

SOP 番号 GEN105-5

Ver.2

標準操作手順書

細胞溶解液からの total RNA 抽出

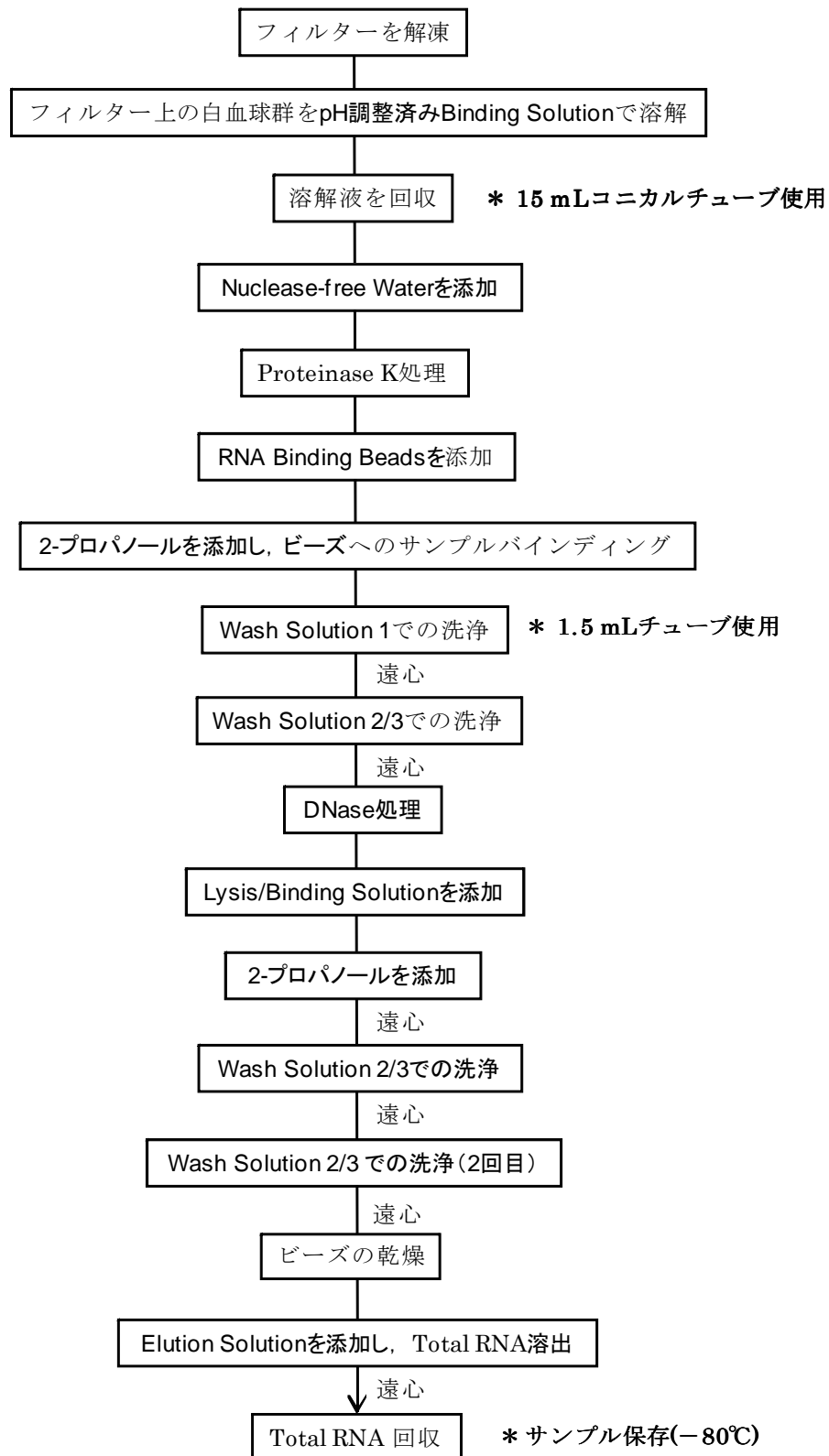
(LeukoLOCK™法)

承認 _____ 年 月 日

目 次

分類	項目	ページ
GEN105-5 Ver.2	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.細胞溶解	4	
5. totalRNA 抽出操作	4-5	
6. (オプション) TURBO DNase 処理	5	
7. 最終洗浄と溶出	6	

作業手順の流れ図



1 序

本 SOP では、LeukoLOCK™を用いて単離した白血球群からの 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) LeukoLOCK Total RNA Isolation System (Ambion, cat.# AM1923, 20 rxn)

