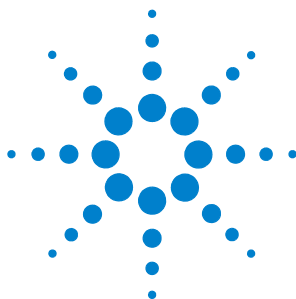


Agilent Total RNA Isolation miniキット



プロトコール

製品番号 5185-6000

新プロトコール: 繊維組織、
バクテリア、酵母菌のRNAの精製

Fourth Edition
April 2005

キットおよびすべての試薬は、
室温で保存してください

研究用

注意

© Agilent Technologies, Inc. 2005

米国および万国著作権法で定められた通り、このマニュアルの全部または一部をいかなる形態でも（電子データや検索用データ、および他国語への翻訳含む）、Agilent Technologies, Inc. による事前の承認および書面による承諾なしに複製することはできません。

カタログ番号

5188-2737

エディション

Fourth edition, April 2005

Printed in USA

Agilent Technologies, Inc.

2850 Centerville Road,

Wilmington, DE 19808-1610 USA

商標について

RNAlater™はAmbion, Inc. の商標です。

テクニカルサポート

テクニカルサポートは、国内の Agilent Support Services センターでお受けいただけます。以下の URL から電話番号が記載された Agilent のホームページに行くことができます。

www.agilent.com/chem/dnasupport

あるいは以下へ電子メールにてお問い合わせいただけます。

lscs-ibs-support@agilent.com

お客さまへのお願い

この製品は研究用の目的でのみ販売されています。Agilent Technologies, Inc. による書面の承諾がない限り、Agilent 製品を再販、変更、あるいは商用製品作成のために使用することはできません。

保証

このマニュアルに含まれる内容は「現時点」での状況を前提としており、以後の改訂版では事前の連絡なしに変更される可能性があります。また、適用される法律が許容する最大限まで、Agilent はこのマニュアルおよびここに含まれる明示/暗示されたすべての情報について、一切の保証はいたしません。保証しない対象には、含意された保証、市場性、および特定目的への適合性が含まれますが、これらに限られるものではありません。

Agilent は、このマニュアルおよび含まれる情報の、保持、使用、および性能に関して起こる、エラーや、偶然または結果として起こる損害の責任を負いません。このマニュアルの内容について Agilent とユーザーが別に書面での契約を交わし、その契約がここに記載された条件と矛盾する場合、前者が後者に優先されるものとします。

安全性データ/分析証明書

MSDS (material safety data sheet) または分析証明書は、以下の Agilent Web サイト、

<http://www.agilent.com/chem/msds>

または最寄りの地域の Agilent 代理店から入手できます。

注意

注意のマークは取り扱い上危険性があることを示します。このマークは、正しく実行しなければ製品への損害や、大切なデータの損失につながる恐れのある操作手順、操作法、および類似の行為に付けられています。**注意**の部分ではかならず一旦操作をやめ、記載された条件がすべて理解され満たされたことを確認できるまでは次に進まないでください。

警告

警告のマークは取り扱い上危険性があることを示します。このマークは、正しく実行しなければケガや死亡事故につながる恐れのある操作手順、操作法、および類似の行為に付けられています。**警告**の部分ではかならず一旦操作をやめ、記載された条件がすべて理解され満たされたことを確認できるまでは次に進まないでください。

目次

1 はじめに

この製品について	5
Table 1. 全細胞RNAの標準的収量	6
キットの内容	7
Table 2. キットの内容	7
その他必要なアイテム	7
Table 3. その他必要なアイテム	7
試薬類の保存	8
注文について	8
関連製品	8

2 調製

試薬	9
70% エタノール溶液	9
Wash solution	9
Lysis solution	9
RNase-free の実施	10

3 RNA精製プロトコール

Agilent Total RNA Isolation プロトコール (動物組織用)	12
Agilent Total RNA Isolation プロトコール (培養細胞用)	14
Agilent Total RNA Isolation プロトコール (繊維組織用)	16
Agilent Total RNA Isolation プロトコール (バクテリア用)	18
Agilent Total RNA Isolation プロトコール (酵母菌用)	20

4 トータルRNAサンプルの 定性分析および定量

UV 吸光	23
-------	----

Agilent 2100 バイオアナライザ 23

リファレンス 24

5 **トラブルシューティング**

Table 4. よくある問題と、考えられる解決策 25



1 はじめに

この製品について

Agilent Total RNA Isolation mini キットでは、フェノールを使わずに、スピナカラムを用いて、高純度で分解していない全細胞 RNA を高濃度で得ることができます。このキットは、哺乳類の組織および培養細胞のトータル RNA 精製に使用できます。全細胞 RNA のリカバリーはシリカやグラスファイバーを用いた一般的な方法と同程度かそれ以上です。表 1 に典型的な結果を示します。

短時間で結果を出せるこの方法の大きな利点は、精製した全細胞 RNA からゲノム DNA (gDNA) のコンタミネーションが取り除かれることです。独自の mini prefiltration カラムを用いて、プロトコールの初期段階でほとんどすべての gDNA が除去されます。一般的にこの方法では、標準的なシリカまたはグラスファイバーを用いた方法に比べると、gDNA の量は 1/100 から 1/1000 まで減ります。この方法で精製したトータル RNA を用いれば、マイクロアレイ遺伝子発現分析を含む精製後の RNA を用いた多くのアプリケーションにおいて、面倒な DNase 処理のステップを省くことができます。また濃縮した RNA サンプルが必要なアプリケーションでは、mini isolation カラムの溶出量を少なくできる (最小 10 μ L 水まで) という利点もあります。高収量のトータル RNA を、精製後の酵素的、化学的、あるいは物理的な操作のさまたげとなるバッファーや溶媒を加えることなく回収可能です。

