

一般研究用 *in vitro* 実験用

High Pure RNA Isolation Kit

トータル RNA を分離するための小スケール調製(ミニプレップ)用キット

Cat. No. 1 828 665

50 反応用

バージョン 3, 2003 年 1 月

保存温度 15~25°C

製品説明

原理

遺伝子発現の解析には、RNA の分離が不可欠です。逆転写酵素 PCR (RT-PCR)、ノーザンブロットイング、RNase プロテクションアッセイ、およびプライマー伸長など頻繁に活用されるテクニックでは、培養細胞、血液、酵母、および細菌など異なる試料物質から分離された、分解のないイントラクトな RNA が必要とされます。

培養細胞における標準的なプロトコールでは、特製の溶解/結合バッファー中で試料をインキュベートすることにより、細胞の溶解が行われます。同時に、RNase が不活性化されます。その他の試料物質では、溶解前に特別な処理が必要になります。カオトロピック塩存在下で、核酸はガラスファイバーの表面に特異的に結合します(1)。この結合反応は、水の規則正しい分子構造破壊および核酸との相互作用により、わずかに数秒間で起こります。したがって、ガラスファイバー製フリスに核酸が吸着しやすくなります。この結合プロセスは核酸に特異的ですが、このキットでは結合条件を特に RNA 用に最適化しています。共存する残りの DNA は、ガラスファイバー製フリスに直接使用される DNase I により分解されます。シンプルな洗浄ステップにより塩、タンパク、およびその他の細胞由来の不要物からフリスに結合した RNA を精製します。精製 RNA は水により溶出されます。

アプリケーション

High Pure[®] RNA Isolation Kit は、培養細胞からトータル RNA を精製するためにデザインされています。血液、酵母、および細菌などその他の試料物質については、溶解前に特別な処理が追加が必要になります。この処理操作は、プロトコールのセクションに解説されます。特異的な DNase 消化により、不要な DNA の大部分が分解除去されます。この RNA 調製試料をそのまま RT-PCR に使用することが可能です。さらに、この RNA はノーザンブロットイング、RNase プロテクションアッセイ、およびプライマー伸長などその他のテクニックにも適しています。この方法により、有機溶媒抽出、RNA 沈殿、または超遠心分離を必要とするその他の方法に比べて短時間で RNA を精製することが可能です。

キットの内容

ボトル キャップ色	ラベル	内容および機能
1 緑キャップ	Lysis/-binding buffer	溶解および結合バッファー 25 mL×1 バイアル: 4.5 M 塩酸グアニジン、 50 mM Tris-HCl、および 30% Triton [®] X-100 (w/v)、pH 6.8 (25°C)
2	DNase I、凍結乾燥	10 KU 凍結乾燥 DNase I×1 バイアル 溶出バッファー(elution buffer) 0.55 mL 中に再 懸濁し、分注して-15~-25°Cにて保存。
3 白キャップ	DNase Incubation Buffer	DNase インキュベーションバッファー 10 mL×1 バイアル: 1M NaCl、20 mM Tris- HCl、および 10 mM MnCl ₂ 、pH 7.0 (25°C)
4 黒キャップ	Wash buffer I	洗浄バッファー I 【最初に使用する前に、無水エタノール 20 mL を加えます。】 33 mL×1 バイアル: 5M 塩酸グアニジンおよび 20 mM Tris-HCl、pH 6.6 (25°C) (エタノールを 加えた後の最終濃度として)
5 青キャップ	Wash buffer II	洗浄バッファー II 【最初に使用する前に、無水エタノール 40 mL を加えます。】 洗浄バッファー II 10 mL×1 バイアル: 20 mM NaCl および 2 mM Tris-HCl、pH 7.5 (25°C) (エタノールを加えた後の最終濃度と して)
6	Elution buffer	溶出バッファー 30 mL×1 バイアル: スクレアーゼフリーの滅 菌済み再蒸留水
7	Filter tubes	50 チューブ入りバッグ (1 バッグ) このポリプロピレン製チューブ内には、グ ラスファイバー製フリスが 2 層構造で充填さ れています。各フィルターチューブには、700 μL までの容量の試料を使用することが可能 です。
8	collection tubes	回収用チューブ: 50 チューブ入りバッグ (1 バッグ) 2 mL 用ポリプロピレン製チューブ

安定性と保存

キットの構成物は 15~25°Cにて保存して下さい。この温度条件下で安定です。凍結乾燥 DNase I を溶出バッファーで溶解した後、分注して-15~-25°Cで保存して下さい。この溶液は、溶解後 12 ヶ月間安定です。

