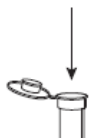


RNA の精製の際には、手袋を着用するなど、RNase の混入を避けるように注意して作業を行ってください。

プロトコール概要



細胞に BL+TG Buffer を加えて、ボルテックスやピペティングで溶解する。



100%のイソプロパノールを加えて、5 秒間ボルテックスする。



ミニカラムを Collection Tube にセットする。



ライセートをミニカラムに移し、30 秒間、遠心する。フロースルーは、捨てる。



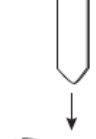
RNA Wash Solution を 500μl 加えて、30 秒間遠心し、通過した液体を捨てる。



DNase Incubation Mix を用意して、ミニカラムへ 30μl をむらなく加える。15 分間反応する。



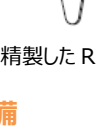
Column Wash Solution を 200μl 加えて、15 秒間遠心する。



RNA Wash Solution を 500μl 加えて、30 秒間遠心する。



ミニカラムを新しい Collection Tube に移し替えて、RNA Wash Solution を 300μl 加えて、最高速で 2 分間遠心する。



ミニカラムを Elution Tube に移し替えて、Nuclease-Free Water を 15~50μl 加えて、1 分間遠心する。

精製した RNA は、-70℃で保管する。

準備

- 使用する 4 種類の試薬、バッファの準備をします*。
BL+TG Buffer (BL に対して、1/100 量の TG を添加)
Column Wash Solution (95% エタノールを添加)
RNA Wash Solution (95% エタノールを添加)
DNaseI (粉末に Nuclease-Free Water を添加)

プロトコール 浮遊細胞の場合

- 浮遊細胞を、300 x g 5 分間遠心して、細胞を回収します。
- 沈殿した細胞を滅菌済みの冷却した 1xPBS で洗浄します。300 x g 5 分間遠心して、上清をきれいに除きます。
- 細胞数に応じて BL+TG Buffer を加えます (表を参照)

細胞数	BL + TG Buffer	100% イソプロパノール
$1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$	100μl	35μl
$5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$	250μl	85μl
$2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$	500μl	170μl

- BL+TG Buffer を加えたのち、ゲノム DNA のせん断のため、ボルテックスもしくは 7-10 回のピペティングを行います。
(注: $>2 \times 10^6$ の細胞からの精製の場合には、ライセートを 20G の針を 4-5 回通して、ゲノム DNA のせん断を行います。)
- 表にしたがって、サンプルに 100% イソプロパノールを加えて、ボルテックスします (5 秒間)
- 開封したミニカラムを Collection Tube をセットして、サンプルを加えて室温 (20-25℃) で遠心 (12,000-14,000 x g, 30 秒間) します。
- Collection Tube に貯まった液 (フロースルー) を捨てて、再度ミニカラムをセットし、500μl の RNA Wash Solution をミニカラムに加えて、遠心を行います (12,000-14,000 x g, 30 秒間)。
- DNase Incubation mix を調製します。

Solution	Volume	x サンプル数	=合計
Yellow Core Buffer	24μl		
MnCl ₂ , 0.09M	3μl		
DNase I	3μl		

ボルテックスを避けて穏やかに混合してください。表の液量は 1 サンプル分になります。サンプル数に応じて液量を計算して、混合したものを調製してください。

- DNase Incubation mix を 30μl、ミニカラムに添加して、室温で 15 分間反応させます。
- 反応後、そのまま 200μl の Column Wash Solution をミニカラムに加えて遠心します (12,000-14,000 x g, 15 秒間)。
- さらに 500μl の RNA Wash Solution を加えて遠心します (12,000-14,000 x g, 30 秒間)。
- ミニカラムを新しい Collection Tube に移し替えて、300μl の RNA Wash Solution を加えて、遠心します (12,000-14,000 x g, 2 分間)。
- ミニカラムを溶出用の Elution Tube に移し替えて、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 の蓋同士が当たらないように蓋を外側に向けます。

細胞数	Nuclease-Free Water
$1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^5$	15μl
$5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$	30μl
$2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$	50μl

