

【細胞用プロトコール】

キット構成品のうち 1-Thioglycerol は開封後 2~10℃、その他は 15~30℃で保管してください。
RNA 精製を行う際には、手袋やマスクを着用するなど、RNase の混入を避けるように注意してください。

試薬の調製

◎ RNA Wash Solution(RWA)、Column Wash Solution(CWE)の調製

RWA および CWE のボトルに 95%エタノールを下表のとおり、添加します。

試薬	RNA Wash Solution		Column Wash Solution	
	Z6014	Z6015	Z6014	Z6015
構成成分	35ml	206ml	5ml	24ml
95%エタノール	60ml	350ml	7.5ml	36ml

* 添加後は蓋をしっかりと締めて、15~30℃で保管してください。

◎ BL+TG Buffer の調製

BL Buffer のボトルに 1-Thioglycerol(TG)を下表のとおり、添加します。

試薬	BL Buffer	
	Z6014	Z6015
BL Buffer	32.5ml	150ml
1-Thioglycerol	325μl	1500μl

* 添加後は蓋をしっかりと締めて保管してください。2~10℃で、調製後 30 日間保管が可能です。

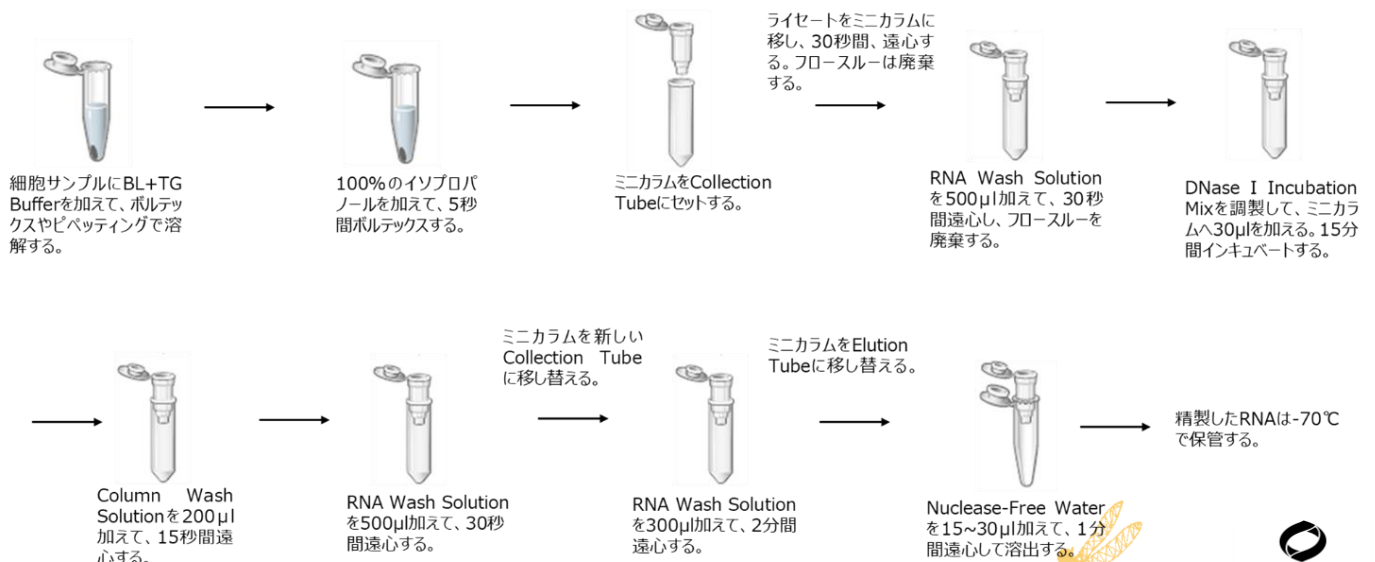
* 使用計画に応じて、使い切れる量を調製してください。

◎ DNase I の調製

DNase I(凍結乾燥) のチューブ 1 本あたり 275μl の Nuclease-Free Water(キット付属) を加えて穏やかに攪拌し溶解します。溶解する際に、ボルテックスはしないでください。

