

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。

プロトコル概要



組織サンプルに LBA + TG Buffer を加えて、Tissue-Tearor™ などでホモジナイズする



ホモジネートを 14,000 x g で 3 分間遠心する。上清を新しいチューブに移す。



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、1 分間、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 15~30µl 加えて、1 分間遠心する。

精製した RNA は、-70℃で保管する。

非線維性組織用プロトコル

サンプルタイプ： 肝臓、腎臓など、非線維性組織
脳、脂肪組織など、脂質を多く含む組織

1. 使用する 4 種類の試薬、バッファの準備をします。

◎RNA Wash Solution, Column Wash Solution の調製

カタログ番号	RNA wash Solution	Column Wash Solution
	+ 95% エタノール	+ 95% エタノール
Z6112	350ml	36ml
Z6111	60ml	7.5ml
Z6110	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℃で保管してください。

◎LBA+TG Buffer の調製

LBA Buffer に対して 1/50 量の 1-Thioglycerol (TG)を加えてください。
調製した LBA+TG Buffer は、2-10℃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
(Z6111, Z6112 は 275µl/チューブ、Z6110 は 80µl/チューブ)。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℃で保存します。

2. LBA バッファに 1-Thioglycerol (TG)を添加したことを確認して下さい。
組織重量に応じて LBA+TG Buffer を加えます (表を参照)

組織重量	LBA + TG Buffer	100% イソプロパノール
≤ 5 mg	250µl	85µl
5 mg ~ 20 mg	500µl	170µl

3. 最大 20 mg までの組織サンプルをホモジナイザーで破碎したのち、ゲノム DNA のせん断のため、P200 または P1000 で 7-10 回のピペティングを行います。

(注：カラムにアプライできる最大ライセート量は 500µl までです。これより多いと RNA 収量が落ちます。)

4. ホモジネートを 14,000 x g で 3 分間遠心し、クリアライセートを新しいチューブに移します。

5. 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)

6. 開封したミニカラムを Collection Tube にセットして、サンプルを加えて室温 (20-25℃) で遠心(12,000-14,000 x g, 1 分間)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 (+エタノール)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)。

8. 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。



ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z6110, Z6111, Z6112

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

10. 反応後、そのまま 200µl の Column Wash Solution (+エタノール) 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 (+エタノール)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 (+エタノール)を加えて遠心します (12,000-14,000 x g, 2 分間)。

13. 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。

組織重量	Nuclease-Free Water
≤ 5 mg	15µl
5 mg ~ 20 mg	30µl

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

Q&A

Q. キットの他に必要な試薬、機器はありますか？

A. 通常の分子生物学実験に使う機器と、100%イソプロパノール、95%エタノールが必要です。

Q. 調製した試薬は、保存可能ですか？

A. LBA Buffer に TG(1-Thioglycerol)を添加した、LBA+TG Buffer は、2-10℃で 30 日間使用可能です。使用量に応じて、調製してください。エタノールを足したバッファー (RNA Wash Solution, Column Wash Solution) は、蓋をきちんと閉めて室温(15-30℃)で保存してください。

Q. ホモジネートを保存できますか？/精製途中でいったんストップできますか？

A. ステップ 3 の後、LBA + TG Buffer 中のホモジネートは-20℃~-70℃で 3 ヶ月まで保存できます。ただし、保存中に RNA 分解が起こる恐れがあります。分解の程度はサンプルの種類や破碎・保存方法によって大きく異なります。

Q. 精製した RNA の RIN などの情報はありますか？

A. サンプル量、またサンプルの種類によっても異なりますが、RNase 含有量が少ないサンプルの場合 8-10 の値の高純度の RNA が精製可能です。RNase を多く含むサンプルでは値は大きくばらつきますが、プロメガでは臓器組織から RIN 5.5 以上で精製できております。

Q. RNA 濃度を高く溶出する方法はありますか？

A. 10µl まで溶出量を減らせます。ただし標準溶出量の 15µl に比べると回収率が低下します。10µl×2 回で溶出すると回収率は回復します。

Q. 細胞からの RNA 精製も可能ですか？

A. プロメガでは確認していませんが、おそらく可能と考えられます。非線維性組織プロトコール、または細胞用キットのプロトコールで精製してください。LBA Buffer は BL Buffer と同様に使用できます。



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。

プロトコル概要

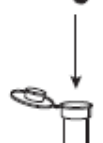


組織サンプルに LBA + TG Buffer を加えて、Tissue-Tearor™ などでホモジナイズする

ホモジネートに RDB を加えて、10 秒間ボルテックスする。室温で 1 分間インキュベートする。



ホモジネートを 14,000 x g で 3 分間遠心する。上清を新しいチューブに移す。



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。



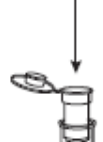
ライセートをミニカラムに移し、1 分間、遠心する。フロースルーは、捨てる。



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。



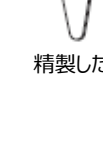
Column Wash Solution を 200µl 加えて、15 秒間遠心する。



