取 扱 説 明 書 シカジーニアス® RNAプレップキット(組織用)2
Cica Geneus® RNA Prep Kit (for Tissue)2

1. はじめに
本製品は、細胞培養液、動物組織など、様々なサンプルから簡便にトータル RNA を精製するためのキットです。本製品は、最適化したバッファーシステムとシリカベースのメンブレンのスピンカラムを組み合わせることで、様々なアプリケーションに適用可能な精製 RNA を迅速に調製することができます。

2. 製品形態

製品名	シカジーニアス® RNA プレップキット(組織用)2 (Cica Geneus® RNA Prep Kit (for Tissue)2)
製品番号	08144-96
容量	50 回分
保管温度	室温 (15 ℃～25 ℃)

3. 構成試薬 (50 回)

個別名称	容量	用途
SV Column type F (コレクションチューブ付)	10 個×5	核酸結合
1.5 mL チューブ	50 個×1	RNA 回収
①Buffer RAL	40 mL×1	サンプル溶解
②Buffer RW	40 mL×1	RNA 結合促進
③Buffer RSW ※1	12 mL×1	カラム洗浄
④Buffer DRB	5 mL×1	DNase I 処理
⑤Nuclease-free water	15 mL×1	RNA 溶出
⑥DNase I ※2	240 Kunitz unit	ゲノム DNA の分解

4. 製品仕様

製品タイプ		スピンカラム
最大サンプル量	組織の場合	30 mg
	細胞の場合	1×10^7 個
カラムへの最大ローディング量		750 µL
最小溶出液量		30 µL
カラムの最大 RNA 結合量		500 µg

5. 使用上の注意
①Buffer RAL、②Buffer RW に沈殿が生じた場合には 50 ℃でインキュベートし、沈殿を完全に溶かしてからご使用下さい。
本製品は、皮膚や眼、気道に対して有害な刺激物を含んでいます。本製品を扱う際は十分に注意し、手袋や保護メガネを着用して下さい。万が一試薬が付着した場合は、速やかに大量の水で洗い、医師の診察を受けて下さい。
①Buffer RAL、②Buffer RW はカオトロピック塩を含んでいます。カオトロピック塩は漂白剤と混ざると反応性の高い化合物を生じる可能性があります。本製品に漂白剤や酸性溶液が混ざらないように十分注意して下さい。
RNase のコンタミネーションは RNA の分解を引き起こします。必ず手袋を着用して、コンタミネーションに注意して作業して下さい。また、RNase free グレードのプラスチック製品、ピペットチップ等をご使用下さい。

6. 必要な試薬・器具類
96 %～100 %エタノール(分子生物学用)、70 %エタノール、2-メルカプトエタノール(以下、2-ME)、ボルテックスミキサー、2 mL チューブ用遠心機、マイクロピペット、ピペット用チップ、1.5 mL チューブ、遠心チューブ、ホモジナイザー

7. プロトコール
【重要】 実験を始める前の注意事項
※1:③Buffer RSW は、初回使用前にエタノール(分子生物学用)(別売)を 48 mL 加えて混合し、合計 60 mL としてからご使用下さい。
※2:⑥DNase I(凍結乾燥品)を使用する際は、120 µL の⑤Nuclease-free water を加え、穏やかに溶解して下さい(ボルテックス等による激しい攪拌は避けて下さい)。溶解した DNase I 溶液は 1 検体につき 2 µL 使用します。必要に応じて小分けをし、-20 ℃で保管して下さい。

