. 比較的澄んだ上清 (全容積の約 30%) と血球のペレット (全容積の約 60～70%) が得られるように、3,000rpm (400  $\times$  g) で 5 分間遠心し、血液細胞を回収する。上清を上側から慎重に吸い上げて除去する。血球のペレットに触れないように注意してください。赤血球が溶解するため、血漿が赤くなります。
3. 1ml の Red Blood Cell Lysis Solution を添加し、4～5 回ピペティングしてペレットを再懸濁する。  
**備考:** 赤血球を溶解するには、最初の血液の 3 倍量の Red Blood Cell Lysis Solution で十分です。大きいチューブ (溶解液全量が入る) を使用される場合にも、1 回の懸濁に 3 倍量の Red Blood Cell Lysis Solution を添加すれば十分です。
4. 3,000rpm で 5 分間遠心する。  
**備考:** この段階では、はっきりとしたペレットは観察できないかもしれません。上側から 1ml の上清を取り、捨ててください。チューブの中の残りの上清および細胞ペレットは、そのままにしてください。
5. ステップ 3 と 4 を 2 回 (全部で 3 回) 繰り返す。  
**備考:** 白血球は全血液量の 1% 程度であるため、赤血球を溶解する過程で細胞ペレットの大きさは著しく減少します。ステップ 3～5 では、白血球細胞のペレットをロスしないように十分注意してください。

- 白血球細胞のペレットを乱さないように、チューブから 100 $\mu$ l を残し、全ての上清を除去する。BME が SV RNA Lysis Buffer に添加されていることを確認する。175 $\mu$ l の SV RNA Lysis Buffer を細胞に添加する。ピペットで懸濁し、細胞を溶解する。
- 350 $\mu$ l の SV RNA Dilution Buffer (青色) を添加する。3～4 回転倒混和する。
- 70 $^{\circ}$ C に設定した恒温槽またはヒーティングブロックで 3 分間インキュベートする。3 分以上インキュベートすると、RNA の完全性を損なう場合があります。
- 12,000～14,000  $\times g$  で 10 分間、20～25 $^{\circ}$ C で遠心する。
- ピペッティングにより上清を滅菌したチューブに移す。遠心法はセクション IV.E のステップ 2 に、吸引法はセクション IV.F のステップ 3 にそれぞれ進む。

**備考：**

- 豊富に含まれる RNA 種 (例えば  $\beta$ -アクチン) であれば、通常 1ml の血液から単離された RNA 溶液 1 $\mu$ l 程度で RT-PCR を使って検出することができます。それほど豊富にない RNA 種では、より多量 (例えば 10 $\mu$ l) の Total RNA 溶液が必要になるかもしれません。
- 血液サンプルからの RNA の収量は低いことが予想されるので、全血からの RNA の収量と純度を分光光度計により定量することはお薦めしません。

## B. 植物組織からの Total RNA 精製

(Kobs, G. (1998) Isolation of RNA from Plant, Yeast and Bacteria. Promega Notes **68**, 28 を参照)

- 植物組織は、液体窒素で凍結し、乳鉢を用いて破碎する。
- 30mg の破碎した組織に 175 $\mu$ l の RNA Lysis Buffer を添加する。
- 350 $\mu$ l の RNA Dilution Buffer を添加する。転倒混和後、微量遠心機で 10 分間、最高速度で遠心する。
- セクション IV.E のステップ 2～9 に従って実験を進める。

## C. グラム陽性 (*B. subtilis*) およびグラム陰性 (*E. coli*) 菌からの RNA の精製

(Kobs, G. (1998) Isolation of RNA from Plant, Yeast and Bacteria. Promega Notes **68**, 28 参照)

備考: 以下の手順は、遠心法でのみ試験されています。

- 適切な温度と培地でバクテリアを一晩培養する。翌日、培養液を 1:50 に希釈し、OD<sub>600</sub> が 0.6～1.0 の範囲以内になるまで培養する。2、3 時間かかります。もし、増殖が遅い場合は、希釈倍率を下げてください。
- 1ml の培養液を 1.5ml の微量遠心チューブに移す。14,000  $\times g$  で 2 分間遠心する。
- 可能な限りペレットのみを残すように、慎重に上清を除去する。
- 直前調製したリゾチームを含む 100 $\mu$ l の TE でペレットを懸濁する。グラム陽性バクテリアには終濃度 3mg/ml のリゾチームを、グラム陰性のバクテリアには終濃度 0.4mg/ml のリゾチームを使用し、タッピングにより混和する。