- 溶出された RNA は、チューブのキャップを開けて -70℃で保管します。



ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System
INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z6010, Z6011, Z6012

プロトコール 接着細胞の場合

2. 培地を除いたのち、細胞を滅菌済みの冷却した 1xPBS を加えて洗浄します。PBS をきれいに除きます。

プレートの種類	Wash (PBS/well)	Lysis (BL+TG Buffer)
96-well	100µl	100µl
48-well	250µl	100µl
24-well	500µl	100µl
6-well	2.0ml	250µl
T-25 flask	5.0ml	500µl

3. ウェルの大きさに応じて、BL+TG Buffer を加えて、滅菌済みのチューブに移し替えます。

4. ゲノム DNA のせん断のため、ボルテックスもしくは 7-10 回のピペッティングを行います。

(注: >2x10⁶ の細胞からの精製の場合には、ライセートを 20G の針を 4-5 回通して、ゲノム DNA のせん断を行います。)

5. 加えた BL+TG Buffer の液量に応じて、100% イソプロパノールをサンプルに加え、ボルテックスします (5 秒間)

細胞数	BL + TG Buffer	100% イソプロパノール
1 x 10 ² ~ 5 x 10 ⁵	100µl	35µl
5 x 10 ⁵ ~ 2 x 10 ⁶	250µl	85µl
2 x 10 ⁶ ~ 5 x 10 ⁶	500µl	170µl

6. 開封したミニカラムを Collection Tube をセットして、サンプルを加えて室温 (20-25°C) で遠心 (12,000-14,000 x g, 30 秒間) します。

7. Collection Tube に貯まった液 (フロースルー) を捨てて、再度ミニカラムをセットし、500µl の RNA Wash Solution をカラムに加えて、遠心を行います (12,000-14,000 x g, 30 秒間)。

8. DNase Incubation mix を調製します。

9. DNase Incubation mix を 30µl、カラムに添加して、室温で 15 分間反応させます。

10. 反応後、そのまま 200µl の Column Wash Solution をミニカラムに加えて遠心します (12,000-14,000 x g, 15 秒間)。

11. さらに 500µl の RNA Wash Solution を加えて遠心します (12,000-14,000 x g, 30 秒間)。

12. ミニカラムを新しい Collection Tube に移し替えて、300µl の RNA Wash Solution を加えて、遠心します (12,000-14,000 x g, 2 分間)。

Solution	Volume	x サンプル数	=合計
Yellow Core Buffer	24µl		
MnCl ₂ , 0.09M	3µl		
DNase I	3µl		

ボルテックスを避けて穏やかに混合してください。表の液量は 1 サンプル分になります。サンプル数に応じて液量を計算して、混合したものを調製してください。

13. ミニカラムを溶出用の Elution Tube に移し替えて、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 の蓋同士が当たらないように蓋を外側に向けます。

細胞数	Nuclease-Free Water
1 x 10 ² ~ 5 x 10 ⁵	15µl
5 x 10 ⁵ ~ 2 x 10 ⁶	30µl
2 x 10 ⁶ ~ 5 x 10 ⁶	50µl

14. 溶出された RNA は、チューブのキャップを閉めて -70°C で保管します。

◎ RNA Wash Solution, Column Wash Solution の調製

カタログ番号	RNA wash Solution + 95% エタノール	Column Wash Solution + 95% エタノール
Z6012	350ml	36ml
Z6011	60ml	7.5ml
Z6010	20ml	1.5ml

*キットのサイズに応じて添加量が異なります
添加後は、ふたをしっかり閉めて、15-30°C で保管してください。

◎ BL+TG Buffer の調製

BL Buffer に対して 1/100 量の 1-Thioglycerol (TG) を加えてください。調製した BL+TG Buffer は、2-10°C で 30 日間利用できます。

◎ DNaseI の調製

凍結乾燥した DNaseI に Nuclease-Free Water を加えて溶解します。溶解する際には、穏やかに攪拌し、ボルテックスはしないでください。溶解した DNaseI 溶液は、使用量に応じて分注して、-20°C で保存します。

