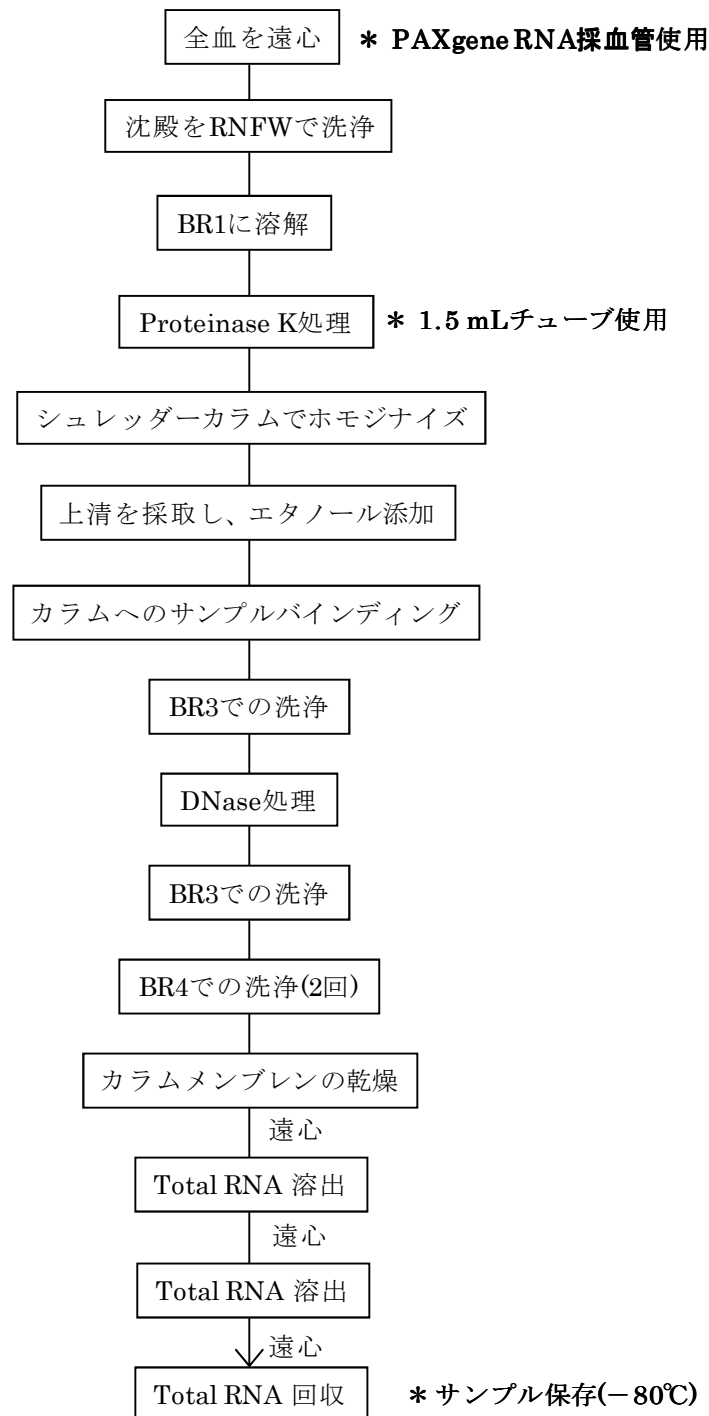


目 次

分類	項目	ページ
GEN105-3 Ver.2	全血からの Total RNA 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.全血由来 Total RNA の抽出	4-7	

作業手順の流れ図



1 序

本プロトコールでは、末梢血からのマニュアルによる全血 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) PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN, cat.# 762174:50 検体用)
 - ・ BR1 Resuspension Buffer
 - ・ BR2 Binding Buffer
 - ・ BR3 Wash Buffer 1
 - ・ BR4 Wash Buffer 2 (concentrate)
 - ・ BR5 Elution Buffer
 - ・ RNFW RNase-Free Water 2 x (bottle)
 - ・ PK Proteinase K 2 x (green lid)
 - ・ RNFD DNase I, RNase-Free 冷蔵保存
 - ・ RDD DNA Digestion Buffer (white lid) 冷蔵保存
 - ・ DRB DNase Resuspension Buffer (tube, red lid) 冷蔵保存
- 2) エタノール(和光純薬工業, cat.# 057-00456 等、特級、規格：99.5%以上)室温保存
使用期限：購入日から3年

