

SOP 番号 GEN105-1

Ver.5

標準操作手順書

組織片からの totalRNA 抽出

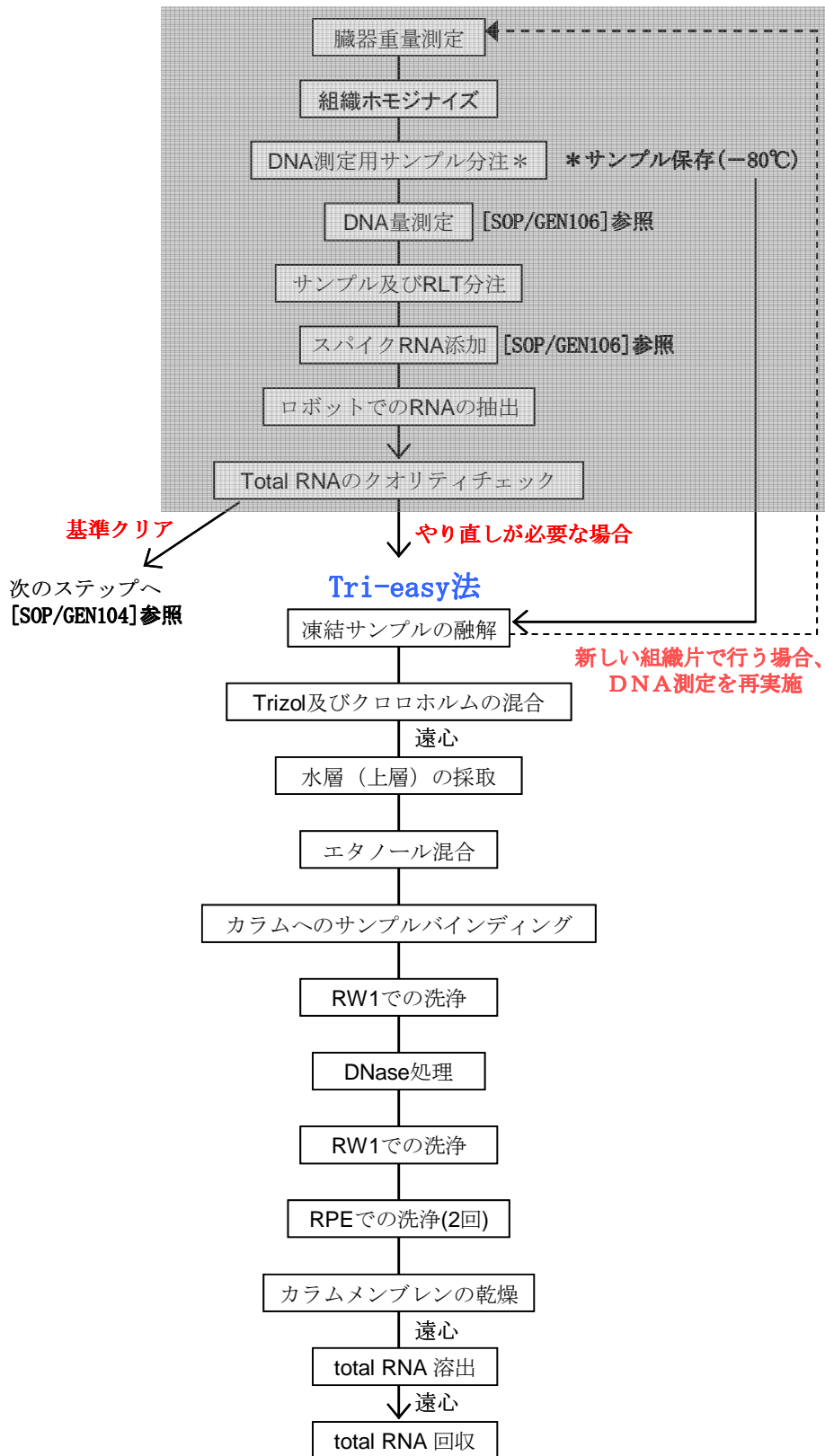
マニュアル(TRI-easy 法)

承認 _____ 年 月 日

目 次

分類	項目	ページ
GEN105 Ver.5	total RNA の抽出	
	作業手順の流れ図	1
	1.序	2
	2.試薬、器具及び機器	
	2-1.試薬	2
	2-2.器具	3
	2-3.機器	3
	3.試薬の調製	3,4
	4.スパイク量の算出	4
	5. totalRNA 抽出操作 (Tri-easy 法)	4-6

