

RNeasy® Protect Saliva Mini Handbook プロトコールとトラブルシューティング

唾液中のトータルRNAの迅速な安定化およびRNA精製

目次	ページ
プロトコール	
RNAprotect® Saliva Reagentを用いた唾液中のRNA安定化	2
安定化した唾液サンプルからのRNeasy Micro Kitを用いたRNA精製	3
トラブルシューティング	7



プロトコール：RNAprotect Saliva Reagentを用いた唾液中のRNA安定化

実験開始前の重要事項

- 唾液を採取する最低1時間前には、飲食、ゆすぎやうがいなどをしないでください。唾液を採取する5分前に口を水でゆすぐことも可能ですが、飲み込まないでください。
- 十分な大きさの口のついた適切な量のコレクション容器に唾液を採取します（50 mlのプリプロピレン製チューブなど）。コレクション容器に唾液を吐き出しますが、粘液や痰を吐き出さないようにします。
- 唾液採取中はコレクション容器を氷上で保管して、遺伝子発現パターンの変化を最低限に抑えます。唾液採取後、サンプルをRNAprotect Saliva Reagentと速やかに混和します。RNAprotect Saliva Reagentで処理するまでRNAは安定化されていません。
- できるだけ速やかに以下の操作を行います。

操作手順：

1. 氷上にセットしたコレクション容器に唾液200 μ lを入れる。すぐにステップ2に進む。

大量の唾液を処理する際には、200 μ lの唾液サンプルを数本準備します。

注：RNAprotect Saliva Reagentで処理（ステップ2）するまで唾液サンプル中のRNAは安定化されていません。

2. マイクロ遠心チューブ（2 ml、別途準備に入っているRNAprotect Saliva Reagent 1 mlに唾液200 μ lを入れる。ボルテックスにより混和する。

唾液サンプル中のRNAがここで安定化されます。

3. 唾液とRNAprotect Saliva Reagentのミックスは、37 $^{\circ}$ Cで1日、室温（15 ~ 25 $^{\circ}$ C）で14日間、2 ~ 8 $^{\circ}$ Cで28日間まで保存できる。-20 $^{\circ}$ Cあるいは-80 $^{\circ}$ Cで長期保存できる。

注：できる限り低温での保存をお勧めします（室温のかわりに2 ~ 8 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ Cの代わりに室温）。

注：保管中、特に低い温度では沈殿物が生じることがあります。この沈殿物はRNA精製には影響しません。

注：最高のRNA収量を得るためには、安定化した唾液サンプルをRNA精製を始める前に最低24時間保存します。

プロトコール：安定化した唾液サンプルからの RNeasy Micro Kit を用いた RNA 精製

実験開始前の重要事項

- RNA を始めて取り扱う場合には、英語版 Handbook 20 ページの Appendix A をお読みください。
- 一般的に唾液サンプルの RNA 含有量は微量です。最高の RNA 収量を得るためには、安定化した唾液サンプルの RNA 精製を始める前に最低 24 時間保存します。唾液の性質は異なるので、保存時間が短縮可能なサンプルもあります。しかし、最低 24 時間の保存をお勧めします。
- Buffer RLT は保存中に沈殿物を形成することがあります。必要な場合には、温めて再び溶解した後、室温（15 ~ 25 °C）にして使用します。
- Buffer RLT および Buffer RW1 はグアニジン塩を含んでいるので漂白剤を含んだ殺菌剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。
- 遠心操作を含むすべてのステップは室温で行います。調製中は迅速に操作を行ってください。

実験を始める前の準備事項

- RNeasy Micro Kit を始めて使用する場合は、まず 24 ml のエタノール（96 ~ 100 %）と 6 ml の RNase フリー水（RNeasy Micro Kit に添付）を混和して 80 % エタノールを調製します。
- Buffer RPE は濃縮溶液としてお届けします。キットを始めて使用する場合は、まずボトルに記載されているように 4 倍量のエタノール（96 ~ 100%）を添加します。
- RNase-Free DNase Set を始めて使用する場合は、まず DNase I ストック溶液を準備します。DNase I（1,500 Knitz units）を付属の RNase フリー水 550 µl で溶解します。DNase I 溶液の飛散を避けるために、容器を開けないでください。RNase フリーの注射針とシリンジを用いて容器に RNase フリー水を注入します。容器を逆さにして、静かに溶かしてください。ボルテックスは使わないでください。