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 15~30µl 加えて、1 分間遠心する。

精製した RNA は、-70℃で保管する。

線維性組織用プロトコル

サンプルタイプ： 心臓、骨格筋、皮膚、食道、大動脈など

注）このプロトコルは線維性組織専用です。非線維性組織には使用せず、必ず非線維性組織用プロトコルをお使いください。

1. 使用する 4 種類の試薬、バッファの準備をします。

◎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
Z6112	350ml	36ml
Z6111	60ml	7.5ml
Z6110	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℃で保管してください。

◎LBA+TG Buffer の調製

LBA Buffer に対して 1/50 量の 1-Thioglycerol (TG)を加えてください。調製した LBA+TG Buffer は、2-10℃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 (Z6111, Z6112 は 275µl/チューブ、Z6110 は 80µl/チューブ)。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℃で保存します。

2. LBA バッファに 1-Thioglycerol (TG)を添加したことを確認して下さい。組織重量に応じて LBA+TG Buffer を加えます (表を参照)

組織重量	LBA + TG Buffer	RDB	Total Volume	100% イ ソプロパノール
≤ 5 mg	250µl	250µl	500µl	170µl
5~20mg	500µl	500µl	1,000µl	340µl

3. 最大 20 mg までの組織サンプルをホモジナイザーで破碎したのち、ゲノム DNA のせん断のため、P200 または P1000 で 7-10 回のピペティングを行います。

4. 等量の RNA Dilution Buffer (RDB)を加え、10 秒間ボルテックスしたのち、室温で 1 分間インキュベートします。目に見える沈澱が形成されます。10,000 x g で 3 分間遠心し、上清を新しいチューブに移します。

5. 表のとおり 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)

6. 開封したミニカラムを Collection Tube にセットして、サンプルを加えて室温 (20-25℃) で遠心(12,000-14,000 x g, 1 分間)します。
(注：LBA+TG Buffer を 500µl 使用した場合、ライセートを 670µl ずつに分けて 2 回遠心してください。)

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 (+エタノール)をカラムに加えて、遠心を行います(12,000-14,000 x g, 30 秒間)。



ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System
INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS Z6110, Z6111, Z6112

8. 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		

ポ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。

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 (+エタノール) 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 (+エタノール)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 (+エタノール)を加えて、遠心します(12,000-14,000 x g, 2 分間)。

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。

組織重量	Nuclease-Free Water
≤ 5 mg	15µl
5 mg ~ 20 mg	30µl

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

Q&A

Q. キットの他に必要な試薬、機器はありますか？

A. 通常の分子生物学実験に使う機器と、100%イソプロパノール、95%エタノールが必要です。

Q. 調製した試薬は、保存可能ですか？

A. LBA Buffer に TG(1-Thioglycerol)を添加した、LBA+TG Buffer は、2-10℃で 30 日間使用可能です。使用量に応じて、調製してください。エタノールを足したバッファー (RNA Wash Solution, Column Wash Solution) は、蓋をきちんと閉めて室温(15-30℃)で保存してください。

Q. 非線維性組織用と線維性組織用プロトコルの違いは何ですか？

A. 線維性組織用プロトコルでは RNA Dilution Buffer (RDB)を添加、1 分間インキュベートするステップが追加されています。ボリュームが増えるので、この後のイソプロパノール添加、遠心するステップを 2 回に分ける場合があります。その他は同じです。

Q. 線維性組織からの精製に Proteinase K を使用しますか？

A. Proteinase K は使用しません。代わりに RNA Dilution Buffer (RDB)でコラーゲンなどのタンパク質を沈澱・除去します。

Q. 線維性組織からの精製に Proteinase K を併用すると収量は増加しますか？

A. RDB を使用するプロトコルで最適化されているため、収量は増加しません。むしろ RNA が分解する恐れがあります。

Q. ホモジネートを保存できますか？/精製途中でいったんストップできますか？

A. ステップ 3 の後、LBA + TG Buffer 中のホモジネートは-20℃~-70℃で 3 ヶ月まで保存できます。ただし、保存中に RNA 分解が起こる恐れがあります。分解の程度はサンプルの種類や破碎・保存方法によって大きく異なります。

Q. 精製した RNA の RIN などの情報はありますか？

A. サンプル量、またサンプルの種類によっても異なりますが、RNase 含有量が少ないサンプルの場合 8-10 の値の高純度の RNA が精製可能です。RNase を多く含むサンプルでは値は大きくばらつきませんが、プロメガでは脾臓組織から RIN 5.5 以上で精製できております。

Q. RNA 濃度を高く溶出する方法はありますか？

A. 10µl まで溶出量を減らせます。ただし標準溶出量の 15µl に比べると回収率が低下します。10µl×2 回で溶出すると回収率は回復します。