この方法で調製できる高純度で分解していない RNA は、cDNA 合成、ラベル化、RT-PCR、定量 RT-PCR、マイクロアレイによる遺伝子発現実験、ノーザンブロットリング、RNase プロテクションアッセイ等のアプリケーションに最適です。

表 1 全細胞RNAの標準的収量*

サンプル	RNA収量
組織	μg/mg組織
脳	0.8
心臓	2
腎臓	2.7
肝臓	4.5
すい臓	15
骨格筋	1
脾臓	4.7
胸腺	3.2
培養細胞	μg/10⁶細胞
293HEK	10
HeLa	15
NIH3T3	15
バクテリア	μg/10⁸細胞
大腸菌	9.2
バチラス・サブテリス	7.2
酵母菌	μg/10⁷細胞
サッカロマイセス・セレビジア	17.5

* 10 mM Tris/1 mM EDTA、pH 8で260 nmの吸光度を測定して算出されています (A₂₆₀の読み1あたり40 μg/mL RNA)。通常、変動は相対標準偏差で15%となります。リカバリーは、15 mgのマウス組織 (10 mgのすい臓、10 mgのラット心臓と骨格筋) のRNA精製に対する代表値です。RNA収量が著しく低いときは実験系に問題がある場合があります。

キットの内容

キットは、表2に示したアイテムで構成されています。

表 2 キットの内容

量	内容
50 mL	Lysis solution
12 mL	Wash solution
25 mL	Nuclease-free 水
50 本	2 mL コレクションチューブと対になった mini isolation カラム (青)
50 本	2 mL コレクションチューブと対になった mini prefiltration カラム (無着色)
50 本	1.5mL RNase-free final コレクションチューブ

その他必要なアイテム

プロトコールを実行するには、表3に挙げたアイテムも必要です。

表 3 その他必要なアイテム

必要なアイテム
1 X PBS、滅菌 (培養細胞用)
100% エタノール
14.3 M β-メルカプトエタノール (neat) (β-ME)
マイクロ遠心分離器
Nuclease-free 水
組織ホモジナイザー (標準的なローターステーターホモジナイザー)
リゾチーム (バクテリア用)
プロテイナーゼK (繊維組織用)
Lyticase/Zymolase (酵母菌用)
D-ソルビトール (酵母菌用)
0.5 M EDTA, pH 7.5 (酵母菌用)

試薬類の保存

すべての試薬は、室温で保存します。

注文について

部品番号5185-6000「Agilent Total RNA Isolation miniキット」をご注文ください。

関連製品

- Agilent Mini-Prefiltration カラムおよびコレクションチューブ (50)、部品番号5188-2736
- Agilent Total RNA Isolation microキット (50)、部品番号5188-2760
- Agilent Total RNA Isolation microキット PLUS (50)、部品番号5188-2761
- Agilent cRNA Cleanup モジュール、部品番号5188-2770



2 調製

試薬

いずれのプロトコールでも、開始前に以下の試薬を調製します。

70% エタノール溶液

35 mLのACS分子生物学または同等グレードの100% エタノールと15 mLのRNase-free水を合わせて50 mLの70% エタノール溶液を調製します。よく攪拌します。

Wash solution

48 mLのACS分子生物学または同等グレードの100% エタノールを **Wash Solution** とラベルのあるボトルに加え、Wash solutionを調製します。よく攪拌します。

Lysis solution

500 μ Lの β -メルカプトエタノール (β -ME) を lysis solution の入ったボトルに加えて調製します。これより少ない量を調製するには、1 mLの lysis solutionあたり10 μ Lの β -MEを加えます。

β -MEを加えた lysis solutionは4°Cで保存します。

警告

lysis solutionには、グアニジンイソチオシアネートが含まれており、吸い込んだり、飲み込んだり、あるいは皮膚を通して吸収されると人体に有害です。グアニジンイソチオシアネートは、皮膚、目、および呼吸器系に炎症を起こします。漂白剤や酸と混ぜないでください。lysis solutionを扱う際は、手袋を着用し、薬品の取扱い、および廃棄については、各実験室の規則に従ってください。この溶液の使用可能期間は4°Cで1ヶ月です。

RNase-freeの実施

RNaseは非常に安定度の高い酵素で、失活させることは困難です。RNAを扱う実験を成功させるには、この酵素との接触を避けることがもっとも重要です。以下の一般的な方法に従って、RNAサンプルがRNaseに汚染されるのを防いでください。

- RNA精製をおこなう間、およびプロトコールに用いる実験設備やその他用具や薬品を取り扱う際は、常に清潔な実験用手袋を着用します。
- 実験室のベンチ、ピペット、ホモジナイザー、およびその他器具をRNase汚染防止用の溶液でふき、Nuclease-free水でよく洗っておきます。
- フィルター付きピペットチップ、およびマイクロ遠心分離器用試験管は、RNase-freeのものを使用します。
- 可能であれば、滅菌されたプラスチック製の使い捨て実験器具を使用してください。ガラス製の器具を使用する場合は、180℃で一晩滅菌した上でお使いください。
- ゲル電気泳動槽はすべて洗浄および滅菌し（たとえば、3%過酸化水素水で処理するなど）、その後RNase-free水で洗い流してください。