2-2 器具

- 1) 分子診断検査用 パクスジーン RNA 採血管 (BD, cat.#76215)
 - ・ 採血量 2.5 mL、サイズ 16 x 100 mm
 - ・ プラスチック管、BD ヘモガードキャップ、添加剤量 6.9mL
パクスジーン RNA 採血管と表記
- 2) PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN, cat.# 762174:50 検体用)
 - ・ PRC PAXgene RNA Spin Columns (red)
 - ・ PT 2mL Processing Tubes (2 mL コレクションチューブ)
 - ・ Hemogard® Secondary BD Hemogard™ Closures
 - ・ MCT 1.5 mL Microcentrifuge Tubes (1.5 mL 容マイクロチューブ)
 - ・ PSC PAXgene Shredder Spin Columns (lilac)

2-3 機器

- 1) ユニバーサル遠心機 (サーモフィッシャーサイエンティフィック, SORVALL LegendRT)
- 2) アスピレーター(MARKOS, MEFAR SP30)
- 3) ヒートブロック (エッペンドルフ ; サーマミキサーコンフォート、タイテック ; DryThermoUnit DTU-N)
- 4) 微量高速冷却遠心機(トミー工業(株), MX-300)

3 試薬の調製

3-1 DNase I Incubation Mix

- 1) DNase 粉末のバイアル瓶に付属の DRB (DNase Resuspension Buffer) を 550 μL 添加して溶解し、これを DNase I (RNFD) Stock Solution とする(完全に溶けたかチェック:4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。調製後冷蔵で 6 週間保存可能。1.5 mL チューブに移し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で 6 ヶ月保存可能。冷凍保存物を融解後は 4 $^{\circ}\text{C}$ で 6 週間保存可能)。DNase I (RNFD) Stock Solution 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)
- 2) 使用直前に調製し、使用まで氷冷下で保存する。

試薬	1 サンプル	16 サンプル	31 サンプル
DNase I (RNFD) Stock Solution	10 μL	160 μL	310 μL
DNA Digestion Buffer (RDD)	70 μL	1120 μL	2170 μL
合計	80 μL	1280 μL	2480 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。

3-2 BR4 (Wash Buffer 2) 使用期限 : 調製後 1 ヶ月、室温保存

- 1) BR4 (Wash Buffer 2)のボトルに 4 倍量 (BR4 11 mL に対して 44 mL) のエタノール (96~100%、TGP では 99.5%以上のものを使用) を添加し使用する。エタノールを添加した際、ボトルキャップのチェックボックスにチェックを入れ、作成日を記載する。

4 全血由来 total RNA の抽出

4-1 total RNA 抽出操作

- 1) 凍結しているパクスジーン RNA 採血管をワイヤーラックにたて、室温で解凍する。
注) 室温にだしてから、2 時間以上は静置する必要あり。室温以上の温度で解凍しないこと。
- 2) 解凍したパクスジーン RNA 採血管を 10 回、穏やかに転倒混和する。
- 3) ユニバーサル遠心機で遠心 (5,000 rpm, 10 min, 室温) を行う。
- 4) 上清をデカントもしくはピペットにて除去し、5 mL の RNFW (RNase-free Water) を添加する。
- 5) 新しい Hemogard Closure でふたをし、沈殿をボルテックスして溶解する。
- 6) ユニバーサル遠心機で遠心 (5,000 rpm, 10 min, 室温) を行う。
- 7) アスピレーターを使用し上清は完全に除去する。
- 8) 360 μ L の BR1 (Resuspension Buffer) を添加し、沈殿をボルテックスにて溶解する。
- 9) サンプルを 1.5 mL 容マイクロチューブにピペットで移し、300 μ L の BR2 (Binding Buffer) および 40 μ L の PK (Proteinase K) を加えて、ボルテックスにてよく混合する。
(BR2 と PK はサンプルに添加する前に混ぜ合わせてはならない。)
- 10) 400 rpm でミキシングしながら 55°C で 10 min インキュベートする (エッペンドルフ製ヒートブロック使用)。
- 11) 2 mL コレクションチューブにセットした PAXgene Shredder Spin Column (PSC; 紫色) にライゼートをピペットで移す。
注) 必ずメンブレンの上に液が乗るよう滴下すること。
- 12) 遠心 (15,000 rpm, 10 min, 室温) を行う。

