

## 【組織用プロトコール】

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
構成成分ボトル	35ml	206ml	5ml	24ml
<b>95%エタノール</b>	<b>60ml</b>	<b>350ml</b>	<b>7.5ml</b>	<b>36ml</b>

\* 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。

### ◎ Lysis Buffer(LBA)+TG Buffer の調製

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

試薬	Z6014	Z6015
LBA	30ml	150ml
<b>1-Thioglycerol</b>	<b>600μl</b>	<b>3000μl</b>

\* 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。

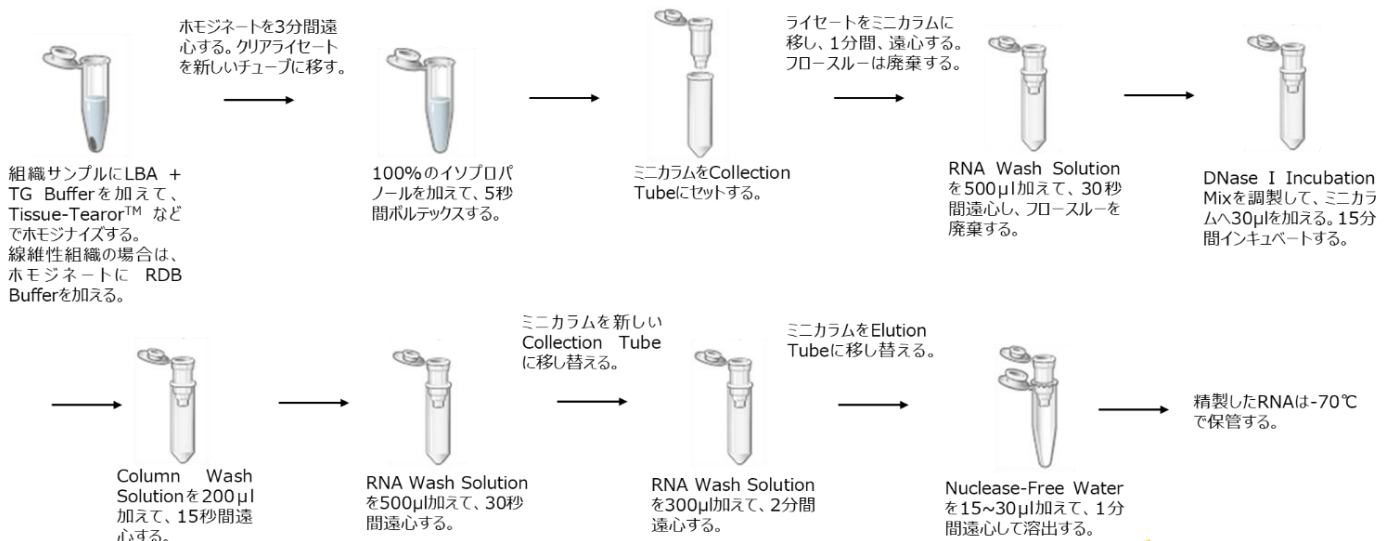
\* 使用計画に応じて、使い切れる量を調製してください。

### ◎ 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、穏やかに攪拌して溶解します。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



## 非線維性組織用プロトコール

サンプルタイプ： 肝臓、腎臓、脳、脂肪組織など

1. LBAに1-Thioglycerol(TG)を添加したことを確認し、下表の通りにLBA+TG Bufferを加えます。

組織重量	LBA + TG Buffer 添加量
0.25mg ~ 5mg	250µl
5mg ~ 20mg	500µl

注意：カラムにアプライできる最大ライセート量は500µlまでです。これより多いとRNA収量が低下します。

2. 組織サンプルをホモジナイザーで破碎したのち、ゲノム DNA のせん断のため、P200 または P1000 で7~10回のピペティングを行います。

3. 作製したホモジネートを14,000 x gで3分間遠心し、クリアライセートを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。

4. 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。

組織重量	100%イソプロパノール添加量
0.25mg ~ 5mg	85µl
5mg ~ 20mg	170µl

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。

5. 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, 1分間)。

6. 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。500µl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。

7. 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。表中には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	24µl		
MnCl <sub>2</sub> , 0.09M	3µl		
DNase I	3µl		

8. 30µl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。

9. 200µl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)。

10. 500µl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)。



# ReliaPrep™ RNA Miniprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z6014, Z6015

Quick  
PROTOCOL

11. ミニカラムを新しい Collection Tube に移し替えて、300 $\mu$ 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  $\times$  g, 2 分間)。

12. 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  $\times$  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
0.25mg ~ 5mg	15 $\mu$ l
5mg ~ 20mg	30 $\mu$ l

13. チューブのキャップを閉めて、-70℃で精製 RNA を保管します。



  
Promega

**線維性組織用プロトコール** ※このプロトコールは非線維性組織には使用しないでください。

サンプルタイプ： 心臓、骨格筋、皮膚、食道、大動脈など

1. LBAに1-Thioglycerol(TG)を添加したことを確認し、下表の通りにLBA+TG Bufferを加えます。

組織重量	LBA + TG Buffer 添加量
0.25mg ~ 5mg	250µl
5mg ~ 20mg	500µl

注意：カラムにアプライできる最大ライセート量は500µlまでです。これより多いとRNA収量が低下します。

2. 組織サンプルをホモジナイザーで破碎したのち、ゲノム DNA のせん断のため、P200 または P1000 で7~10 回のピペティングを行います。

3. LBA+TG Bufferと等量の RNA Dilution Buffer(RDB)を加え、10 秒間ボルテックスし、室温で1 分間インキュベートします。目に見える沈澱が形成されます。10,000 x g で3 分間遠心し、クリアライセートを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。

4. 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。

組織重量	100%イソプロパノール添加量
0.25mg ~ 5mg	170µl
5mg ~ 20mg	340µl

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。

5. 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, 1 分間)。

注意：LBA+TG Buffer を500µl 使用した場合、ライセートを2 回に分けて(670µl ずつ)遠心してください。

6. 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。500µl 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。

7. 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	24µl		
MnCl <sub>2</sub> , 0.09M	3µl		
DNase I	3µl		

8. 30µl 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。

9. 200µl 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)。



# ReliaPrep™ RNA Miniprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z6014, Z6015

Quick  
PROTOCOL

10. 500µl 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)。

11. ミニカラムを新しい Collection Tube に移し替えて、300µl 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)。

12. 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
0.25mg ～ 5mg	15µl
5mg ～ 20mg	30µl

13. チューブのキャップを閉めて、-70℃で精製 RNA を保管します。



  
**Promega**