3

RNA精製プロトコール

この章では、Total RNA Isolation miniキットのために用意されたプロトコールについて説明します。

- 「Agilent Total RNA Isolationプロトコール（動物組織用）」（P. 12）
- 「Agilent Total RNA Isolationプロトコール（培養細胞用）」（P. 14）
- 「Agilent Total RNA Isolationプロトコール（繊維組織用）」（P. 16）
- 「Agilent Total RNA Isolationプロトコール（バクテリア用）」（P. 18）
- 「Agilent Total RNA Isolationプロトコール（酵母菌用）」（P. 20）

Agilent Total RNA Isolation プロトコール (動物組織用)

このプロトコールは、動物組織を用いた小規模のRNA精製用にデザインされ、2.5-30 mgの組織サンプルを前提として最適化されています。マウスのさまざまな組織、および不死化細胞系から得られる標準的なRNA収量を表1に示します。

注

キット内のカラム

キットには、2種類の色分けされたカラムが入っています。mini prefiltrationカラム（無着色）およびmini isolationカラム（青）です。プロトコールに従って、正しい種類のカラムを使用してください。

注

すべてのステップは、室温で実施してください。

警告

液体窒素を使用する際は、人身事故を防止するため、適切な身体保護防具を着用してください。

- 1 組織サンプルを採取し、すぐに処理するか、液体窒素で急速冷凍します。急速冷凍した組織を -70°C で保存します。

あるいは、製造メーカーの指示に従いRNAlater™ (Cat # 7020, Ambion, Austin, TX) 中に保存します。

- 2 サンプルの重さを測定し(RNAlater™ に保存されたサンプルは溶解させます)、組織を調製済みのlysis solution (β -MEが加えられたもの)の入った容器に入れます。均一化する組織1mgあたり20 μL のlysis solutionを使用します。容器は、ホモジナイザーのプロープを入れるのに十分な大きさでなければなりません。完全に均一化するには、ホモジナイザーのプロープが容器の底に届く必要があります。5 mg以下のサンプルは、最小量(100 μL)のlysis solutionでホモジナイズします。

- 3 ステンレス製のプロープを備えた、標準的なローターステーターホモジナイザーを用い、**すぐに**、そして徹底的に15,000 rpm (Omni International TH homogenizer (OMNI International, Warrenton, VA)の場合50%のスピードに相当)で30秒間ホモジナイズします。気泡の形成を避けるため、プロープは上下ではなく、左右に動かしてください。容量が大きい(10 mLを超える)場合は、均一化の時間をやや長くとってください。

ホモジネートをすぐに処理しない場合には、 -70°C で保存してください。凍結したホモジネートを処理する際は、 37°C で15-20分解凍し、よくボルテックスします。

- 4 最大600 μL のホモジネート (30 mgの組織に相当) を mini prefiltration カラム (無着色) 中で**3分間**、フルスピード (一般的なマイクロ遠心分離器ではおよそ16,000 \times g) で**遠心分離**します。このステップにより組織が完全に均一化され、細胞由来の混合物が取り除かれます。mini prefiltration カラムは再利用**できません**。600 μL を超える量を処理する場合、新しいmini prefiltration カラムを使用してください。

注

カラムにアプライする際の指針

大量サンプルの場合、gDNA汚染のレベルをできるだけ抑えるため、各 mini prefiltration カラムで15 mg相当の組織を処理することをお勧めします。ろ過後のホモジネートを集めて、isolationカラムで処理することができます。mini prefiltration カラムおよび mini isolation カラムの最大容量は脾臓で15 mg、すい臓で10 mgです。

- 5 浄化されたホモジネートに対し、**70% エタノールを加えます**。最初に mini prefiltration カラムに加えたホモジネートの量と同じ量を用いてください。溶液が均一になるまで**混ぜます**。この混合物を室温で5分間インキュベートします。
- 6 エタノールと溶解液の混合物 (600 μL まで) を mini isolation カラム (青) に**入れ**、フルスピードで**30秒間遠心分離**します。通過液を捨て、RNAを捕捉したカラムをコレクションチューブにセットします。粘性のサンプルの場合、遠心分離時間を**1分**に延長すると、確実にすべての通過液が得られます。エタノールと溶解液の混合物の容積が600 μL を超えた場合、残りの溶液を続けて何度かに分けて mini isolation カラムに入れて、上の操作と同様に遠心分離して通過液を捨てます。
- 7 Wash Solution (エタノールが加えられたもの) 500 μL を mini isolation カラムに**入れ**、**30秒間**フルスピードで**遠心分離**します。通過液を捨て、mini isolation カラムを同じコレクションチューブにセットします。**ステップ7**を再度**繰り返し**、計2回 Wash Solution にて洗浄します。
- 8 mini isolation カラムをフルスピードで**2分間遠心**し、痕跡量の Wash Solution を完全に除去します。
- 9 mini isolation カラムを新しい1.5 mLのRNase-free finalコレクションチューブに**移し替えます**。10-50 μL のNuclease-free水を膜表面付近から膜の中心に加えます (膜には触れないでください)。**1分間おいた後**、フルスピードで**1分間遠心分離**します。

