

# AllPrep<sup>®</sup> DNA/RNA/Protein Mini プロトコールとトラブルシューティング

同一の細胞あるいは組織サンプルからゲノムDNA、  
トータルRNA、トータルタンパク質を同時に分離精製

目次	ページ
プロトコール	
ヒト/動物細胞からのゲノムDNA、トータルRNA、 トータルタンパク質の同時分離精製	2
ヒト/動物組織からのゲノムDNA、トータルRNA、 トータルタンパク質の同時分離精製	11
トラブルシューティング	20



# プロトコール：ヒト/動物細胞からのゲノムDNA、トータルRNA、トータルタンパク質の同時分離精製

正確なスタートサンプル量を測定

最高の核酸収量および純度を得るためには、正しいスタートサンプル量を使用することが重要です。一般的には、使用できる最低量は細胞 100 個ですが、最大使用量は以下の項目により変動します：

- 細胞のRNA含有量
- AllPrep DNA スピニングカラムのDNA結合容量
- RNeasy® スピニングカラムのRNA結合容量（100 µg RNA）
- 効率的な溶解に必要なBuffer RLT容量（使用できるBuffer RLTの最大容量の限界は細胞数  $1 \times 10^7$  個までである）

RNA含有量は細胞の種類により大きく変動します。スタートサンプルの最大量をいかに決定するかを以下に実例をあげて説明します：

- COS細胞は高含有量のRNAを有しています（ $10^6$ 個の細胞当たり約 35 µgのRNA）。RNeasyスピニングカラムのRNA結合容量を超えてしまうため、 $3 \times 10^6$ 個以上の細胞を使用しないでください。
- HeLa細胞は平均的なRNA量を有しています（ $10^6$ 個の細胞当たり約 15 µgのRNA）。RNeasyスピニングカラムのRNA結合容量を超えてしまうため、 $7 \times 10^6$ 個以上の細胞を使用しないでください。
- NIH/3T3細胞は低いRNA含量を有しています（ $10^6$ 個の細胞当たり約 10 µgのRNA）。スタートサンプル量として最高  $1 \times 10^7$  個の細胞を使用できます。

処理する細胞がTable 2（英語版 Handbook 14 ページ）に掲載されていない場合や、RNA含有量に関する情報がない場合には、 $3 \sim 4 \times 10^6$  個以下の細胞で実験を開始することを推奨します。精製したRNAの収量および純度により、次回の調製で細胞数を増加することも可能です。

RNAとともにDNAが精製される原因となるため、AllPrep DNAスピニングカラムにオーバーロードしないでください。RNAの収量および純度が顕著に低下するため、RNeasyスピニングカラムをオーバーロードしないでください。

細胞数の計測は、スタートサンプルの定量に最も正確な方法です。目安として様々な容器で培養したHeLa細胞がコンフルエントに到達した後の細胞数を表4に記載しています。

表 4. 様々な容器で培養した HeLa 細胞の数と培養面積

細胞培養容器	培養面積 (cm <sup>2</sup> )*	細胞数 <sup>†</sup>
マルチウェル・プレート		
■ 96 ウェル	0.32 ~ 0.6	4 ~ 5 x 10 <sup>4</sup>
■ 48 ウェル	1	1 x 10 <sup>5</sup>
■ 24 ウェル	2	2.5 x 10 <sup>5</sup>
■ 12 ウェル	4	5 x 10 <sup>5</sup>
■ 6 ウェル	9.5	1 x 10 <sup>6</sup>
ディッシュ		
■ 35 mm	8	1 x 10 <sup>6</sup>
■ 60 mm	21	2.5 x 10 <sup>6</sup>
■ 100 mm	56	7 x 10 <sup>6</sup>
■ 145 ~ 150 mm	145	2 x 10 <sup>7</sup>
フラスコ		
■ 40 ~ 50 ml	25	3 x 10 <sup>6</sup>
■ 250 ~ 300 ml	75	1 x 10 <sup>7</sup>
■ 650 ~ 750 ml	162 ~ 175	2 x 10 <sup>7</sup>

\* マルチウェル・プレートを使用する際はウェル当たりの値；メーカーによりわずかに異なります。

<sup>†</sup> HeLa 細胞（長さは約 15 μm）がコンフルエントに到達したと仮定した場合の細胞数で示しています。細胞数は動物細胞やヒト細胞の種類（長さは 10 ~ 30 μm）により変動します。