溶解した DNase I を長期保存するためには、ガラス容器からストック溶液を取り出し、1 回に使用する量を分注すると、-20 °C で最高 9 ヶ月まで保存できます。解凍した溶液は 2 ~ 8 °C で 6 週間まで保存できます。解凍後は溶液を再び凍結しないでください。

操作手順：

1. 唾液と RNeasy Protect Saliva Reagent のミックスを 10,000 x g で 10 分間マイクロ遠心機で遠心操作する。

注：安定化した唾液サンプルは、遠心操作を行う前に最低24時間は保存します（前ページ“実験を始める前の重要事項”を参照）

注：室温以下（2～8 あるいは-20 など）でサンプルを保存した場合には完全に解凍し、サンプルを室温に戻してから遠心操作を始めます。

注：保存中、特に低い温度では沈殿物が生じることがあります。この沈殿物はRNA精製には影響しません。

2. 上清をピペットで完全に除去する。
3. チューブを軽く指でたたきペレットをルーズにする。
ペレットをルーズにすることにより、ステップ4でのBuffer RLTでの溶解が容易になります。
4. 350 μ lのBuffer RLTを添加する。ボルテックスによりペレットを完全に溶解する。

注：ペレットを完全に溶解したことを確認します。この操作は約1分間必要です。

注：溶解したペレットは濁っていることがあります。この沈殿物はRNA精製には影響しません。

溶解したペレットは-70 で数ヶ月保存可能です。使用前に室温あるいは水浴37 で溶解ペレットをインキュベートし、完全にサンプルを融解し塩を溶解させます。RNA分解を抑えるために、37 での長時間のインキュベーションを避けます。ステップ5に進みます。

5. 1容量の70%エタノール（350 μ l）を添加し、ピペットあるいはボルテックスでよく混和する。遠心操作をせずにすぐにステップ6に進む。
エタノール添加後、沈殿物が形成することがあります。これは操作には影響しません。

6. 2 mlコレクションチューブ（添付）にセットしたRNeasy MinElute スピнкаラムにサンプルをアプライする。チューブの蓋を静かに閉めて、8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心操作する。ろ液分画を捨てる*。
ステップ7でコレクションチューブを再使用します。

7. 350 μ lのBuffer RW1をRNeasy MinEluteスピнкаラムに添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心操作する。ろ液分画を捨てる*。
ステップ8でコレクションチューブを再使用します。

8. 10 μ lのDNase Iストック溶液を70 μ lのBuffer RDDに添加する。チューブを静かに転倒させて溶液を混和する。

注：DNase Iは物理的変性に特に敏感です。チューブを静かに上下して混和させます。ボルテックスは使わないでください。

9. DNase Iインキュベーション溶液（80 μ l）をRNeasy MinEluteスピнкаラムメンブレンにピペットで直接アプライし、室温で（20～30 ）15分間静置する。

注：DNase I インキュベーション反応液を直接 RNeasy MinElute スピнкаラム・メンブレンにピペットで添加したことを確認してください。溶液の一部がスピнкаラムの壁やオリングについていると、DNase 分解は不完全になります。

10. 350 μ l の Buffer RW1 を RNeasy MinElute スピнкаラムに添加する。チューブの蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心操作する。ろ液分画の入った古いコレクションチューブを捨てる*。
11. RNeasy MinElute スピнкаラムを新しい 2 ml コレクションチューブ (添付) にセットする。RNeasy スピнкаラムに Buffer RPE 500 μ l を添加する。チューブを静かに閉め、洗浄のために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 15 秒間遠心操作する。ろ液分画を捨てる。

ステップ 12 でコレクションチューブを再使用します。

注：Buffer RPE は濃縮溶液としてお届けします。エタノールを Buffer RPE に添加したことを確認します (“ 実験を始める前の準備事項 ” を参照) 。

12. さらに 500 μ l の 80 % エタノールを RNeasy MinElute スピнкаラムに加える。チューブを静かに閉め、RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥するため、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間遠心操作する。ろ液分画と古いコレクションチューブを捨てる。