【標準プロトコール】
1) ステップ 1a)～1c)に従って遠心チューブにサンプルを回収します。
1a) 接着細胞サンプルの場合
適切な細胞数(5×10^6 個)をセルスクレーパーで遠心チューブ(別売)に取り、室温で 5 分間 800×*g* 以下で遠心し、細胞をペレットにします。その後、上清の培養液を吸引除去します。
1b) 浮遊細胞サンプルの場合
適切な細胞数(5×10^6 個)を遠心チューブ(別売)に取り、室温で 5 分間 800×*g* 以下で遠心し、細胞をペレットにします。その後、上清の培養液を吸引除去します。
*次のステップ 2)までの間に細胞の洗浄は行なわないで下さい。mRNA の分解を引き起こします。
1c) 組織サンプルの場合
・サンプルの種類に応じて、ⅰ～ⅲを選択して下さい。
・新鮮な組織、冷凍された組織または RNA 安定化溶液等で保存された組織サンプルをご使用下さい。RNA 安定化溶液に保存されたサンプルの場合、保存液を完全に除去してからご使用下さい。
・組織サンプルを処理する際には、あらかじめ①Buffer RAL 1 mL につき 10 µL の 2-ME(別売)を加えて下さい。
ⅰ:事前に冷却した乳鉢と乳棒で液体窒素を用いて、組織を微粉末に粉砕します。 最大 20 mg の粉末組織を 1.5 mL チューブ(別売)に入れます。 350 µL の Buffer RAL(2-ME 含)を加え、30 秒間パルスボルテックスします。
ⅱ:350 µL の Buffer RAL(2-ME 含)中で、20 mg の組織サンプルをホモジナイズします。
ⅲ:ビーズ式ホモジナイザーを使用して、専用チューブ(別売)で 20 mg の組織サンプルをホモジナイズします。350 µL の Buffer RAL(2-ME 含)を加え、30 秒間パルスボルテックスします。
*組織サンプルは 30 mg まで処理が可能です。20 mg 以上の組織サンプルを処理する際は Buffer RAL(2-ME 含)を、700 µL 加えて下さい。
*①Buffer RAL で組織を完全に破壊し、サンプルを完全に溶解します。 溶解が不十分な場合、次のステップでカラムの目詰まりを引き起こす可能性があります。
*溶解が難しい線維質な組織(心臓、筋肉、皮膚など)をサンプルとして使用するには、1 回の処理につき最大 10 mg を使用することを推奨します。
2) ステップ 2ab), 2c)に従って操作を行ないます。
2ab) 1a),1b)にて処理した接着細胞・浮遊細胞サンプルの場合
1a)あるいは 1b)のチューブに 350 µL または 700 µL の①Buffer RAL を加え、ピペッティングまたはホモジナイザーを用いた撹拌を行ない、十分に懸濁します。
*細胞数が～5×10^6 個の場合は 350 µL、5×10^6 個～1×10^7 個の場合は 700 µL の①Buffer RAL を添加して下さい。
2c) 1c)にて処理した組織サンプルの場合
室温で 2 分間 10,000×*g* 以上で遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブ(別売)に移します。
3) 2)で得られた溶液と同量の 70 %エタノール(別売)を加え、ピペッティングでよく混合します。
4) 3)のサンプル液(最大 750 µL)を SV Column type F に加えます。
室温で 1 分間 10,000×*g* 以上で遠心し、ろ液を捨て、同じコレクションチューブに SV Column type F を再度セットします。
*3)のサンプル液が 750 µL 以上となった場合、4)の操作を残りのサンプル液が無くなるまで繰り返して下さい。
5) 350 µL の②Buffer RW を 4) の SV Column type F に加え、室温で 30 秒間 10,000×*g* 以上で遠心します。ろ液を捨て、同じコレクションチューブに SV Column type F を再度セットします。
6) 2 µL の DNase I 溶液と 70 µL の④Buffer DRB をピペッティングで混合して DNase I 希釈液を調製します。
*DNase I 希釈液は使用量だけを用事調製して下さい。
7) SV Column type F のメンブレンの中心に 70 µLの DNase I 希釈液を加え、室温で 10 分間静置します。

取 扱 説 明 書

シカジーニアス® RNAプレップキット(組織用)2
Cica Geneus® RNA Prep Kit (for Tissue)2

8) 350 μL の②Buffer RW を 7) の SV Column type F に加え、室温で 30 秒間 10,000×*g* 以上で遠心します。ろ液を捨て、同じコレクションチューブに SV Column type F を再度セットします。
9) 500 μL の③Buffer RSW を 8) の SV Column type F に加え、室温で 30 秒間 10,000×*g* 以上で遠心します。ろ液を捨て、同じコレクションチューブに SV Column type F を再度セットします。
10) 9)の操作を再度繰り返します。
11) 室温で 1 分間 13,000×*g* 以上で遠心し、チューブ内壁についた液を完全に除去した後、SV Column type F を新しい 1.5 mL チューブ(付属)にセットします。
12) 11) の SV Column type F のメンブレンの中心に 50 μL の⑤Nuclease-free water を加え、室温で 1 分間静置します。
*用途に応じて、⑤Nuclease-free water の量は 30 μL まで減らすことができます。
13) 室温で 1 分間 10,000×*g* 以上で遠心し、ろ液(RNA 溶液)を回収します。
*溶出した RNA は-70 ℃以下で保存して下さい。

【ゲノム DNA 除去用プロトコール】
RNA 溶液に混入したゲノム DNA をより効率的に除去するためのプロトコールです。DNA の混入が問題となる用途には本プロトコールで調製した RNA 溶液をご使用下さい。また、DNA 量が多いサンプルでは本プロトコールを強く推奨します。
***SV Column type F(コレクションチューブ付)が追加で必要となります。**