#### 実験を始める前の重要事項

- AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit を初めて使う際には、“Important Notes”（英語版 Handbook 12 ページ）をお読みください。
- 初めて RNA を調製する場合には Appendix A（英語版 Handbook 41 ページ）をお読みください。
- TissueRuptor を使用する場合には、TissueRuptor User Manual（日本語版あり）および TissueRuptor Handbook（英語版）を参照にして装置を使用してください。

- 細胞ペレットは、使用するまで $-70^{\circ}\text{C}$  で保存することも直ぐに直接調製することもできます。凍結する前に細胞数を測定します。ステップ2でチューブを指で軽く叩いて細胞ペレットをルーズにするために、凍結した細胞ペレットを少し解凍します。ステップ3でホモジナイズした細胞ライセートは数ヶ月間 $-70^{\circ}\text{C}$  で保存できます。使用する際は凍結したライセートを解凍し、塩類が溶解するまで37 の水浴中でインキュベートします。RNAが分解する可能性があるため、長くインキュベートすることは避けてください。不溶性物質が存在する場合には、 $3,000 \sim 5,000 \times g$ で5分間遠心してください。  
新しいRNaseフリーのガラスかポリプロピレンチューブに上清を移してステップ4を行なってください。
- Buffer RLT、Buffer RW1、Buffer AW1はグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety informationは英語版Handbook 6ページをご覧ください。
- この実験の全てのステップは室温（ $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で行なってください。操作は手早く進めてください。
- 全ての遠心ステップは一般的なマイクロ遠心機を用いて $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ で行なってください。遠心機が $20^{\circ}\text{C}$ 以下に冷却されていないことを確認します。

#### 実験を始める前の準備事項

- $\beta$ -メルカプトエタノール（ $\beta$ -ME）を使用前にBuffer RLTに添加してください。1 mlのBuffer RLTに10  $\mu\text{l}$ の $\beta$ -MEを添加してください。適切な保護着を着用し、ドラフト内で調製してください。 $\beta$ -MEを添加した後、Buffer RLTは室温（ $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で1ヶ月間安定です。
- 使用前にDithiothreitol(DTT)をBuffer ALOに添加してください。Buffer ALO 1 ml当たり8 mgのDTTを添加してください。
- Buffer RPE、Buffer AW1、Buffer AW2は濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、ボトルに記載されている様に適切な量のエタノール（96 ~ 100%）を加えて、ワーキング溶液を調製します。
- Buffer RLTは保存中に沈殿物を形成することがあります。必要な際は温めて沈殿物を溶かした後、室温で使用してください。

#### 操作手順

##### サンプルの破碎およびホモジナイゼーション

1. ステップ1aあるいは1bに従って細胞を回収する。

1a. 浮遊細胞（細胞は $1 \times 10^7$ 個以上使用しない）：

細胞数を数え、使用量を決定する。適切な数の細胞を遠心チューブ（別途準備）中で $300 \times g$ で5分間遠心操作を行なう。上清を注意深く完全に吸引除去してからステップ2に進む。

注：細胞培養液を完全に除去しないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、核酸精製の条件が変化します。この結果、核酸収量と純度が低下することがあります。

1b. 単層培養細胞（細胞は  $1 \times 10^7$  個以上使用しない）：

単層培養細胞は培養容器（直径 10 cm まで）中で直接溶解するか、あるいはトリプシン処理を行ない、細胞ペレットとして回収後溶解することができる。細胞培養フラスコの付着細胞は必ずトリプシン処理を行なう。

直接細胞溶解：

細胞数を数え、使用量を決定する。細胞培養液を完全に吸引してプロトコールのステップ2に続く。

注：細胞培養液を完全に除去しないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、核酸精製の条件が変化します。この結果、核酸収量と純度が低下することがあります。

細胞のトリプシン処理および細胞の回収：

細胞数を数え、使用量を決定する。培養液を吸引除去し、PBSで細胞を洗浄。PBSを吸引除去し、PBSに0.10～0.25%のトリプシンを加える。ディッシュあるいはフラスコから細胞を剥離後、培養液（トリプシンを不活性化するために血清を含む）を添加し、細胞をRNaseフリーのガラスあるいはポリプロピレン遠心チューブ（別途準備）に移し、 $300 \times g$ で5分間遠心する。完全に上清を吸引除去しプロトコールのステップ2に進む。