注：エタノール (96 ~ 100 %) および添付の RNase フリー水を用いて 80 % エタノール液を調製します。

注：遠心操作後、RNeasy MinElute スピнкаラムがろ液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。これはエタノールのキャリーオーバーを防止するために必要です。

13. RNeasy MinElute スピнкаラムを新しい 2 ml コレクションチューブ (添付) にセットする。スピнкаラムの蓋を開けて、最高速度で 5 分間遠心操作する。ろ液分画とコレクションチューブを棄てる。

キャップの損傷を避けるために、遠心の際にはカラムを少なくとも一つ置きにセットしてください。遠心ローターの回転方向と反対の方向に向けて蓋をセットします (例えば、ローターが時計方向に回転する場合には、時計方向と反対方向に向けます) 。

注：残存エタノールはダウストリームの反応を妨害することがあるために、スピнкаラム・メンブレンを乾燥することは重要です。キャップを開いて遠心することにより、RNA 溶出の際にエタノールがキャリーオーバーしません。

* Buffer RW1 を含んだろ液は漂白剤と一緒にしないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。

14. RNeasy MinElute スピンカラムを新しい1.5 ml コレクションチューブ (添付) にセットする。RNaseフリー水 14 μ l を直接スピンカラム・メンブレンの中央に添加する。蓋を静かに閉めて最高速度で1分間遠心操作し、RNA を溶出する。

RNeasy MinElute スピンカラムのデッドボリュームは 2 μ l なので、14 μ l の RNase フリー水で溶出すると、最終的な溶出容量は 12 μ l になります。

少量の RNase フリー水で溶出するとトータル RNA の濃度は高くなりますが、RNA 収量は低下します。RNase フリー水 8 μ l で溶出を行うと RNA 収量は約 20% 減少します。RNase フリー水 8 μ l 以下を用いた RNA 溶出では十分にシリカゲルメンブレンが水和できないため推奨しません。

注：精製した RNA を用いて RT-PCR を行う場合には、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit の使用を推奨します。本キットは、Omniscript[®] Reverse Transcriptase (50 ng 以上の RNA 用にデザイン) と Sensiscript[®] Reverse Transcriptase (50 ng 以下の RNA 用にデザイン) を最適な割合でブレンドしています。リアルタイム定量 RT-PCR には QIAGEN QuantiTect[®] Kit をご利用ください。英語版 Handbook 23 ページの ordering information をご覧ください。

トラブルシューティングガイド

コメント

RNAの分解

- a) 唾液中のRNAが採取前にすでに分解している
唾液から精製したRNAは細胞、血液、組織などから精製したRNAよりも分解していることが多い。RNA分解をチェックするために、安定化した唾液サンプルおよび安定化していない唾液サンプルからRNAを精製して、このRNAの分解度を比較する。
- b) 唾液サンプルを速やかに安定化していない
唾液サンプルをRNAprotect Saliva Reagentと速やかに混和する。氷上でできるだけ迅速に唾液を採取する。
- c) 保存条件を間違えた
RNAprotect Saliva Reagentとミックスした唾液は、37 で1日、15～25 で14日間、2～8 で28日間まで保存できる。また-20 か-80 では長期保存ができる。できるだけ低温で保存する。
- d) RNA精製中にRNAが分解
全てのRNeasyバッファーは試験済みでRNaseフリーである事が保証されているが、RNaseが使用中に混入することがある。RNA精製中およびその後の取り扱いの際にRNaseが混入しないように注意する。RNAの取り扱いの一般的な注意事項は英語版 Handbook 20ページのAppendixを参照する。

カラムの目詰まり

- d) サンプルが完全に溶解していない
唾液由来のペレットがBuffer RLTで完全に溶解したことを確認する（2番目のプロトコール、ステップ4）。
- b) サンプル量が多すぎる
RNeasy MinElute スピнкаラム1回あたり200 µlの唾液からRNAを精製したことを確認する。
- c) 遠心温度が低すぎる
低温での遠心操作はRNeasy MinElute スピнкаラムの目詰まりを起こす沈殿物形成の原因となる。遠心操作を含むすべてのステップは室温で行う。