作業手順の流れ図



1 序

本 SOP では、組織からのマニュアルによる total RNA 抽出法について記載する。本方法は主に、ロボットを用いた組織からの totalRNA 抽出のバックアップ方法として使用する。なお、本方法は AGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform) 法により total RNA を粗精製後、キアゲン RNeasy カラムに通すことでコンスタントに total RNA を抽出・精製することが出来る。この為、他方法以上の total RNA の抽出効率を示す。特に糖タンパク質や脂質の多いラット肝から、total RNA を抽出する時に有効な方法である。

本方法は AGPC 法を利用した市販の total RNA 抽出用試薬である Trizol (Invitrogen) と、AGPC 法とは抽出原理の異なる total RNA 抽出キット RNeasy Mini (キアゲン) を組み合わせた方法で、本 SOP では Tri-easy 法と呼ぶこととする。

2 試薬、器具及び機器

2-1 試薬

- 1) TRIzol®LS Reagent (Invitrogen, cat.# 10296-028) 冷蔵保存
使用期限：購入日から 1 年
- 2) RNeasy®Mini Kit (QIAGEN, cat.# 74106:250 検体用)
使用期限：購入日から 1 年
Buffer RLT
Buffer RW1
Buffer RPE
RNase-free water
- 3) 2-Mercapto Ethanol (Sigma, cat.# M-6250, 冷蔵保存)
使用期限：購入日から 1 年
- 4) エタノール (和光純薬工業株, cat.# 057-00456)
使用期限：購入日から 6 ヶ月
- 5) DNase (QIAGEN, cat.# 79254)冷蔵保存
使用期限：購入日から 6 ヶ月
DNase 粉末
Buffer RDD
DNase-RNase free-水
- 6) DEPC-Treated water (Ambion, cat.# 9920 または同等品)
室温保存
使用期限：購入日から 1 年、開封後 3 ヶ月

2-2 器具

- 1) RNeasy®Mini Kit (QIAGEN, cat.# 74106:250 検体用)
使用期限：購入日から1年
RNeasy mini spin columns (ピンク)
Collection tubes (1.5 mL)
Collection tubes (2 mL)

2-3 機器

- 1) 電子天秤（島津製作所, AW220）
- 2) アスピレーター（MARKOS, MEFAR SP30）
- 3) ミキサーミル（QIAGEN, MM300）
- 4) 微量高速冷却遠心機（トミー工業株式会社, MX-300）

3 試薬の調製

- 1) Buffer RLT
1mL Buffer RLT あたり 10 μ L の 2-Mercapto Ethanol (2-ME) を添加し使用する。室温保存、調製後1ヵ月間安定。
注) 2-ME は毒性があるので手袋、マスクを着用し取り扱うこと。
- 2) Buffer RPE
ボトルに4倍量のエタノール(96~100%)を添加し使用する。55 mL 入りのボトルの場合、エタノール 220 mL を加える。室温保存。
注) グアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含んだ消毒薬と一緒にしないこと。また、刺激性があるため手袋、マスクを着用し取り扱うこと。
- 3) Buffer RW1
調製の必要はないが取り扱いに注意する。室温保存。
注) グアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含んだ消毒薬と一緒にしないこと。また、刺激性があるため手袋、マスクを着用し取り扱うこと。
- 4) 50%エタノール
100%エタノールと DEPC-Treated water を等量ずつ混合する。

5) DNase

Nase 粉末のバイアル瓶に付属の DNase-RNase free-水を 560 μL 添加して溶解し、これを DNase 原液とする(完全に溶けたかチェック：4°C保存。調製後冷蔵で 6 週間保存可能)。DNase 原液は、下記のように 1:7 の割合で混合して使用する (カラム 1 本あたり、80 μL を必要)

	1 本	25 本	49 本
DNase 原液	10 μL	250 μL	490 μL
Buffer RDD	70 μL	1750 μL	3430 μL

DNase 粉末は、水を添加した場合は完全に溶解しなくても良いが、RDD と混合しても溶解しない場合は、実験記録書にその旨を記載し使用する。

DNase の溶解及び RDD との混合は、転倒混和により実施すること。ボルテックスは禁止。

4 スパイク添加量の算出

- 1) [SOP/GEN106]に従い、スパイク計算シートに臓器重量値及び DNA 量を入力する。各サンプル組織量を 10 mg、Spike Factor を各臓器用の値、総液量を 150 μL に設定し、組織溶解液、RLT(1% 2-ME 含有)、及びスパイク添加量を算出する。なお、Spike Factor は以下に従う。