* 溶解した DNase I 溶液は、使用量に応じて分注して、-20℃で保管してください。3 回を超える凍結融解は避けてください。

プロトコールの概要



細胞の準備

＜浮遊細胞の場合＞

1. 300 x g で 5 分間遠心して、細胞を回収します。沈殿した細胞ペレットに、滅菌済みの冷却した 1xPBS を加えて洗浄します。300 x g で再度 5 分間遠心して、上清を丁寧に除きます。

2. BL Buffer に 1-Thioglycerol(TG)を添加したことを確認し、下表にしたがって BL+TG Buffer を加えます。

細胞数	BL + TG Buffer 添加量
$1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$	100 μ l
$>5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$	250 μ l
$>2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$	500 μ l

3. ゲノム DNA のせん断のため、P200 または P1000 で 7-10 回のピペッティングを行います。

注意：細胞数が 2×10^6 個よりも多い場合には、ライセートを 20G の針で 4~5 回通してください。

＜接着細胞の場合＞

1. 培地を除き、下表の通りに滅菌済みの冷却した 1xPBS を加えて洗浄します。PBS を丁寧に除きます。

プレートの種類	1xPBS 添加量
96-well	100 μ l
48-well	250 μ l
24-well	500 μ l
6-well	2000 μ l
T-25 flask	5000 μ l

2. BL Buffer に 1-Thioglycerol(TG)を添加したことを確認し、下表にしたがって BL+TG Buffer を加えます。

プレートの種類	BL + TG Buffer 添加量
96-well	100 μ l
48-well	100 μ l
24-well	100 μ l
6-well	250 μ l
T-25 flask	500 μ l

3. ゲノム DNA のせん断のため、P200 または P1000 で 7-10 回のピペッティングを行います。その後、ライセートを回収し、新しいチューブに移します。作製したライセートは、-70℃で保存することが可能です。

注意：細胞数が 2×10^6 個よりも多い場合には、ライセートを 20G の針で 4~5 回通してください。



細胞からの RNA 精製プロトコール

1. 下表にしたがって、サンプルに 100%イソプロパノールを添加し、5 秒間ボルテックスします。

細胞数	100%イソプロパノール添加量
$1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$	35 μ l
$>5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$	85 μ l
$>2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$	170 μ l

注意：凍結保存したライセートを使用する場合には、氷上または 2～10℃で融解し、十分に混和して均一化してからご使用ください。

2. ミニカラムを Collection Tube にセットし、サンプルを加えて室温(20～25℃)で遠心します(12,000～14,000 x g, 30 秒間)。

3. Collection Tube に貯まった液(フロースルー)を捨て、再度ミニカラムを Collection Tube にセットします。500 μ l の RNA Wash Solution(エタノール添加済み)をミニカラムに加えて遠心します(12,000～14,000 x g, 30 秒間)。フロースルーを廃棄します。

4. DNase I Incubation mix を調製します。ボルテックスを避けて穏やかに混合してください。下表には 1 サンプルあたりの試薬量を示しています。サンプル数に応じて試薬量を計算して、混合・調製してください。

試薬	Volume	x サンプル数	= 合計
Yellow Core Buffer	24 μ l		
MnCl ₂ , 0.09M	3 μ l		
DNase I	3 μ l		

5. 30 μ l の DNase I Incubation mix をミニカラムに添加して、室温で 15 分間インキュベートします。

6. 200 μ l の Column Wash Solution(エタノール添加済み)をミニカラムに加えて遠心します(12,000～14,000 x g, 15 秒間)。

7. 500 μ l の RNA Wash Solution(エタノール添加済み)をミニカラムに加えて遠心します(12,000～14,000 x g, 30 秒間)。

8. ミニカラムを新しい Collection Tube に移し替えて、300 μ l の RNA Wash Solution(エタノール添加済み)を加えて遠心します (12,000～14,000 x g, 2 分間)。

9. ミニカラムを Elution Tube に移し替えます。下表を参考にして、溶出用の Nuclease-Free Water をミニカラムに加えて、遠心します(12,000～14,000 x g, 1 分間)。Elution Tube は蓋同士が当たらないように蓋を外側に向けます。

組織重量	Nuclease-Free Water 添加量
$1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$	15 μ l
$>5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$	30 μ l
$>2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$	50 μ l

10. チューブのキャップを閉めて、-70℃で精製 RNA を保管します。