注

精製後のRNAを用いたアプリケーションで、より高濃度のRNAサンプルが必要な場合には、溶出量を10 μL とすることができます。ただし、最終的なRNA濃度が3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ を超える場合、RNAのリカバリ量が低下する可能性があります。溶出量を選択する際、予想収量を考慮に入れてください。予想収量が分からない場合、10 μL のNuclease-free水を使って溶出し、 $A_{260\text{ nm}}$ によって濃度を求めます。濃度が3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ を超える場合、残留RNAが膜に残っている可能性があります。mini isolation カラムにさらに10 μL のNuclease-free水を加え、16,000 \times gで1分間遠心分離して、2回目の溶出の濃度を求めます。2回目の溶出にかなりのRNAが存在する場合、最初の溶出と一緒にします。

Agilent Total RNA Isolation プロトコール (培養細胞用)

プロトコールは、培養細胞を用いた小規模のRNA精製用にデザインされ、カラムあたり $1 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ 個の細胞を含むサンプルを前提として最適化されています。マウスのさまざまな組織、および不死化細胞系から得られる標準的なRNA収量を表1に示します。

細胞数が 5×10^6 個を超える場合、複数の mini prefiltration カラムおよび mini isolation カラムを使用してください。

注

キット内のカラム

キットには、2種類の色分けされたカラムが入っています。mini prefiltration カラム（無着色）および mini isolation カラム（青）です。プロトコールに従って、正しい種類のカラムを使用してください。

注

すべてのステップは、室温で実施してください。

注

Lysis Solution の量

細胞は 100 μ L 以上の lysis solution に溶解し、 1×10^7 /mL を越えないようにしてください。mini prefiltration カラムと mini isolation カラムの容量は 600 μ L です。

1 細胞を集めます。

浮遊細胞の場合: 低速で ($300 \times g$ 以下で 5 分間) 細胞を遠心分離し、容器から上澄みを取り除きます。

付着細胞の場合: 培地を吸引して PBS で洗い、洗淨します。調製済みの Lysis Solution (β -ME が加えられたもの) を適量 (注を参照) 用いて剥がすか、あるいは力強くピペティングを繰り返して培養器内でそのまま細胞溶解させます。付着細胞は、溶解前にトリプシン処理してペレット化することも可能です。

Lysis Solution で溶解しない細胞ペレットは、 -70°C にて凍結するか、あるいは製造メーカーの指示に従い、RNAlater™ 中に保存できます。

2 ライセートを調製します。

浮遊細胞および培養器内で溶解しなかった付着細胞の場合:適量の lysis solution (注を参照) を加え、**1 分間ボルテックス**します。

RNAlater™にて保存された細胞の場合:細胞は、製造メーカーの指示に従い回収してください。適量の lysis solution (注を参照) を加え、**1 分間ボルテックス**します。

ライセートをすぐに処理しない場合には、 -70°C で保存してください。凍結したライセートを処理する際は、 37°C で 15-20 分解凍し、よくボルテックスします。

- 最大 600 μL の細胞ホモジネートを mini prefiltration カラム (**無着色**) 中で **3 分間**、フルスピード (一般的なマイクロ遠心分離器ではおよそ $16,000 \times g$) で **遠心分離**します。このステップにより細胞が完全に均一化され、細胞由来の混合物が取り除かれます。mini prefiltration カラムは再利用 **できません**。600 μL を超える量を処理する場合、新しい mini prefiltration カラムを使用してください。
- 浄化されたホモジネートに対し、**同量の 70% エタノールを加えます**。mini prefiltration カラムに加えたホモジネートの量と同じ量を用いてください。溶液が均一になるまで **混ぜます**。この混合物を室温で 5 分間インキュベートします。
- エタノールと溶解液の混合物** (600 μL まで) を mini isolation カラム (**青**) に入れ、フルスピードで **30 秒間遠心分離**します。通過液を捨て、RNA を捕捉したカラムをコレクションチューブにセットします。エタノールと溶解液の混合物の容積が 600 μL を超えた場合、残りの溶液を続けて何度かに分けて mini isolation カラムに入れて、上の操作と同様に遠心分離して通過液を捨てます。
- Wash Solution (エタノールが加えられたもの) 500 μL を mini isolation カラムに**入れ、30 秒間**フルスピードで**遠心分離**します。通過液を捨て、mini isolation カラムを同じコレクションチューブにセットします。**ステップ6**を再度**繰り返し**、計2回 Wash Solution にて洗浄します。
- mini isolation カラムをフルスピードで **2 分間遠心**し、痕跡量の Wash Solution を除去します。
- mini isolation カラムを新しい 1.5 mL の RNase-free final コレクションチューブに**移し替えます**。10-50 μL の Nuclease-free 水を膜表面付近から膜の中心に**加えます** (膜には触れないでください)。**1 分間**おいた後、フルスピードで **1 分間遠心分離**します。

注

精製後のRNAを用いたアプリケーションで、より高濃度のRNAサンプルが必要な場合には、溶出量を10 μ Lとすることができます。ただし、最終的なRNA濃度が3 μ g/ μ Lを超える場合、RNAのリカバリ量が低下する可能性があります。溶出量を選択する際、予想収量を考慮に入れてください。予想収量が分からない場合、10 μ LのNuclease-free水を使って溶出し、 $A_{260\text{ nm}}$ によって濃度を求めます。濃度が3 μ g/ μ Lを超える場合、残留RNAが膜に残っている可能性があります。mini isolationカラムにさらに10 μ LのNuclease-free水を加え、16,000 \times gで1分間遠心分離して、2回目の溶出の濃度を求めます。2回目の溶出にかなりのRNAが存在する場合、最初の溶出と一緒にします。

Agilent Total RNA Isolation プロトコール (繊維組織用)