- 13) 沈殿を乱さないように上清を慎重に取り、新しい 1.5 mL 容マイクロチューブに移す。
(約 700 μ L 程度)
- 14) 350 μ L の 100%エタノールを添加し、ボルテックスにてよく攪拌し、スピンドウンする。
注) スピンドウンは 1,2 秒のみ、遠心が長くなると、核酸の沈殿ができ収率が落ちる。
- 15) 700 μ L のサンプルをピペットで 2 mL コレクションチューブにセットした PAXgene RNA Spin Column (PRC; 赤色) に移す。
- 16) 遠心(10,500 rpm, 1 min, 室温) を行う。
- 17) コレクションチューブの液を捨て、PAXgene RNA Spin Column を再びセットする。
- 18) 17)の残りのサンプルをピペットで PAXgene RNA Spin Column に移す。
注) 完全にサンプルを PRC に移せたか確認すること。
- 19) 遠心 (10,500 rpm, 1 min, 室温) を行う。
- 20) コレクションチューブの液を捨て、PAXgene RNA Spin Column を再びセットする
- 21) 350 μ L の BR3 (Wash Buffer 1) を PAXgene RNA Spin Column にピペットで添加する。
- 22) 遠心 (10,500 rpm, 1 min, 室温) を行う。
- 23) コレクションチューブの液を捨て、PAXgene RNA Spin Column を再びセットする
- 24) 80 μ L の DNase I Incubation Mix を直接 PAXgene RNA Spin Column のメンブレンにピペットで添加し、室温で 15 分静置する。
注) メンブレンに直接アプライできたか確認する。

- 25) PAXgene RNA Spin Column (PRC) に 350 μ L の BR3 (Wash Buffer 1) をピペットで添加する (DNase I Incubation Mix は、入ったままの状態に添加する)。
- 26) 遠心 (10,500 rpm, 1 min, 室温) を行う。
- 27) Spin Column (PRC) を新しい 2 mL コレクションチューブにセットする。
- 28) PAXgene RNA Spin Column (PRC) に 500 μ L の BR4 (Wash Buffer 2) をピペットで添加する。
注) BR4 (Wash Buffer 2) にエタノールを添加したことを確認する
- 29) 遠心(10,500 rpm, 1min, 室温) を行う。
- 30) コレクションチューブの液を捨て、PAXgene RNA Spin Column を再びセットする
- 31) PAXgene RNA Spin Column (PRC) に 500 μ L の BR4 (Wash Buffer 2) をピペットで添加する。
- 32) 遠心(10,500 rpm, 3 min, 室温) を行う。
- 33) Spin Column (PRC) を新しい 2 mL コレクションチューブにセットする。
- 34) 遠心(15,000 rpm, 1 min, 室温) を行う。
- 35) PAXgene RNA Spin Column (PRC) を新しい 1.5 mL 容マイクロチューブにセットする。
- 36) 40 μ L の BR5 (Elution Buffer) を PAXgene RNA Spin Column (PRC) のメンブレン上にピペットで直接添加する。
- 37) 遠心 (15,000 rpm, 1 min, 室温) を行い、RNA を溶出する。
- 38) 再び 40 μ L の BR5 (Elution Buffer) を PAXgene RNA Spin Column (PRC) のメンブレン上にピペットで直接添加する。

- 39) 遠心(15,000 rpm, 1 min, 室温)を行い、RNA を溶出する。
- 40) 溶出した RNA 溶液を 65°C で 5 分間インキュベートする。
- 41) すぐに氷上で冷却する。

4-2 Multiskan Spectrum による RNA 濃度の測定を行う。(GEN107 参照)

- 1) 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、750 ng/μL 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。
- 2) 工程責任者の確認。

以下余白