注：細胞培養液を完全に除去しないと、細胞溶解が阻害されたりライセートが希釈され、核酸精製の条件が変化します。この結果、核酸収量と純度が低下することがあります。

2. Buffer RLTを添加して細胞を破砕する。

ペレット化した細胞は指で軽く叩き細胞ペレットをルーズにする。適切な量のBuffer RLTを添加する（表5参照）。ボルテックスあるいはピペットでミックスし、ステップ3に進む。

注：細胞ペレットが完全に懸濁されていないと効率的に溶解されず、収量が低下します。使用前に $\beta$ -MEをBuffer RLT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）。

表5. 溶解した細胞ペレットに対するBuffer RLT量

細胞ペレットの細胞数	Buffer RLTの容量
$< 5 \times 10^6$	350 $\mu$ l
$5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	600 $\mu$ l

単層培養細胞を直接溶解するためには、適切な容量のBuffer RLT（表6参照）をディッシュ内の細胞に添加する。ゴム製のポリスマンで細胞ライセートを回収する。ライセートをマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで入れる。ボルテックスあるいはピペットでミックスし、細胞塊がないことを確認してからステップ3に進む。

注：使用前にβ-MEをBuffer RLT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）。

表6. 細胞の直接溶解に必要なBuffer RLT量

ディッシュの直径	Buffer RLTの容量*
<6 cm	350 μl
6 ~ 10 cm	600 μl

\* 細胞数に関係なく、ディッシュの表面を完全に覆うために表示量を添加する。

### 3. 細胞ライセートをステップ3a、3bあるいは3cに従ってホモジナイズする。

ホモジナイゼーション法の詳細に関しては、英語版 Handbook 15ページの“Disrupting and homogenizing starting material”を参照してください。1 x 10<sup>5</sup>個以下の細胞を調製する場合には、細胞を1分間ボルテックスすればホモジナイズできます。ホモジナイゼーション後にステップ4に進んでください。

注：不完全なホモジナイゼーションはRNA収量の著しい低下や、AllPrep DNAおよびRNeasy スピニングカラムの目詰まりの原因になります。TissueRuptorやQIAshredderを用いたホモジナイゼーションは、シリンジと注射針を使った方法よりもRNAの収量が一般的に増加します。

3a. 2 mlのコレクションチューブにセットしたQIAshredderスピニングカラムにライセートを直接ピペットで添加し、最高スピードで2分間遠心操作する。ステップ4に進む。

3b. TissueRuptorの使い捨てプローブのチップをライセート中に入れ、ライセートが均一になるまで（通常30秒）TissueRuptorを最高速度で処理する。ステップ4に進む。

注：操作中にTissueRuptorおよび使い捨てプローブが損傷しないようにプローブの先端がバッファに確実に沈められていることを確認します。

3c. 20-G（直径0.9 mm）の注射針を取り付けたRNaseフリーのシリンジ中にライセートを少なくとも5回出し入れする。ステップ4に進む。

4. 2 mlのコレクションチューブ（付属品）にセットしたAllPrep DNAスピニングカラムにホモジナイズしたライセートを入れる。チューブの蓋を静かに閉めて、8,000 x g（10,000 rpm）以上で30秒間遠心操作する。

注：遠心操作後にカラムのメンブレン上に液体が残留していないことを確認します。必要に応じて、全ての液体がメンブレンを通過するまで同様に遠心操作を繰り返します。

5. AllPrep DNA スピнкаラムを新しい2 mlのコレクションチューブ（付属品）にセットし、室温（15 ~ 25 °C）あるいは4 °Cで保存した後に、ステップ21 ~ 24のDNA精製で使用する。ステップ6 ~ 13のRNA精製にはろ液を使用する。

注：AllPrep DNA スピнкаラムを長期間室温あるいは4 °Cで放置しないでください。カラムを冷凍しないでください。

#### トータルRNA精製

6. ステップ5からのろ液に、96 ~ 100%のエタノールを添加する：250 µl（350 µlのBuffer RLTを使用）あるいは400 µl（600 µlのBuffer RLTを使用）。ピペティングにより混和する。遠心操作は行わない。すぐにステップ7に進む。

ホモジナイゼーションおよびAllPrep DNA スピнкаラムへのDNA結合ステップ中にライセート量が減少した場合には、その量に応じてエタノール量を調節してください。

注：ある種の細胞株からのRNA調製では、エタノール添加後に沈殿物を生じることがあります。これは操作には影響しません。

7. 2 ml コレクションチューブ（付属品）にセットしたRNeasy スピнкаラムに、最高700 µlのサンプル（形成した沈殿物を含む）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。ステップ14 ~ 20のタンパク質精製のために、2 mlチューブ（付属品）にろ液\*を移す。