RNA収量が低い

- a) サンプルが完全に溶解していない
唾液由来のペレットをBuffer RLTで完全に溶解したことを確認する（2番目のプロトコール、ステップ4）。
- b) サンプル量が多すぎる
RNeasy MinElute スピнкаラム1個あたり200 µlの唾液からRNAを精製したことを確認する。

コメント

- c) RNAがスピнкаラム・メンブレンにまだ結合している RNA 溶出を再度行なうが、RNase フリー水を RNeasy MinElute スピнкаラムに入れ、遠心操作前に実験台上で10分間インキュベートする。
- d) エタノールのキャリアオーバー 80%エタノールで洗浄した後、最高速度で5分間遠心操作を行いRNeasy MinElute スピнкаラム・メンブレンを乾燥させたことを確認する(2番目のプロトコール、ステップ13)。遠心操作後、RNeasy MinElute スピнкаラムがる液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除く。これにより、エタノールのキャリアオーバーを防止することができる。
- e) 80%エタノールを RNase フリー水で調製していない エタノールの希釈に RNase フリーではない水を使用した場合、RNase が混入することがある。“実験開始前の準備事項”に記載されているようにエタノール(96~100%)とRNase フリー水(キットに添付)を用いて80%エタノールを調製する(3ページ参照)。
- f) 唾液とRNAprotect Saliva Reagent 混和後のインキュベーション時間が充分でない 唾液サンプルをRNAprotect Saliva Reagent と混和後、RNA精製操作を始める前に最低24時間保存する。

RNA 収量が低いあるいは皆無

- a) RNase フリー水の添加が不適切 RNeasy MinElute スピнкаラム・メンブレンの中央にRNase フリー水をピペットでアプライし、完全にメンブレンを覆うようにする。
- b) エタノールのキャリアオーバー 80%エタノールで洗浄した後、最高速度で5分間遠心操作を行いRNeasy MinElute スピнкаラム・メンブレンを乾燥させたことを確認する(2番目のプロトコール、ステップ13)。遠心操作後、RNeasy MinElute スピнкаラムがる液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除く。これにより、エタノールのキャリアオーバーを防止することができる。
- c) 80%エタノールを RNase フリー水で調製していない エタノールの希釈に RNase フリーではない水を使用した場合、RNase が混入することがある。“実験開始前の準備事項”に記載されているようにエタノール(96~100%)とRNase フリー水(キットに添付)を用いて80%エタノールを調製する(3ページ参照)。

DNAが混入している

DNase分解をしていない 2番目のプロトコール、ステップ8～9に記載されているように、カラム上でのDNase分解を行ったことを確認。

RNAを用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない

a) エタノールのキャリーオーバー 80%エタノールで洗浄した後、最高速度で5分間遠心操作を行いRNeasy MinElute スピнкаラム・メンブレンを乾燥させたことを確認する(2番目のプロトコール、ステップ13)。遠心操作後、RNeasy MinElute スピнкаラムが液と接触しないように、カラムをコレクションチューブから注意深く取り除きます。これにより、エタノールのキャリーオーバーを防止することができる。

b) 塩が溶出液に混入 Buffer RPE が室温で、容器に記載されているようにエタノールを添加したことを確認する。

c) 非常に微量のRNAを逆転写反応に使用した ほとんどの逆転写酵素では約1 µgのRNAを使用する。非常に微量のRNAで逆転写酵素反応を行う場合には50 ng以下のRNAを用いた高感度な逆転写反応用にデザインされたQIAGENのSensiscript RT Kitを使用することを推奨する。

ワンステップRT-PCRやリアルタイム定量RT-PCRには、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit、 QuantiTect RT-PCR Kitをそれぞれ使用することを推奨する。これらのキットにはOmniscriptとSensiscript Reverse Transcriptaseが最適な割合でブレンドされ、反応あたりわずか1 pgから様々な量のRNAを用いた増幅が可能である。

d) サンプル量が多すぎる RNeasy MinElute スピнкаラムあたり唾液200 µlからRNAを精製したことを確認する。

e) 唾液とRNAprotect Saliva Reagent 混和後のインキュベーション時間が充分でない 唾液サンプルをRNAprotect Saliva Reagentと混和後、RNA精製操作を始める前に最低24時間保存する。

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II
Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice.jp@qiagen.com



WWW.QIAGEN.CO.JP

2301017 05/2006