使用期限：

Elution Solution (1 mM KCl, 0.2 mM Na-citrate, pH 7) 室温保存

LeukoLOCK™ Lysis/Binding Solution 室温保存

LeukoLOCK™ pH Adjustment Solution 室温保存

Wash Solution 1 Concentrate 室温保存

Wash Solution 2/3 Concentrate 室温保存

Nuclease-free Water -20 または 4℃または室温保存

RNA Binding Beads 4℃保存 (凍結禁止)

1X LeukoLOCK™ DNase Buffer -20℃保存

Proteinase K -20℃保存

TURBO™ DNase (20 U/μL) -20℃保存

- 2) エタノール (和光純薬工業㈱, cat.# 057-00456 または同等品) 室温保存

使用期限：購入日から 3 年

- 3) 2-プロパノール (ナカライテスク, cat.# 29113-95 等, 特級：99.5%以上または同等品) 室温保存

使用期限：購入日から 3 年

2-2 器具

- 1) LeukoLOCK Total RNA Isolation System (Ambion, cat.# AM1923, 20 rxn)

使用期限：キットの期限に従う

Processing tubes (1.5 mL)

- 2) 5 mL シリンジ (テルモ, cat.# SS-05SZ) 3 mL シリンジも可

- 3) 18 G 針 (テルモ, cat.# NN-1838S)

- 4) 15 mL コニカル・プラスチック・チューブ (Ambion, cat.# AM12500 など)

- 5) 1.5 mLチューブ用マグネティック・スタンド (Ambion, cat.# AM10055)

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) 微量高速冷却遠心機(トミー工業株, cat.# MX-300)
- 3) アスピレーター(MARKOS, MEFAR SP30)

3 試薬の調製

1) Wash Solution 1

Wash Solution 1 Concentrate へ 10 mL の 100% 2-プロパノールを添加し、混合して使用する。室温保存。

2) Wash Solution 2/3

Wash Solution 2/3 Concentrate へ 40 mL の 100%エタノールを添加し、混合して使用する。室温保存。

3) pH 調整済み Binding Solution

下表に従い、必要な Lysis/Binding Solution Concentrate と pH Adjustment Solution を新しいチューブへ分注し、短時間ボルテックスで混合する。

注) pH 調整しない Lysis/Binding Solution を 6. TURBO DNase 処理の工程で使用するので、pH Adjustment Buffer を LeukoLOCK Lysis/Binding Solution の入ったボトルへは添加してはならない。

	1 本	21 本	41 本
Lysis/Binding Solution	2.5 mL	52.5 mL	102.5 mL
pH Adjustment Solution	70 μ L	1.47 mL	2.87 mL

5) TURBO DNase マスターミックス

下記の表に従い、TURBO DNase マスターミックスを調製する (マスターミックスは室温で 15 分以内に使用する)。転倒混和により混合する。

	1 本	21 本	41 本
1X LeukoLOCK DNase Buffer	296 μ L	6.216 mL	12.136 mL
TURBO™ DNase (20 U/ μ L)	4 μ L	84 μ L	164 mL

4 細胞溶解

- 1) フィルターを～5分、室温で解凍する。
- 2) フィルターからシールを外す。
- 3) ピストンを引いた 5 mL シリンジをフィルターの注入口（広がっている側）へ装着し、その後ピストンを押してフィルターに残った RNAlater を放出口（細くなった側）から、～8-10 滴/秒の速さで放出する。
- 4) 大きなゲージの針を 5 mL シリンジに取り付け、2.5 mL の pH 調整済み Binding Solution をシリンジへ装てんする。5) のステップへ進む前に針を外す。
- 5) pH 調整済み Binding Solution の入ったシリンジをフィルターの注入口へ装着し、ピストンを押して溶液をフィルターへ滴下し、溶解液を 15 mL コニカル・チューブへ回収する。
- 6) シリンジを外し、ピストンを引き、その後再度フィルターへシリンジを装着する。ピストンを押して、同じチューブへ溶解液を放出する。
- 7) 必要であれば、6) のステップを 2 回繰り返す、泡立ったサンプルを回収する。

この時点で一時停止可能；溶解液はこの時点で-80℃保存可能。続行するには、室温で溶解液を融解し、すぐに 8) へ進む。

- 8) 2.5 mL の Nuclease-free Water を溶解液へ加え、ボルテックスや転倒混和で完全に混合する。
- 9) 25 μ L の Proteinase K を加える。
- 10) シェイカーで穏やかなスピード（～250 rpm）で、5 分間、室温で振とうする。あるいは、断続的に転倒混和して手動で混合する。