このプロトコールは、心臓や骨格筋などの繊維動物組織を用いた小規模のRNA精製用にデザインされ、10 mgの組織サンプルを前提として最適化されています。標準的な収量を表1に示します。

注

キット内のカラム

キットには、2種類の色分けされたカラムが入っています。mini prefiltrationカラム（無着色）およびmini isolationカラム（青）です。プロトコールに従って、正しい種類のカラムを使用してください。

注

特別の指示がない限り、すべてのステップは室温で実施してください。

注

繊維組織のRNA精製を実行するには、次のアイテムも必要です。

100% エタノール
プロテインナーゼK、20 mg/mL

開始前に、ウォーターバスまたはヒートブロックを55 $^{\circ}$ Cにセットします。

- 1 組織サンプルを**採取**し、すぐに処理するか、液体窒素で急速冷凍します。急速冷凍した組織を-70 $^{\circ}$ Cで保存します。あるいは、製造メーカーの指示に従いRNAlaterTM (Cat # 7020, Ambion, Austin, TX) 中に保存します。
- 2 サンプルの**重さを測定**し (RNAlaterTMに保存されたサンプルは溶解させます)、組織を調製済みのlysis solution (β -MEが加えられたもの)の入った容器に入れます。均一化する組織1 mgあたり20 μ Lのlysis solutionを使用します。容器はホモジナイザーのプロープを入れるのに十分な大きさでなければなりません。完全に均一化する

るには、ホモジナイザーのプロープが容器の底に届く必要があります。5 mg以下のサンプルは、最少量 (100 μ L) の lysis solution でホモジナイズします。

- ステンレス製のプロープを備えた、標準的なロータースターターホモジナイザーを用い、**すぐに**、そして徹底的に15,000 rpmで**1分間**ホモジナイズします。これは、Omni International TH homogenizer (OMNI International, Warrenton, VA) の場合、50%のスピードに相当します。気泡の形成を避けるため、プロープは上下ではなく左右に動かしてください。容量が大きい (10 mLを超える) 場合は、均一化の時間をやや長くとってください。

ホモジネートをすぐに処理しない場合には、 -70°C で**保存してください**。凍結したホモジネートを処理する際は、 37°C で**15-20分**解凍し、よくボルテックスします。

- 最大200 μ Lのホモジネートをmini prefiltration カラム (無着色) 中で**3分間**、フルスピード (一般的なマイクロ遠心分離器ではおよそ16,000 \times g) で**遠心分離**します。このステップにより組織が完全に均一化され、細胞由来の混合物が取り除かれます。mini prefiltration カラムは再利用**できません**。200 μ Lを超える量を処理する場合、新しいmini prefiltration カラムを使用してください。
- カラムを**捨て**、390 μ LのNuclease-free水を濾液に**加えます**。よく**攪拌**し、10 μ Lの20 mg/mLプロテインアーゼKを**加えます**。**攪拌**し、 55°C で**15分間インキュベート**します。
- 600 μ Lの100%エタノールを**加えて**、よく**攪拌**し、室温で**5分間インキュベート**します。
- エタノールと溶解液の混合物 (600 μ Lまで) をmini isolation カラム (青) に**入れ**、フルスピードで**30秒間遠心分離**します。通過液を**捨て**、RNAを捕捉したカラムを2 mLコレクションチューブに**セット**します。残ったエタノールと溶解液の混合物をmini isolation カラムに**入れて**、上の操作と同様に**遠心分離**して通過液を**捨てます**。粘性のサンプルの場合、遠心分離時間を1分に延長すると、確実にすべての通過液が得られます。
- 調製済みのWash Solution (エタノールが加えられたもの) 500 μ Lをmini isolation カラムに**入れ**、**30秒間**フルスピードで**遠心分離**します。通過液を**捨て**、mini isolation カラムを同じコレクションチューブに**セット**します。ステップ8を再度**繰り返し**、計2回Wash Solutionにて洗浄します。
- mini isolationカラムをフルスピードで**2分間遠心**し、痕跡量のWash Solutionを完全に除去します。
- mini isolationカラムを新しい1.5 mLのRNase-free finalコレクションチューブに移し**替えます**。10-50 μ LのNuclease-free水を膜表面付近から膜の中心に**加えます** (膜には触れないでください)。**1分間インキュベート**した後、フルスピードで**1分間遠心分離**します。

注

精製後のRNAを用いたアプリケーションで、より高濃度のRNAサンプルが必要な場合には、溶出量を10 μ Lとすることができます。ただし、最終的なRNA濃度が3 μ g/ μ Lを超える場合、RNAのリカバリ量が低下する可能性があります。溶出量を選択する際、予想収量を考慮に入れてください。予想収量が分からない場合、10 μ LのNuclease-free水を使って溶出し、 $A_{260\text{ nm}}$ によって濃度を求めます。濃度が3 μ g/ μ Lを超える場合、残留RNAが膜に残っている可能性があります。mini isolationカラムにさらに10 μ LのNuclease-free水を加え、16,000 \times gで1分間遠心分離して、2回目の溶出の濃度を求めます。2回目の溶出にかなりのRNAが存在する場合、最初の溶出と一緒にします。

Agilent Total RNA Isolation プロトコール (バクテリア用)

このプロトコールは、バクテリアを用いた小規模のRNA精製用にデザインされ、 5×10^8 個の細胞を使って開発されました。バクテリアの標準的収量を表1に示します。バクテリアの菌株が異なる場合、RNAの中身を考慮して細胞の数を最適化することができます。mini isolationカラムの容量は、約100 μ g トータルRNAです。