Spike Factor

肝臓 ; 0.02 (2%)

腎臓 ; 0.01 (1%)

5 total RNA 抽出操作 (Tri-easy 法)

[SOP/GEN106]に従って調整した組織溶解液を使用する。

本 SOP には、臓器片の組織溶解液 150 μL から total RNA 抽出を行う場合を記載する。

- 1) 凍結した組織を室温で融解させる。
- 2) 算出値 (4 項参照)に従ってサンプルの調製を行う。調製は、1% 2-ME 含有 RLT→スパイクカクテル→サンプルの順番で行う (以後、この混合液をサンプル調製液と呼ぶ)。サンプルは分注直前にボルテックスで攪拌すること。分注用には識別番号を記載した 2.0 mL 容チューブを使用すること (臓器片の場合、最大液量は 390 μL)。分注後、残ったサンプルは冷凍保存(-80°C)しておく。
- 3) 450 μL (サンプル調製液の 3 倍量) の TRIzol LS を加え、良く混合して室温で 5 分放置する。

- 4) 150 μ L のクロロホルム（サンプル調製液と等量）を添加し、激しく混合（30 秒間程度振る）した後、室温で 5 分放置する。
- 5) 遠心（室温、15,000 rpm、15 分）を行う。
- 6) 水層（上層）を慎重に取り（約 350 μ L 程度採取可能）、新しい 1.5 mL マイクロチューブに移す。
- 7) 水層と同量の 50%エタノールを入れピペッティングでよく混合する。
注) ラット肝の場合、エタノール終濃度が 35%付近になると total RNA がほとんど取れなくなることがあるので、入れすぎには注意すること。
- 8) 50%エタノールを添加したサンプルを、コレクションチューブにセットした RNeasy column に移す。
（以後の操作は“RNeasy Mini Kit”の Instruction に従う。）
- 9) 遠心（10,500 rpm, 15 sec, 室温）を行う。
- 10) コレクションチューブの液を捨て、column を再びセットする。
- 11) 350 μ L の RW1 buffer を column に添加する。
- 12) 遠心（10,500 rpm, 15 sec, 室温）を行う。
- 13) コレクションチューブの液を捨て、column を再びセットする。
- 14) 80 μ L の DNase 溶液を column に添加し、室温で 15 分間放置する。
- 15) 350 μ L の RW1 buffer を column に添加する（DNase 溶液は、入ったままの状態に添加する）。
- 16) 遠心（10,500 rpm、15 sec、室温）を行う。
- 17) 新しいコレクションチューブに換えて、column を再びセットする。
- 18) 500 μ L の RPE を column に添加する。
- 19) 遠心（10,500 rpm、15 sec、室温）を行う。
- 20) コレクションチューブの液を捨て、column を再びセットする。
- 21) 500 μ L の RPE を column に添加する。

- 22) 遠心 (10,500 rpm, 2 min, 室温) を行う。
- 23) 新しいコレクションチューブに換えて、column を再びセットする。
- 24) 遠心 (15,000rpm、1min、室温) を行う。
- 25) column を新しい 1.5 mL 容マイクロチューブにセットする。
- 26) column に DNase-RNase free water を 40 μ L 添加する。
- 27) 3 分間、室温放置する。
- 28) 遠心 (15,000 rpm, 1 min, 室温) を行う。
- 29) 溶出した total RNA 溶液全量を再び、column に添加する。
- 30) 3 分間、室温放置する。
- 31) 遠心 (15,000 rpm、1 min、室温) を行う。
- 32) チューブの total RNA 液を回収する。
- 33) Multiskan Spectrum による RNA 濃度の測定を行う。(GEN107 参照)
- 34) OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比、濃度のばらつき、975 nm の値、900 nm の値を確認する。
最低、500 ng/ μ L 以上の濃度が必要)
異常があった場合は、Gene Quant による再測定を行う。
- 35) 工程責任者の確認。
- 36) RNA 電気泳動を行う。(GEN108 参照)
total RNA の場合は、28 S 及び 18 S ribosomal RNA のバンドを確認する。
RNA が分解している場合は、工程責任者に連絡する。
- 37) 工程責任者の確認。

以下余白