

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単にトータル 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システムとシリカベースのメンブレンのスピナラムを組み合わせたことで、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 °C ~ 25 °C)	

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
① Buffer RAL	40 mL × 1	サンプル溶解
② Buffer RW	40 mL × 1	RNA 結合促進
③ Buffer RSW ※1	12 mL × 1	カラム洗浄
④ Buffer DRB	5 mL × 1	DNase I 処理
⑤ Nuclease-free water	15 mL × 1	RNA 溶出
⑥ DNase I ※2	240 Kunitz unit	ゲノム DNA の分解

4. 製品仕様

製品タイプ	スピナラム	
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	30 µL	
カラムの最大 RNA 結合量	500 µg	

5. 使用上の注意

① Buffer RAL、② Buffer RW に沈殿が生じた場合には 50 °C でインキュベートし、沈殿をよく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。

① Buffer RAL、② Buffer 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、RNase free グレードのプラスチック製品、ピペットチップ等を使用し、コンタミネーションに注意し作業を行なって下さい。

6. 必要な試薬・器具類

70 % エタノール、100 % エタノール、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: ③ Buffer 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、合計 60 mL としてからご使用下さい。

※2: ⑥ DNase I (凍結乾燥品)を使用する際は、120 µL の⑤ Nuclease-free water を加え溶解して下さい(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 °C で保管して下さい。

- 1) ステップ 1a), 1b), 1c) に従って遠心チューブにサンプルを回収します。
 - 1a) 付着細胞サンプルの場合
適切な細胞数 (5 × 10⁶) 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 以下で遠心しペレットにします。その後、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 × 10⁶) を遠心チューブ(別売)に取り、室温で 5 分間 800 × g 以下で遠心しペレットにします。その後、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、冷凍された組織および 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① Buffer RAL 1 mL につき 10 µL の 2-メルカプトエタノール(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、組織を微粉末に粉碎します。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① Buffer RAL を加え、30 秒間パルスボルテックスします。
ii : 350 µL の② Buffer RAL 中で、20 mg の組織サンプルをホモジナイズします。
iii : ピ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① Buffer RAL 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① Buffer RAL を、700 µL 加えて下さい。
* ① Buffer 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) に従って操作を行います。
 - 2ab) 1a), 1b) にて処理した付着細胞・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① Buffer RAL を加え、ピPETTING またはホモジナイザーを用いた攪拌を行ない、十分に懸濁します。
* 細胞数が ~5 × 10⁶ cells の場合は 350 µL、5 × 10⁶ ~ 1 × 10⁷ cells の場合は 700 µL の① Buffer 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PETTING 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、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) の動作を 3~4 回繰り返して下さい。
- 5) 350 µL の② Buffer 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、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⑥ DNase I 溶液と 70 µL の④ Buffer DRB をピPETTING 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専用調製して下さい。
- 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。
- 8) 350 µL の③ Buffer RW を 6) 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、コレクションチューブに SV Column type F を再度セットします。

取扱説明書

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

- 9) 500 μ L の③Buffer RSW を 7) の SV Column type F に加え、室温で 30 秒間 10,000 $\times g$ 以上で遠心します。ろ液を捨て、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) の動作を再度繰り返します。
- 11) 室温で 1 分間 13,000 $\times g$ 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) 8) の SV Column type F のメンブレンの中心に 50 μ L の⑤Nuclease-free water を加え、室温で 1 分間静置します。
*用途に応じ、30~50 μ L の⑤Nuclease-free water が使用可能です。
- 13) 室温で 1 分間 10,000 $\times g$ 以上で遠心し、ろ液(RNA 溶液)を回収します。
*溶出した RNA は -70 $^{\circ}$ C 以下にて保存して下さい。

【DNA 量の多いサンプル用プロトコール】

DNA 量の多いサンプルでは、以下の手順に従い、オンカラムでの DNase I 処理を行わずに、RNA 精製後のサンプルに対して DNase I 処理を行なうことで、より効率的に DNA の除去が可能です。

- 1)~4)までは 7. プロトコールと共通の操作を実施下さい。
- 5) 700 μ L の②Buffer RW を 4) の SV Column type F に加え、室温で 30 秒間 10,000 $\times g$ 以上で遠心します。ろ液を捨て、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) 500 μ L の③Buffer RSW を 5) の SV Column type F に加え、室温で 30 秒間 10,000 $\times g$ 以上で遠心します。ろ液を捨て、コレクションチューブに SV Column type F を再度セットします。
- 7) 6) の動作を再度繰り返します。
- 8) 室温で 1 分間 13,000 $\times g$ 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。
- 9) 8) の SV Column type F のメンブレンの中心に 50 μ L の⑤Nuclease-free water を加え、室温で 1 分間静置します。
- 10) 室温で 1 分間 10,000 $\times g$ 以上で遠心し、ろ液(RNA 溶液)を回収します。
- 11) RNA 溶液が入った 1.5 mL チューブに、5 μ L の④Buffer DRB、1 μ L の DNase I 溶液(④Buffer DRB で希釈していないもの)を加え、ピペティングで混合します。
- 12) 室温で 10 分間静置します。
- 13) 1 μ L の 0.25 M EDTA を加えます。
- 14) DNase I を失活させるため、75 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートします。

◇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



9.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	確実に懸濁後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	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。
回収した RNA 溶液を用いた実験がうまくいかない	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 $^{\circ}$ C にて凍結保存したサンプル)をご利用下さい。
	エタノールの残存	微量のエタノールを除去するために、プロトコール 10)で推奨されている遠心ステップを行なって下さい。その後もエタノールの残存が確認される場合、10)を再度繰り返して下さい。
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、スタート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 フリーを試薬、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 $^{\circ}$ C 以下で保存して下さい。
RNA 溶液に DNA が混入している	(組織サンプル)2-メルカプトエタノールの量が不十分	プロトコール 1)の前に、① Buffer RAL に 1 %分の 2-メルカプトエタノールを加えてからご使用下さい。
	DNase I 処理が正しく行われていない	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央部に加えて下さい。または、【DNA 量の多いサンプル用プロトコール】をお試し下さい。

10. 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。