コレクションチューブはステップ8で再使用します。

サンプルが700 µl以上の場合には、残りのサンプルを続けて同じRNeasy スピнкаラムにアプライし、上記の条件で遠心操作を行なってください。各遠心操作の後、ろ液を2 mlチューブに移します。

8. 700 µlのBuffer RW1をRNeasy スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレン洗浄のために8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心する。ろ液を棄てる。\*

コレクションチューブはステップ9で再使用します。

注：遠心操作後、RNeasy 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。コレクションチューブを完璧に空にします。

9. RNeasy スピнкаラムに500 µlのBuffer RPEを添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレン洗浄のために8,000 x g（10,000 rpm）以上で15秒間遠心する。ろ液を棄てる。

コレクションチューブはステップ10で再使用します。

注：Buffer RPEは濃縮液でお届けします。使用前にエタノールを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）。

\* Buffer RLTや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。

10. RNeasy スピнкаラムに 500  $\mu$ l の Buffer RPE を添加する。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。

RNA 溶出中にエタノールがキャリアオーバーしないように、長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥します。残留エタノールはダウンストリーム反応を妨害することがあります。

注：遠心操作後、RNeasy スピнкаラムがろ液と接触しないように気をつけて、カラムをコレクションチューブから取り除きます。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ます。

11. オプション：RNeasy スピнкаラムを新しい 2 ml コレクションチューブ（付属品）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

ステップ 10 の後 RNeasy スピнкаラムの外側にある液が残っている場合や Buffer RPE のキャリアオーバーの可能性を排除するためにこのステップを行ないます。

12. RNeasy スピнкаラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブ（付属品）にセットする。RNase フリー水 30 ~ 50  $\mu$ l を直接スピнкаラム・メンブレンに添加する。チューブを静かに閉め、8,000 x g ( 10,000 rpm ) 以上で 1 分間遠心操作を行ない、RNA を溶出する。

13. 予想した RNA 量が 30  $\mu$ g 以上の場合には、さらに追加で 30 ~ 50  $\mu$ l の RNase フリー水、あるいはステップ 12 での溶出液を用いて（高濃度の RNA が必要な場合）ステップ 12 を再度行なう。ステップ 12 のコレクションチューブに溶出する。

ステップ 12 の溶出液を用いた場合の RNA 量は、RNase フリー水を 2 倍量用いて得られる量より 15 ~ 30 % 少なくなります。RNA の最終濃度は高くなります。

#### 全タンパク質の沈殿

14. ステップ 7 からのろ液に等量の Buffer APP（一般的には 600  $\mu$ l または 1,000  $\mu$ l）を添加する。激しく混和し、室温で 10 分間インキュベートしてタンパク質を沈殿させる。
15. 最高スピードで 10 分間遠心操作を行ない、上清を注意深くデカントで除去する。\*
16. 500  $\mu$ l のエタノール（70%）をタンパク質ペレットに添加する。1 分間最高速度で遠心操作をして、ピペットあるいはデカントによりできるだけ多くの上清を除去する。

ペレットを再懸濁したり、インキュベートする必要はありません。

\* Buffer RLT を含んだ上清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。



17. 室温で5～10分間タンパク質ペレットを乾燥させる。

注：乾燥が不十分だとエタノールが残存し、このためにタンパク質をゲルにアプライする際に問題が生じることがあります。

18. 最高100  $\mu$ lまでのBuffer ALOを添加し、激しく混和してタンパク質ペレットを溶解する。

注：使用前にDTTをBuffer ALO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）。

添加するBuffer ALOの量は、スタートサンプル量により異なります。様々なスタートサンプルから精製した一般的なタンパク質収量はTable 2（英語版 Handbook 14ページ）をご覧ください。

Buffer ALOはSDS-PAGEで使用するLaemmli類似のサンプルバッファーで、プロモフェノール・ブルー色素を含んでいます。タンパク質をSDS-PAGEで解析しない場合には、目的のダウストリーム・アプリケーションで使用可能なバッファーでペレットを溶解します。

RNaseやプロテアーゼの不活化に必要なBuffer RLTを用いた強力な変性条件のために、沈殿タンパク質の溶解度が低下することがあります。数分間ボルテックスするか、ピペットで数回アップダウンしてペレットを溶解します。