標準的なプロトコール

キットを使用する前にお読み下さい。

- DNase I (バイアル 2) を、溶出バッファー 0.55 mL 中に溶解し、分注した後-15~-25°Cにて保存します。
- 洗浄バッファー I (バイアル 4) に、特級エタノール 20 mL を加えます。
- 洗浄バッファー II (バイアル 5) に、特級エタノール 40 mL を加えます。

注意事項

RNase のコンタミネーションを防止するため、滅菌済みディスポーザブルのチューブおよびチップを使用することをお勧めします。アッセイ中は手袋を着用して操作を行って下さい。溶解/結合バッファー(バイアル 1、緑色キャップ)および洗浄バッファー I (バイアル 4、黒色キャップ)には、刺激性のある塩酸グアニジンが含まれています。手袋を着用し、一般的な安全上の注意事項にしたがって操作を行って下さい。

培養細胞からトータル RNA を分離する

(1×10⁸ 細胞に適する)

- PBS 200 μL 中に細胞を再懸濁します。
- 溶解/結合バッファー(緑色キャップ) 400 μL を加え、よく混合します。
- High Pure フィルターチューブと回収用チューブとを組み立て、試料をフィルターチューブ上部のバッファー受けにピペットで加えます。
- 標準的な卓上型遠心分離機内で、10000 rpm (約 8000×g)にて 15 秒間遠心分離します。回収用チューブに排出された液を捨て、再びフィルターチューブとこの回収用チューブとを組み立てます。
- 試料当たり 90 μL の DNase インキュベーションバッファー(白色キャップ)を、滅菌済み反応チューブにピペットで加え、このチューブに DNase I 10 μL を加えて混合します。この混合液をピペットでフィルターチューブ上部バッファー受けにのせ、フィルターチューブ内のガラスファイバーフリスにアプライさせます。15~25°Cにて 15 分間インキュベートします。
- 洗浄バッファー I (黒色キャップ) 500 μL をフィルターチューブ上部バッファー受けに加え、10000 rpm (約 8000×g)にて 15 秒間遠心分離し、回収用チューブに排出された液を捨てます。再びフィルターチューブとこの回収用チューブとを組み立てます。
- 洗浄バッファー II (青色キャップ) 500 μL をフィルターチューブ上部バッファー受けに加え、ステップ 6 と同様に遠心分離します。
- 洗浄バッファー II (青色キャップ) 200 μL をフィルターチューブ上部バッファー受けに加え、最大スピード(約 13000×g)にて 2 分間遠心分離し、フィルターチューブ内に残っている洗浄バッファーを取り除きます。
- 回収用チューブを捨て、フィルターチューブを滅菌済み 1.5 mL 用反応チューブに挿し込みます。
- 溶出バッファー (無色キャップ) 50~100 μL をフィルターチューブに加え、10000 rpm (約 8000×g)にて 1 分間遠心分離して、RNA を溶出します。

ヒト血液からトータル RNA を分離する

(全血 200~500 μL に適する)

追加が必要となる試薬: Red Blood Cell Lysis Buffer^{*}

白血球中には RNA があまり多く含まれないため、分離された RNA を RT-PCR に限定して使用することをお勧めします。EDTA-Na₂ 処理された採血管管中に採集された新鮮な血液を使用します。赤血球は低張液溶解により溶解されます。Red Blood Cell Lysis Buffer のご利用をお勧めします。このバッファーを用いた操作について、以下に解説します。

- 滅菌済み 1.5 mL 用反応チューブに、洗浄バッファー-1 mL を加えます。
- ヒト全血 500 μL を加え、チューブを繰り返して混合します。ヴォルテックスしないで下さい。
- このチューブを振とう台または回転式シェーカーに設置し、15~25°Cにて 10 分間インキュベートします。あるいは、チューブを手で持ったまま 10 分間一定の間隔で繰り返し上下逆さにします。
- 標準的なマイクロ遠心チューブ内で、2500 rpm (約 500×g)にて 5 分間遠心分離します。
- ピペットを用いて、赤色透明の上清を慎重に取り除き、適切な方法で廃棄します。
- 白色のペレットに溶血バッファー 1 mL を加え、チューブの底を指先で軽くはじきながら、ペレットが完全に再懸濁されるまで混合します。ヴォルテックスしないで下さい。
- 500 rpm (約 500×g)にて 3 分間遠心分離します。
- 上清を慎重に取り除き、適切な方法で廃棄します。特に、白色ペレットの外表面の周囲に環状に形成される血液細胞の破片を取り除きます。
- 白色ペレットを PBS 200 μL 中に再懸濁し、培養細胞用プロトコールのステップ 2 に進みます。

酵母からトータル RNA を分離する

(1×10⁸ 細胞に適する)

追加が必要となる試薬: リチカーゼ(Lyticase) (0.5 mg/mL)