注

キット内のカラム

キットには、2種類の色分けされたカラムが入っています。mini prefiltrationカラム（無着色）およびmini isolationカラム（青）です。プロトコールに従って、正しい種類のカラムを使用してください。

注

特別の指示がない限り、すべてのステップは室温で実施してください。

注

バクテリアのRNA精製を実行するには、次のアイテムも必要です。

100% エタノール
リゾチーム
TE, pH 8.0

バクテリアの培養物は、30 $^{\circ}$ Cでは一晩、37 $^{\circ}$ Cでは数時間（通常3時間）で成長させることができます。成長条件は、使用する特定の菌株に依存します。飽和した培養物からRNAを精製しないでください。OD_{600 nm} における読みによって、おおよその培養密度がわかります（600 nm における読み1は、約 10^9 個のバクテリアに相当します）。特定の吸光度の読みにおける培養密度を確定するには、培養物を連続希釈して培養基で培養します。

使用直前に凍結乾燥パウダーをTE pH 8.0に溶かしてリゾチームを作ります。リゾチームは、グラム陰性の菌株の場合は400 g/mLに、グラム陽性の菌株の場合は3 mg/mLにします。リゾチームの凍結アコートを使用すると、収量が減少します。

特別の指示がない限り、全てのステップは室温で実施してください。「RNase-freeの実施」の説明に従ってください。

- 1 バクテリアを集めます。**培養物を4℃、3,000-6,000 × gで遠心分離します。ドレインまたは吸引により、細胞から育成培地を完全に除去する必要があります。吸収材料を使って遠心分離器の容器やボトルから培地の最終痕跡を取り除くこともできます。細胞ペレットは、-80℃で凍結できます。
- 2 ペレットをTE pH 8.0で調製された100 μLのリゾチームに再懸濁します。**グラム陰性細胞の場合は5-20分間の消化、グラム陽性細胞の場合は20-40分間の消化を行う必要があります。
- 3 200 μLの調製済み lysis solutionを消化された細胞に加え、ピペッティングによってよく攪拌します。**この混合物を mini prefiltration カラムに加え、3分間、フルスピード（一般的なマイクロ遠心分離器ではおよそ16,000 × g）で遠心分離します。
- 4 300 μLの100% エタノールを mini prefiltration カラムの通過液に加えます。**ピペッティングによってよく攪拌し、5分間インキュベートします。
- 5 エタノールと溶解液の混合物を mini isolation カラムに入れ、フルスピードで30秒間遠心分離します。**通過液を捨て、RNAを捕捉したカラムを2 mL コレクションチューブにセットします。
- 6 調製済みの Wash Solution（エタノールが加えられたもの）500 μLを mini isolation カラムに入れ、30秒間フルスピードで遠心分離します。**通過液を捨て、mini isolation カラムを同じコレクションチューブにセットします。ステップ6を再度繰り返し、計2回 Wash Solutionにて洗浄します。
- 7 mini isolation カラムを16,000 × gで2分間遠心し、最終痕跡の Wash Solutionを除去します。**
- 8 mini isolation カラムを新しい1.5 mLのRNase-free final コレクションチューブに移し替えます。**10-50 μLのNuclease-free水を膜表面付近から膜の中心に加えます（膜には触れないでください）。**1分間インキュベートした後、フルスピードで1分間遠心分離します。**

注

精製後のRNAを用いたアプリケーションで、より高濃度のRNAサンプルが必要な場合には、溶出量を10 μLとすることができます。ただし、最終的なRNA濃度が3 μg/μLを超える場合、RNAのリカバリ量が低下する可能性があります。溶出量を選択する際、予想収量を考慮に入れてください。予想収量が分からない場合、10 μLのNuclease-free水を使って溶出し、A_{260 nm}によって濃度を求めます。濃度が3 μg/μLを超える場合、残留RNAが膜に残っている可能性があります。mini isolation カラムにさらに10 μLのNuclease-free水を加え、16,000 × gで1分間遠心分離して、2回目の溶出の濃度を求めます。2回目の溶出にかなりのRNAが存在する場合、最初の溶出と一緒にします。

Agilent Total RNA Isolation プロトコール (酵母菌用)

このプロトコールは、酵母菌を用いた小規模のRNA精製用にデザインされ、 5×10^7 個の細胞を使って開発されました。**サッカロマイセス・セレビジア**の標準的取量を表1に示します。酵母菌の菌株が異なる場合、RNAの中身を考慮して細胞の数を最適化することができます。mini isolation カラムの容量は、約100 µg トータルRNAです。

注

キット内のカラム

キットには、2種類の色分けされたカラムが入っています。mini prefiltration カラム（無着色）およびmini isolation カラム（青）です。プロトコールに従って、正しい種類のカラムを使用してください。

注

特別の指示がない限り、すべてのステップは室温で実施してください。

注

酵母菌のRNA精製を実行するには、次のアイテムも必要です。

100% エタノール
β-ME
Lyticase/Zymolase
D-ソルビトール
0.5 M EDTA, pH 7.5

酵母菌培養物は通常、30 °Cで一晩で成長させます。成長条件は、使用する特定の菌株に依存します。飽和した培養物からRNAを精製しないでください。OD_{600 nm}における読みによって、おおよその培養密度がわかります（600 nmにおける読み1は、約 10^7 個の酵母菌細胞に相当します）。特定の吸光度の読みにおける培養密度を確定するには、培養物を連続希釈して培養基で培養します。