一晩培養したものを RNA 精製に使用しないで下さい。

5. 懸濁したペレットを室温でインキュベートする。グラム陽性のバクテリアではペレットを5～10分間インキュベート、グラム陰性のバクテリアでは3～5分間インキュベートする。
6. 75 $\mu$ l の SV RNA Lysis Buffer を添加する。
7. 350 $\mu$ l の RNA Dilution Buffer を添加し、転倒混和する。**遠心はしないでください。**
8. セクション IV.E のステップ 2～9 の手順に従って実験を進める。

#### D. 酵母からの RNA 精製

(Kobs, G. (1998) Isolation of RNA from Plant, Yeast and Bacteria. Promega Notes **68**, 28 参照)

1. 適切な温度と培地で一晚培養する。翌日、培養液を 1:50 に希釈し、OD<sub>600</sub> が 0.6～1.0 の範囲になるまで培養する。2、3 時間かかります。
2. 培養液を 14,000  $\times$  g で 2 分間遠心する。
3. ペレットを以下の溶液\*、100  $\mu$ l に懸濁する。  
1 M ソルビトール  
0.1M EDTA (pH7.4)  
使用直前に 0.1% BME および 50units の lyticase または zymolase を添加する。  
\* この試薬溶液は シグマアルドリッチジャパン株式会社 より入手できます。
4. 溶液が澄んでくるまで 15～30 分間、30 $^{\circ}$ C でインキュベートする。
5. 75 $\mu$ l の SV RNA Lysis Buffer を添加して、穏やかに混ぜる。
6. 350 $\mu$ l の RNA Dilution Buffer を添加する。転倒混和後、微量遠心機で 10 分間、最高速度で遠心する。
7. セクション IV.E のステップ 2～9 に従って実験を進める。

#### E. 溶解液調製のためのヒント

1. ホモジナイザーによっては、組織をホモジナイズする際に泡立ってしまう場合があります。ピペティングを容易にするために、泡が消えるのを待ってください。ホモジナイズは、組織断片が目で見えなくなるまでの必要最少限にしてください。
2. 溶解液に熱がかかり過ぎることがないようにしてください。Total RNA の収量が下がる原因になります。できる限り操作を手早く行ってください。溶解液は、サンプル調製の間は氷上に置いておけます。ホモジナイゼーションに氷冷した SV RNA Lysis Buffer を使用すると収量および安定性が改善されます。一般的にホモジナイゼーションをしすぎたサンプルは、焦げた匂いがして茶色に変色しています。ホモジナイゼーションの間、常にヘッドが溶解液中に浸っているようにしてください。
3. 氷上に置いた溶解液の粘性が高すぎてピペティングできない場合、溶解液を SV RNA Lysis Buffer で希釈し、短時間サンプルをもう一度ホモジナイズしてゲノム DNA をせん断します。溶解液を再ホモジナイズすると RNA の収量が下がりますので、保証があるときのみ行ってください。セクション IV.B の表 1 に、各種組織から溶解液を調製するための指針があります。もし適量が分からない場合は、 $\leq$  30mg/175 $\mu$ l の濃度で溶解液を調製し、必要であれば希釈するようにしてください。



この段階でバクテリアの RNA を遠心しないでください。ステップ 7 でこの溶解液を遠心すると、RNA をロスしてしまいます。

## 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
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 MgCl<sub>2</sub>  
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 <sup>®</sup> Stopcocks	10 個	A7261
Vac-Mar <sup>®</sup> Laboratory Vacuum Manifold	1 セット	A7231
Vac-Mar <sup>®</sup> 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 <sup>®</sup> Total RNA Isolation System	Z5110

このシステムには、6×1g の組織または 6×10<sup>8</sup> 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 <sup>®</sup> 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 <sup>®</sup> 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 <sup>®</sup> 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 <sup>®</sup> 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 <sup>®</sup> System 1000 (with Magnetic Separation Stand)	Z5420