5 total RNA 抽出操作

- 1) RNA Binding Beads をボルテックスで懸濁し、50 μ L のビーズを Proteinase K 処理した溶解液へ加える。ボルテックスで短時間混合する。
- 2) 2.5 mL の 100% 2-プロパノールを加え、ボルテックスで短時間混合する。
- 3) 5 分間室温で振とうしてインキュベートし、RNA がビーズに結合する。中間のスピードで振とうするプラットフォームでインキュベートするか、または断続的に手動で混合する。
- 4) ユニバーサル遠心機で 2000 x g (IEC テーブルトップ型遠心機の場合、～3,200 rpm) で 3 分遠心し、ビーズをペレットにする。
- 5) ビーズを乱さないように注意深く上清をデカントまたは吸い取る。上清を捨てる。
注) 上清を除去する際、RNA の結合したビーズのロスを避ける。

- 6) 600 μ L の Wash Solution 1 をビーズへ加え、ボルテックスまたはピペッティングでビーズを十分に拡散させる。
注) RNA Binding Beads は完全に分散しないが、wash に影響しない。
ビーズがチューブ上方に付着し回収しづらくなるため、転倒混和はしない。
- 7) RNA Binding Beads/Wash Solution 1 混合液を 1.5 mL Processing Tube へ移す。
- 8) 15 mL チューブへ再度 600 μ L の Wash Solution 1 を加えリンスし、7) の 1.5 mL チューブへ移す。
- 9) 遠心機で 13,000 rpm (\sim 16,000 x g)、15 \sim 30 秒間遠心してスピンドウンし、チューブを 1.5 mL チューブ用マグネティック・スタンドへ \sim 3 \sim 5 分間立てる。
- 10) マグネティック・スタンドにチューブを立てたまま、ビーズを乱さないように注意深く上清をデカントまたは吸い取って捨てる。
- 11) 750 μ L の Wash Solution 2/3 を加え、15 \sim 30 秒間激しくボルテックスしてペレットを浮遊させる。
- 12) 13,000 rpm (\sim 16,000 x g)、15 \sim 30 秒間遠心してスピンドウンする。
- 13) ビーズを乱さないように注意深く上清を吸い取って捨てる。
- 14) 「TURBO DNase 処理」へ進む。

6 TURBO DNase 処理 ※RT-PCR を行う際に推奨

- 1) 室温で2分間チューブのフタを開けたままにして、残っているWash Solution 2/3のアルコールを蒸発させる。
注) サンプルからWash Solution 2/3を除去することは重要。エタノールがTURBO DNase分解の効果に影響するかもしれない。
- 2) 300 μ L の TURBO DNase マスターミックスを加える。
- 3) 短時間のボルテックスでビーズを拡散させ、その後 1,000 rpm、室温、数回穏やかにボルテックスしながら 10 分間インキュベートする。
- 4) 300 μ L の **pH 調整していない** Lysis/Binding Solution を加える。
- 5) 300 μ L の 100% 2-プロパノールを加えて混合し、低いスピード (<1,000 x g) で短時間 (\sim 2 秒間) 遠心してスピンドウンする。
- 6) 室温で 3 分間インキュベートする。
- 7) 13,000 rpm (\sim 16,000 x g)、15 \sim 30 秒間遠心してスピンドウンする。
- 8) ビーズを乱さないように注意深く上清を吸い取って捨てる。
- 9) 750 μ L の Wash Solution 2/3 を加え、15 \sim 30 秒間激しくボルテックスする。
- 10) 13,000 rpm (\sim 16,000 x g)、15 \sim 30 秒間遠心してスピンドウンする。
- 11) ビーズを乱さないように注意深く上清を吸い取って捨てる。「最終精製と溶出」へ進む。

7 最終洗浄と溶出

- 1) 750 μ L の Wash Solution 2/3 を加え、15~30 秒間激しくボルテックスする。
- 2) 13,000 rpm (~16,000 x g)、**1分間**遠心してビーズを集める。
- 3) ビーズを乱さないように注意深く上清を吸い取って捨てる。
- 4) チューブを短時間遠心し、残っている液体を除去する。
- 5) 室温で3分間チューブのフタを開けたままにして、残った液体を蒸発させる。最大限の RNA を得るためには、ビーズが光沢を持っている程度までにし、乾燥しすぎない。
- 6) 50 μ L の Elution Solution を加え、30 秒間激しくボルテックスする。
- 7) 13,000 rpm (~16,000 x g)、**2分間**遠心してビーズを完全に集める。
- 8) RNA を含む上清を新しい 1.5 mL チューブへ移す。
- 9) RNA を -20°C で保存する。

以下余白