溶解しやすくする目的、あるいはSDS-PAGEを行なう前にタンパク質の定量が必要な場合は、ペレットを5% (w/v) SDSあるいは8 M尿酸で溶解します。タンパク質の定量に関する詳細は英語版 Handbook 52ページのAppendix Fを参照してください。

タンパク質の溶解に伴いBuffer ALOが黄色くなるがありますが、ダウストリーム・アプリケーションには影響しません。本バッファーはSDS-PAGEサンプルバッファーで再び青くなります。自分で調製したサンプルバッファーのストック溶液を使用する際には（例えば5倍に濃縮）、タンパク質サンプルをゲルにアプライした際にサンプルバッファーの濃度が1xになるように希釈します。

19. タンパク質を完全に溶解し変性するために、95 °Cで5分間インキュベートする。サンプルを室温まで冷やす。
20. 最高速度で1分間遠心操作して、残った不溶性物質をペレット化する。SDS-PAGEやウエスタンブロットなどのダウストリーム・アプリケーションで上清を使用する。

溶解したタンパク質は-20 °Cで数ヶ月、4 °Cで数日間保存可能です。

## ゲノムDNA精製

21. ステップ5からのAllPrep DNAスピнкаラムに500  $\mu$ lのBuffer AW1を添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレン洗浄のために8,000 x g (10,000 rpm) 以上で15秒間遠心する。ろ液を棄てる。\*

ステップ22でスピнкаラムを再使用します。

注：Buffer AW1は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW1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）。

22. 500  $\mu$ lのBuffer AW2をAllPrep DNAスピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、最高速度で2分間遠心操作し、スピнкаラム・メンブレンを洗浄する。

注：Buffer AW2は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW2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）。

長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥することにより、DNA溶出中にエタノールがキャリーオーバーしないようにします。残留エタノールはダウンストリーム反応を妨害することがあります。

注：遠心操作後、コレクションチューブからAllPrep DNAスピнкаラムを注意して取り除いてください。カラムがろ液と接触した場合には、コレクションチューブを空にしてスピнкаラムを最高速度で1分間、再度遠心操作します。

23. AllPrep DNAスピнкаラムを新しい1.5 mlのコレクションチューブ（付属品）に移す。100  $\mu$ lのBuffer EBを直接スピнкаラム・メンブレンに添加し、カラムの蓋を静かに閉める。室温（15 ~ 25 °C）で1分間インキュベートし、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で1分間遠心操作して、DNAを溶出する。

24. ステップ23を繰り返し、さらにDNAを溶出する。

最初のDNA溶出液の希釈を防ぐには、新しい1.5 mlのコレクションチューブ（別途準備）を用いて2回目のDNA溶出液を回収します。1回目と2回目のDNA溶出液を一緒にする際には、ステップ23で用いたコレクションチューブを再利用します。

注：より高濃度のDNAを得るためには50  $\mu$ lのBuffer EBで2回溶出します。この場合には最終DNA収量は低下します。

\* Buffer AW1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。

# プロトコール：ヒト/動物組織からのゲノムDNA、トータルRNA、トータルタンパク質の同時分離精製

## 正確なスタートサンプル量を測定

最適な核酸の収量および純度を得るためには、正しいスタートサンプル量を使用することが重要です。一般的には、最高 30 mg の新鮮、あるいは凍結した組織、または Allprotect で安定化した組織 \* 15 ~ 20 mg を調製できます。AllPrep DNA スピンカラムの DNA 結合容量、RNeasy スピンカラムの RNA 結合容量、Buffer RLT の溶解容量は、ほとんどの組織では上限の重量まで処理できます。しかし、サンプル量が少ない方が効率良く DNA および RNA を分離できます。様々な組織からの RNA および DNA の平均収量を Table 2 に掲載しています (英語版 Handbook 14 ページ)。

脾臓、胸腺のような組織は非常に多量の DNA を含んでいるため、AllPrep DNA スピンカラムがオーバーロードになります (スタートサンプルとして 5 mg 以上の組織を使用した場合)。微量の DNA でも障害となる高感度なダウストリームに溶出した RNA を使用する場合、これらの組織では RNeasy スピンカラム・メンブレン上で DNase 分解を行なうことを推奨します (詳細は英語版 Handbook 50 ページ、Appendix E を参照)。