開始前に、振盪器またはインキュベータを30 °Cに、冷却遠心器を4 °Cにセットします。

Nuclease-free 水と滅菌フィルタで100 mLのソルビトール/EDTA バッファー（1 Mソルビトール、0.1 M EDTA、pH 7.5）を調製します。各酵母菌RNAの精製には、2 mLのバッファーが必要です。

Lyticaseは、冷たいNuclease-free 水に溶かして最終濃度を500 units/mLにします。4 °Cで最長1週間保存できます。

特別の指示がない限り、すべてのステップは室温で実施してください。「RNase-freeの実施」の説明に従ってください。

- 1 酵母菌を集めます。培養物を4℃、1000×gで5分間遠心分離します。ドレインまたは吸引により、細胞ペレットから育成培地を完全に取り除く必要があります。吸収材料を使って、遠心分離器の容器やボトルから培地の最終痕跡を取り除くこともできます。遠心分離器を25℃にセットします。
- 2 ペレットを 5×10^7 個の細胞あたり2 mLのソルビトール/EDTAバッファーに**再懸濁**します。 5×10^7 個の細胞あたり2 μLのβ-MEと500 μLのLyticaseを加えます。さかさまにして静かに**混ぜ**ます。
- 3 100 rpmで揺さぶりながら、30℃で**15分間インキュベート**します。

注

ステップ6まで溶解させないように、スフェロプラストをていねいに扱います。

- 4 室温、300×gで5分間、スフェロプラストを**遠心分離**します。
- 5 吸引により、上澄みを**慎重に取り除**きます。吸収材料を使って、容器の上澄みの最終痕跡を取り除くこともできます。
- 6 5×10^7 個のスフェロプラストあたり350 μLの調製済みlysis solutionを加えます。ステンレス製のプローブを備えたロータースターターホモジナイザーを用い、15,000 rpmで30秒間ホモジナイズします。気泡の形成を避けるため、プローブは上下ではなく、左右に動かしてください。別の方法として、ライセートを1分間よくボルテックスします。ただし、これによって収量が減少します。
- 7 350 μLのライセートをmini prefiltrationカラム（無着色）中で**3分間**、フルスピード（一般的なマイクロ遠心分離器ではおよそ16,000×g）で**遠心分離**します。このステップにより完全に均一化され、細胞由来の混合物が取り除かれます。mini prefiltrationカラムは再利用**できません**。350 μLを超える量を処理する場合、新しいmini prefiltrationカラムを使用してください。
- 8 浄化されたライセートに**同量の100% エタノール**を加えます。ステップ7でmini prefiltrationカラムに加えたホモジネートの量と同じ量を用いてください。溶液が均一になるまで**混ぜ**ます。混合物を室温で**20分間インキュベート**します。
- 9 エタノールと溶解液の混合物（最大600 μL）をmini isolationカラムに**入れ**、フルスピードで**30秒間遠心分離**します。通過液を捨て、RNAを捕捉したカラムを2 mLコレクションチューブにセットします。遠心分離時間を1分に延長すると、確実にすべてのサンプル通過液が得られます。エタノールと溶解液の混合物の容積が600 μLを超えた場合、残りの溶液を続けて何度かに分けてmini isolationカラムに入れて、上の操作と同様に遠心分離して通過液を捨てます。

3 RNA精製プロトコール

- 10** 調製済みの Wash Solution (エタノールが加えられたもの) 500 μ L を mini isolation カラムに**入れ、30 秒間**フルスピードで**遠心分離します**。通過液を**捨て**、mini isolation カラムを同じコレクションチューブに**セット**します。ステップ10を再度**繰り返し**、計2回 Wash Solution にて洗浄します。
- 11** mini isolation カラムを 16,000 \times g で**2 分間遠心**し、最終痕跡の Wash Solution を除去します。
- 12** mini isolation カラムを新しい 1.5 mL の RNase-free final コレクションチューブに**移し替**えます。10-50 μ L の Nuclease-free 水を膜表面付近から膜の中心に**加**えます (膜には触れないでください)。
1 分間インキュベートした後、フルスピードで**1 分間遠心分離**します。

注

精製後の RNA を用いたアプリケーションで、より高濃度の RNA サンプルが必要な場合には、溶出量を 10 μ L とすることができます。ただし、最終的な RNA 濃度が 3 μ g/ μ L を超える場合、RNA のリカバリー量が低下する可能性があります。溶出量を選択する際、予想収量を考慮に入れてください。予想収量が分からない場合、10 μ L の Nuclease-free 水を使って溶出し、 $A_{260\text{ nm}}$ によって濃度を求めます。濃度が 3 μ g/ μ L を超える場合、残留 RNA が膜に残っている可能性があります。mini isolation カラムにさらに 10 μ L の Nuclease-free 水を加え、16,000 \times g で 1 分間遠心分離して、2 回目の溶出の濃度を求めます。2 回目の溶出にかなりの RNA が存在する場合、最初の溶出と一緒にします。



4

トータルRNAサンプルの 定性分析および定量

このセクションでは、キットで回収したトータルRNAの品質および収量の判定を、UV吸光、Agilent 2100 バイオアナライザで行うためのガイドラインを示します。