このシステムには、2g の組織または 4×10<sup>8</sup> 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 <sup>®</sup> 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, RNAsagents, RNasin, Vac-Man and 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><b>実験を始める前に</b></p>	<p><math>\beta</math>-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><b>遠心法</b> (セクション IV.E)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>SV RNA Lysis Buffer (BME 添加) を滅菌したチューブに 175<math>\mu</math>l 添加する。バッファーを含めた重量を測定し、記録する(a)。</li> <li>溶解する組織、血液または細胞サンプルを準備する。</li> <li>組織を 175<math>\mu</math>l 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。</li> <li>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/175<math>\mu</math>l 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。 <math display="block">\text{組織重量} = \text{--- (b)} - \text{--- (a)} = \text{---}</math></li> <li>SV RNA Dilution Buffer (青色) を 350<math>\mu</math>l 添加する。3~4 回転倒混和する。70<math>^{\circ}</math>C の恒温槽に入れて、3 分間インキュベートする。</li> <li>12,000~14,000 <math>\times g</math> 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。</li> <li>95% エタノールを 200<math>\mu</math>l 添加し、3~4 回ピペティングして混ぜる。</li> <li>この混合液を Spin Basket Assembly に移し、12,000~14,000 <math>\times g</math> で 1 分間遠心する。溶出液を捨てる。</li> <li>SV RNA Wash Solution (エタノール添加) を 600<math>\mu</math>l 加え、12,000~14,000 <math>\times g</math> で 1 分間遠心する。溶出液を捨てる。</li> <li>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 <math>\times</math> サンプル数 = 総液量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Yellow Core Buffer</td> <td>40<math>\mu</math>l</td> </tr> <tr> <td>MnCl<sub>2</sub>, 0.09M</td> <td>5<math>\mu</math>l</td> </tr> <tr> <td>DNase I</td> <td>5<math>\mu</math>l</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> </li> <li>この溶液 50<math>\mu</math>l 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。</li> <li>200<math>\mu</math>l 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 <math>\times g</math> で 1 分間遠心する。</li> <li>SV RNA Wash Solution 600<math>\mu</math>l を添加し、12,000~14,000 <math>\times g</math> で 1 分間遠心する。Collection Tube を空にする。</li> <li>SV RNA Wash Solution を 250<math>\mu</math>l 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。</li> <li>Nuclease-Free Water をメンブレンに 100<math>\mu</math>l 添加する。12,000~14,000 <math>\times g</math> で 1 分間遠心し、RNA を溶出する。精製した RNA は、-20<math>^{\circ}</math>C から -70<math>^{\circ}</math>C で保存する。</li> </ol>	溶液	溶液量 $\times$ サンプル数 = 総液量	Yellow Core Buffer	40 $\mu$ l	MnCl <sub>2</sub> , 0.09M	5 $\mu$ l	DNase I	5 $\mu$ l
溶液	溶液量 $\times$ サンプル数 = 総液量								
Yellow Core Buffer	40 $\mu$ l								
MnCl <sub>2</sub> , 0.09M	5 $\mu$ l								
DNase I	5 $\mu$ l								

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

<p><b>吸引法</b> (セクション IV.F)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>SV RNA Lysis Buffer (BME 添加) を滅菌したチューブに 175<math>\mu</math>l 添加する。バッファーを含めた重量を測定し、記録する(a)。</li> <li>溶解する組織、血液または細胞サンプルを準備する。</li> <li>組織を 175<math>\mu</math>l 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。</li> <li>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/175<math>\mu</math>l 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) = __</li> <li>SV RNA Dilution Buffer (青色) を 350<math>\mu</math>l 添加する。3~4 回転倒混和して混ぜる。70<math>^{\circ}</math>C の恒温槽に入れて、3 分間インキュベートする。</li> <li>12,000 ~ 14,000 <math>\times</math> 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。</li> <li>95% エタノール、200<math>\mu</math>l 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<sup>®</sup> 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。<b>備考</b>: Collection Tube にラベルをして、ステップ 13 まで保存してください。</li> <li>SV RNA Wash Solution 900<math>\mu</math>l 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。<b>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。</b></li> <li>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" style="margin: 10px auto;"> <thead> <tr> <th>溶液</th> <th>溶液量 <math>\times</math> サンプル数 = 総液量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Yellow Core Buffer</td> <td>40<math>\mu</math>l</td> </tr> <tr> <td>MnCl<sub>2</sub>, 0.09M</td> <td>5<math>\mu</math>l</td> </tr> <tr> <td>DNase I</td> <td>5<math>\mu</math>l</td> </tr> </tbody> </table> <p>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。</p> </li> <li>この溶液 50<math>\mu</math>l 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。</li> <li>200<math>\mu</math>l 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。</li> <li>900<math>\mu</math>l 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。</li> <li>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 <math>\times</math> g で 1 分間遠心する。</li> <li>Spin Basket を Collection Tube から Elution Tube に移し変える。RNA を溶出するために、100<math>\mu</math>l の Nuclease-Free Water を Spin Basket に添加し、12,000 ~ 14,000 <math>\times</math> g で 1 分間遠心する。精製した RNA は、-20<math>^{\circ}</math>C から -70<math>^{\circ}</math>C で保存する。</li> </ol>	溶液	溶液量 $\times$ サンプル数 = 総液量	Yellow Core Buffer	40 $\mu$ l	MnCl <sub>2</sub> , 0.09M	5 $\mu$ l	DNase I	5 $\mu$ l
溶液	溶液量 $\times$ サンプル数 = 総液量								
Yellow Core Buffer	40 $\mu$ l								
MnCl <sub>2</sub> , 0.09M	5 $\mu$ l								
DNase I	5 $\mu$ l								