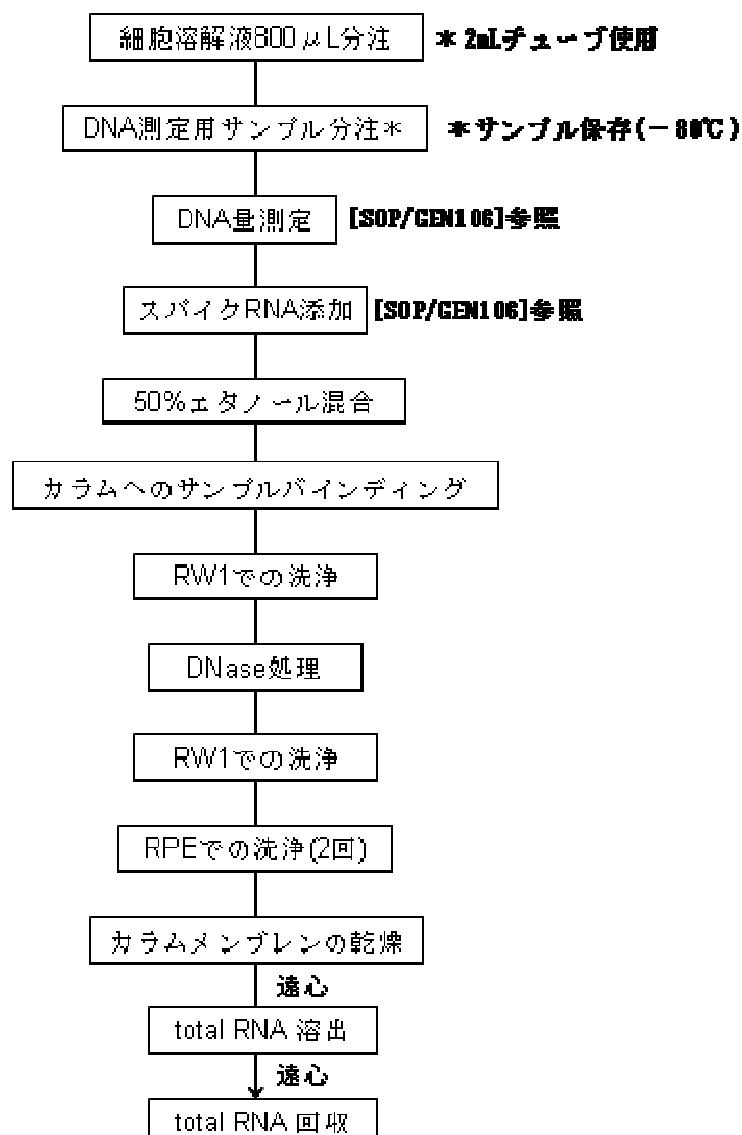


目 次

分類	項目	ページ
GEN105-2 Ver.3	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	2
	2-3.機器	3
	3.試薬の調製	3
	4.スパイク量の算出	3
	5. totalRNA 抽出操作 (マニュアル法)	4,5

作業手順の流れ図



1 序

本 SOP では、細胞溶解液からのマニュアルによる total RNA 抽出法について記載する。

2 試薬、器具及び機器

2.1 試薬

- 1) 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
- 2) 2-Mercapto Ethanol (Sigma, cat.# M-6250) 冷蔵保存
使用期限：購入日から 1 年
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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, 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 ヶ月間安定。
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
DNase 粉末のバイアル瓶に付属の DNase-RNase free-水を 560 μ L 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 μ L を必要)

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

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

[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。サンプル量を 0.8 mL、希釈率を 1、スパイク係数を 2 に設定してスパイク添加量を算出する。なお、サンプル量が 0.8 mL 以下の場合は工程責任者へ連絡する(使用サンプル量を入力)。

5 total RNA 抽出操作

- 1) 凍結した細胞を室温で融解させる。
注) 37℃で融解させる場合は、氷が残っている段階でヒートブロックから外し、後は室温で融解させる。
- 2) 本細胞溶解液 800 μL を PicoGreen 時に 2 mL チューブに分注する。
- 3) Spike と 50%エタノール 800 μL を入れピペッティングでよく混合する。
- 4) 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。細胞溶解液は 1600 μL になるので、3 回に分け、4)、5)を繰り返す。(以後の操作は“RNeasy Mini Kit”の Instruction に従う。)
- 5) 遠心 (10,500 rpm, 15 sec, 室温) を行う。
- 6) コレクションチューブの液を捨て、column を再びセットする。
- 7) 350 μL の RW1 buffer を column に添加する。
- 8) 遠心 (10,500 rpm, 15 sec, 室温) を行う。
- 9) コレクションチューブの液を捨て、column を再びセットする。
- 10) 80 μL の DNase 溶液を column に添加し、室温で 15 分間放置する。
- 11) 350 μL 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)。
- 12) 遠心 (10,500 rpm, 15 sec, 室温) を行う。
- 13) 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。
- 14) 500 μL の RPE を column に添加する。
- 15) 遠心 (10,500 rpm, 15 sec, 室温) を行う。
- 16) コレクションチューブの液を捨て、column を再びセットする。
- 17) 500 μL の RPE を column に添加する。
- 18) 遠心 (10,500 rpm, 2 min, 室温) を行う。

- 19) 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。
- 20) 遠心 (15,000 rpm, 1 min, 室温) を行う。
- 21) column を新しい 1.5 mL 容マイクロチューブにセットする。
- 22) column に DNase-RNase free water を 40 μ L 添加する。
- 23) 3 分間、室温放置する。
- 24) 遠心 (15,000 rpm, 1 min, 室温) を行う。
- 25) 溶出した total RNA 溶液全量を再び、column に添加する。
- 26) 3 分間、室温放置する。
- 27) 遠心 (15,000 rpm, 1 min, 室温) を行う。
- 28) チューブの total RNA 液を回収する。
- 29) ヒト肝細胞の場合、QIAGEN の 1.5 mL チューブを使用して濃縮作業を行う
(通常は BMBio の 1.5 mL チューブ)
- 30) Multiskan Spectrum による RNA 濃度の測定を行う。(GEN107 参照)
- 31) 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。
- 32) 工程責任者の確認。
- 33) 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。
- 34) 工程責任者の確認。

以下余白