対数増幅の中期または後期(OD₆₀₀<2.0)の細胞を採集することをお勧めします。細胞数は、ヘマサイトメーターを用いて直接数えるか、あるいは分光光度計を用いて 600 nm における光学密度により測定することが可能です。A₆₀₀は 2×10⁸細胞であるため、A₆₀₀の値が 0.1~0.15 mL を示す程度に細胞を希釈して使用します。

- 標準的な卓上型遠心分離機を用い、5000 rpm (約 2000×g)にて 5 分間遠心分離し、試料を回収します。ペレットを PBS 200 μL 中に再懸濁します。
- リチカーゼ(0.5 mg/mL)を 10 μL 加え、30°Cにて 15 分間インキュベートします。
- 培養細胞用プロトコールのステップ 2 に進みます。

細菌(グラム陽性およびグラム陰性)からトータル RNA を分離する

(1×10⁸ 細胞に適する)

追加が必要となる試薬: リゾチーム(Lysozyme[®]) (ストック溶液 50 mg/mL、分注し-15~-25°Cにて保存)

- 標準的な卓上型遠心分離機を用い、5000 rpm (約 2000×g)にて 5 分間遠心分離し、試料を回収します。ペレットを 10 mM Tris、pH 8.0 バッファー 200 μL 中に再懸濁します。
- リゾチーム(ストック溶液 0.5 mg/mL、分注し-15~-25°Cにて保存)を 4 μL 加えます。37°Cにて 10 分間インキュベートします。
- 溶解/結合バッファー(緑色キャップ) 400 μL を加え、よく混合します。
- High Pure フィルターチューブと回収用チューブとを組み立て、試料をフィルターチューブ上部のバッファー受けにピペットで加えます。
- 標準的な卓上型遠心分離機内で、10000 rpm (約 8000×g)にて 15 秒間遠心分離します。回収用チューブに排出された液を捨て、再びフィルターチューブとこの回収用チューブとを組み立てます。

6. DNase インキュベーションバッファー(白色キャップ) 90 μ L を、滅菌済み反応チューブにピペットで加え、このチューブに DNase I 10 μ L を加えて混合します。この混合液をピペットでフィルターチューブ上部バッファー受けにのせます。15~25 $^{\circ}$ Cにて 60 分間インキュベートします。
7. 培養細胞用プロトコルのステップ 6 に進みます。

実験結果

抽出源	平均収量 (μ g)
培養細胞 (10 ⁸ 細胞): K562 細胞	15 μ g
ヒト血液 (200-500 μ L)	測定できません。RT-PCR のみに使用します。
酵母 (10 ⁸ 細胞): <i>S. cerevisiae</i>	20 μ g
細菌: <i>E. coli</i>	50 μ g
細菌: <i>B. subtilis</i>	35 μ g

分離されたトータル RNA をそのままファーストストランド cDNA 合成に使用することができます。使用する mRNA の発現の程度に応じて、トータル RNA 1~10 μ L を用いて逆転写反応を行うことをお勧めします。ファーストストランド cDNA 合成無しで PCR を実行することにより DNA のコンタミネーションが無いことを確認して下さい。

品質管理

K562 1 \times 10⁶細胞を、培養細胞用プロトコルの解説にしたがって処理します。RNA の収量を、260 nm における光学密度測定により決定します。少なくとも 10 μ g のトータル RNA が分離されます。分離されたトータル RNA が完全な状態にあるかどうかや、サイズの分布について、変性アガロースゲル中のリボソーム RNA のバンドパターンに基づいて検査します。分離されたトータル RNA 100 ng に用いて、逆転写酵素 M-MuLV^{*}およびポリ (dT)₁₈^{*} (プライマー)によるファーストストランド cDNA 合成を行います。Expand³⁰ High Fidelity PCR System^{*}およびグリセルアルデヒド-3-リン酸 (G3PDH) の特異プライマーを用いた PCR により、期待されるサイズ (983 bp) の増幅産物が得られます。逆転写反応無しで PCR を行い、増幅産物が得られないことから、DNA のコンタミネーションが無いことを検査します。機能試験により、キットの総ての内容物が RNase を含まないことを確認します。

リファレンス

1 Vogelstein, B., & Gillespie, D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619.

* Roche Molecular Biochemicals から発売されています。

¹⁾ High Pure は Roche Group のメンバーの商標です。

²⁾ Triton は Rohm & Haas Company, Philadelphia, PA, USA の商標です。

³⁾ Expand は Roche Group のメンバーの商標です。

→ ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
 〒105-0014 東京都港区芝 2 丁目 6 番 1 号
www.roche-applied-science.com
 TEL. No. : 03-5443-5287
 FAX. No. : 03-5443-7098
 E-Mail : tokyo.biochemicals@roche.com

本製品能書 (英語版) は下記 URL よりご覧頂けます。

<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1828665a.pdf>