UV吸光

トータルRNAの濃度を判定するには、分光光度計を用いて260 nm (A_{260})での吸光度を測定します。吸光度測定の精度を高めるため、サンプルをTE (10 mM Tris-HCl, pH 8、1 mM EDTA)で希釈します。 A_{260}/A_{280} 比は、サンプルのpHの影響を受けます。緩衝液 $0.5 \times$ TE, pH 7.0で測定すれば、信頼性の高い値が得られます。 A_{260} が0.10以下となるサンプルでは、実験データの変動が大きくなる傾向があります。 A_{260} における読み1が、 $40 \mu\text{g RNA/mL}$ に相当します。

UV付近で強く吸収するたんぱく質などの混在物に対し、 A_{260} の A_{280} に対する比からRNA純度を求めます。 A_{260}/A_{280} の比が1.8と2.1の間の数値を示せば、高純度のトータルRNAであると言えます。このキットを使用すれば、この値が得られます。1.8より低い数値は実験系に問題がある可能性を示し、この値を示したRNAは注意して取り扱う必要があります。

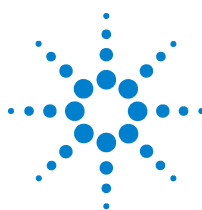
RNAの吸光度測定に関する詳細なプロトコールについては、「Molecular Cloning. A Laboratory Manual」Volume 3, Section A8.20 (Sambrook & Russel, 2001)を参照してください。

Agilent 2100 バイオアナライザ

トータルRNAサンプルのRNAの品質と完全性を評価するには、Agilent 2100 バイオアナライザのご使用をおすすめします。RNA Integrity Number (RIN) ソフトウェア・アルゴリズムが、RNA 6000 Nano/Picoアッセイで分析された真核RNAサンプルに完全性を表す数値を自動的に割り当てます。完全性の判定に用いられるパラメータは、単に28S対18SリボソームRNAの比を決定するのではなく、RNAサンプルの電気泳動トレース全体を扱います。研究者は、RINによってRNA精製と精製後のRNAを用いた実験の再現性を比較することができます。

リファレンス

- Efficient Method for Isolation of High Quality Concentrated Cellular RNA with Extremely Low Levels of Genomic DNA Contamination. Agilent Technologies, publication 5989-0322EN
www.agilent.com/chem
- Efficient Removal of Transfected Plasmid DNA from Total RNA Prepared with the Agilent Total RNA Isolation Mini Kit, Agilent Technologies, publication 5989-1597EN www.agilent.com/chem
- High-Purity Bacterial RNA Isolated with the Agilent Total RNA Isolation Mini Kit, Agilent Technologies, publication 5988-2281EN www.agilent.com/chem
- Quantitation Comparison of Total RNA Using the Agilent 2100 Bioanalyzer, Ribogreen Analysis, and UV Spectrophotometry. Agilent Technologies, publication 5988-7650EN www.agilent.com/chem
- RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control, Agilent Technologies, publication 5989-1165EN www.agilent.com/chem.
- The Total RNA Story. Agilent Technologies, publication 5988-2281EN www.agilent.com/chem
- Isolation of High-Purity Total Cellular RNA from Yeast Using the Agilent Total RNA Isolation Mini Kit. Agilent Technologies, publication 5989-2313EN www.agilent.com/chem
- Isolation of High-Purity Total Cellular RNA from Muscle Tissues Using the Agilent Total RNA Isolation Mini Kit. Agilent Technologies, publication 5989-2312EN www.agilent.com/chem



5

トラブルシューティング

表4に、処理の手順に起因して生じる可能性のある一般的な問題、および考えられる解決策を挙げました。

表4 よくある問題と、考えられる解決策

現象	解決策
mini prefiltration カラムが詰まる	<p>以下の方法のいずれかによって粘性を低下させます。</p> <ul style="list-style-type: none">• さらに lysis solution を加えてホモジネートを希釈する。• ライセートをより完全にホモジナイズする。• 出発試料の量を減らす。• prefiltration に先立ってライセートを遠心分離する。
RNA 収量が低い	<ul style="list-style-type: none">• 破壊およびホモジナイゼーションを十分に行なう。組織サンプルを完全に磨砕する。• ライセートを調製したら、直ちに RNA を精製する。-70 °C で保存されたライセートを使用する場合、使用前に 37 °C で 15-20 分分解凍し、よくボルテックスする。• サンプルに問題がないかどうか確認する。組織は必ず、生物体から分離した直後に液体窒素で冷凍する。• カラム (mini prefiltration と mini-isolation の両方) でサンプルをオーバーロードしないようにする。• サンプルの種類 (バクテリア、繊維組織) に応じて専用プロトコールを使用する。
RNA が分解している	<ul style="list-style-type: none">• 器具のクリーニングに際しては、RNase-free の実施を順守する (10 ページの「RNase-free の実施」を参照)。• lysis solution に浸漬した状態で組織を解凍するようにする。• サンプルに問題がないかどうか確認する。組織は採取後直ちにホモジナイズするか、直ちに液体窒素で冷凍する。• ライセートを調製したら、直ちに RNA を精製する。• 保存予定のサンプルには RNA later を使用する。
A_{260}/A_{280} 比が低い	<p>A_{260}/A_{280} 比は、サンプルの pH の影響を受ける。1 × TE、pH 8.0 などの緩衝液で測定すれば、信頼性の高い値が得られる。</p>
gDNA の濃度が高い	<p>サンプルを希釈し、追加の mini prefiltration カラムを使用する。</p>

5 トラブルシューティング

情報、説明、仕様は、予告なしに変更することがあります。新製品のアップデートをご希望の場合は、以下の Web サイトでオンライン登録を行ってください。

www.agilent.com/chem/dnasupport



5188-2737