1) RNA 溶液が入った 1.5 mL チューブに、RNA 溶液 50 μL に対して 5 μL の④Buffer DRB、1 μL の DNase I 溶液(④Buffer DRB で希釈していないもの)を加え、ピペッティングで混合します。
*1 回で最大 100 μg RNA/100 μL まで処理が可能です。
2) 室温で 10 分間静置します。
3) 1)のチューブに RNA 溶液 50 μL に対して 1 μL の 0.25 M EDTA(別売)を加えます。
4) DNase I を失活させるため、75 ℃で 10 分間インキュベートし、スピンダウンして内壁についた液を落とします。
5) 4)のチューブに⑤Nuclease-free water を加えて液量を 100 μL に調整した後、350 μL の①Buffer RAL を加え、完全に混合します。
6) 5) のチューブに 250 μL のエタノール(分子生物学用)(別売)を加え、ピペッティングでよく混合します。
*遠心は行なわないで下さい。
7) 6)のサンプル液を新しい SV Column type F に加え、室温で 30 秒間 10,000×*g* 以上で遠心し、ろ液を捨て、同じコレクションチューブに SV Column type F を再度セットします。
8) 500 μL の③Buffer RSW を 7) の SV Column type F に加え、室温で 30 秒間 10,000×*g* 以上で遠心します。ろ液を捨て、同じコレクションチューブに SV Column type F を再度セットします。
9) 8)の操作を再度繰り返します。
10) 室温で 1 分間 13,000×*g* 以上で遠心し、チューブ内壁についた液を完全に除去した後、SV Column type F を新しい 1.5 mL チューブ(付属)にセットします。
11) 10)の SV Column type F のメンブレンの中心に 50 μL の⑤Nuclease-free water を加え、室温で 1 分間静置します。
12) 室温で 1 分間 10,000×*g* 以上で遠心し、ろ液(RNA 溶液)を回収します。
*溶出した RNA は-70 ℃以下で保存して下さい。

◇本取扱説明書の補足資料として、本製品の操作方法を簡潔にまとめたプロトコールシートを当社 HP にて公開しております。こちらの資料もご活用下さい。
https://products.kanto.co.jp/uploads/pj46_m_pdf/758/pdf1.pdf

8. トラブルシューティング

現象	考えられる原因	対策
回収量が少ない	サンプルの破砕が不十分	確実に懸濁あるいは破砕を行なって下さい。
	サンプル量が多すぎる	サンプル量を減らし(特に組織サンプルについては)、正確なサンプル量で実験を始めて下さい。
	細胞培養液・組織保存液の除去が不十分	【標準プロトコール】1)で、細胞培養液または組織保存液を完全に除去して下さい。
	組織の状態が悪い	検体には新鮮な組織サンプル(採取後すぐに-70 ℃にて凍結保存をしたサンプル)をご利用下さい。
カラムが目詰まりしている	サンプルの破砕が不十分、スタートサンプル量が多すぎる	上記項目(サンプルの破砕が不十分、サンプル量が多すぎる)をご参照下さい。
RNA が分解している	組織・細胞の回収に時間がかかっている	サンプル準備後、速やかに【標準プロトコール】1)へ移行して下さい。細胞サンプルの場合は細胞の洗浄を極力避けて下さい。
	RNase のコンタミ	RNase フリーの試薬、実験器具を使用して下さい。
	RNA 溶液の保存が不適切	精製した RNA 溶液は-70 ℃以下で保存して下さい。
	(組織サンプル)2-ME の量が不十分	【標準プロトコール】1)の前に、①Buffer RAL に 1 %分の 2-ME (別売)を加えてからご使用下さい。
RNA 溶液に DNA が混入している	DNase I 処理が正しく行なわれていない	十分な酵素反応を起こすため、DNase I 溶液はカラムのメンブレン中心に加えて下さい。または、【ゲノム DNA 除去用プロトコール】をお試し下さい。
回収した RNA 溶液を用いた実験がうまくいかない	エタノールの残存	③Buffer RSW に含まれるエタノールを完全に除去するために、【標準プロトコール】11)および【ゲノム DNA 除去用プロトコール】10)の遠心ステップは必ず行なって下さい。カラムにエタノールが残存する場合は、遠心ステップを繰り返して下さい。

9. その他
1) 本製品は試験研究用です。医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。
2) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、関係法令に従って処理して下さい。

関東化学株式会社 試薬事業本部 〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090 https://www.kanto.co.jp