骨格筋、心臓、皮膚のような組織は、収縮性のタンパク質、結合組織、コラーゲンが豊富なため、RNA 収量が低いことがあります。これらの組織からゲノム DNA およびトータル RNA を精製するには、DNeasy® Blood & Tissue Kit と RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit をそれぞれ使用されることを推奨します (英語版 Handbook 53 ページの ordering information 参照)。

お客様のスタートサンプルの特性に関する情報がない場合には、10 mg 以上の組織を使用しないことを推奨します。核酸の収量や純度によっては、次の調製で組織を 30 mg まで増やすことも可能です。

**RNA とともに DNA が精製される原因となるため、AllPrep DNA スピンカラムにオーバーロードしないでください。RNA の収量および純度が顕著に低下するため、RNeasy スピンカラムをオーバーロードしないでください。**

組織の重量測定がスタートサンプルを一番正確に定量できる方法です。ほとんどの動物組織で、一辺が 3 mm の立方体 (27 mm<sup>3</sup>) の重さは 30 ~ 35 mg です。

\* タンパク質を精製しない場合、RNA 安定化用の RNAlater® RNA Stabilization Reagent を Allprotect Tissue Reagent の代わりに使用できます。

## 実験を始める前の重要事項

- AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit を初めて使う際には、“ Important Notes ”( 英語版 Handbook 12 ページ ) をお読みください。
- 初めて RNA を調製する場合には Appendix A ( 英語版 Handbook 41 ページ ) をお読みください。
- TissueRuptor を使用する場合には、TissueRuptor User Manual ( 日本語版あり ) および TissueRuptor Handbook ( 英語版 ) 参照にして装置を使用してください。
- Tissuelyser を使用する場合には、Tissuelyser Handbook ( 英語版 ) 参照にして装置を使用してください。
- 最適な結果を得るためには、採取した組織を Allprotect Tissue Reagent 中で即座に安定化します ( Allprotect Tissue Reagent Handbook 参照、日本語プロトコルあり )。安定化試薬中の組織は 37 °C で最高 1 日、15 ~ 25 °C で 7 日間、2 ~ 8 °C で 6 ヶ月、また -20 °C か -80 °C では長期保存できます。
- 新鮮、凍結あるいは Allprotect で安定化した組織を使用できます。組織は -70 °C で数ヶ月保存できます。液体窒素で瞬間凍結した組織は即座に -70 °C に移します。Buffer RLT 中で破碎するまでは重量測定やサンプル取り扱い中に凍結した組織を解凍させないでください。ステップ 3 でのホモジナイズした組織ライセートも -70 °C で数ヶ月保存できます。ステップ 4 を行なう前に、凍結したライセートは 37 °C の水浴中で完全に解凍し、塩類が溶解するまでインキュベートします。RNA が分解する可能性があるため、長くインキュベートすることは避けてください。
- 必要に応じて 30 mg 以上の組織を調製開始時に破碎し、ホモジネートすることも可能です ( 適宜 Buffer RLT 量も増加 )。30 mg 以下に相当するホモジネート溶液の一部を核酸精製用使用し、残りを -80 °C で保存できます。
- Buffer RLT、Buffer RW1、Buffer AW1 はグアニジン塩を含んでいるため、漂白剤を含む消毒薬と一緒に使用しないでください。Safety information は英語版 Handbook 6 ページをご覧ください。
- この実験の全てのステップは室温で行なってください。操作は手早く進めてください。
- 全ての遠心ステップは一般的なマイクロ遠心機を用いて 20 ~ 25 °C で行なってください。遠心機が 20 °C 以下に冷却されていないことを確認します。

## 実験を始める前の準備事項

- 使用前に  $\beta$ -メルカプトエタノール (  $\beta$ -ME ) を Buffer RLT に添加してください。1 ml の Buffer RLT に 10  $\mu$ l の  $\beta$ -ME を添加してください。適切な保護着を着用し、ドラフト内で調製してください。 $\beta$ -ME を添加した後、Buffer RLT は室温 ( 15 ~ 25 °C ) で 1 ヶ月間安定です。
- 使用前に Dithiothreitol ( DTT ) を Buffer ALO に添加してください。Buffer ALO 1 ml 当たり 8 mg の DTT を添加してください。

- Buffer RPE、Buffer AW1、Buffer AW2は、濃縮液としてお届けします。最初に使用する前に、ボトルに記載されている様に適切な量のエタノール（96～100%）を加えて、ワーキング溶液を調製します。
- Buffer RLTは保存中に沈殿物を生じることがあります。必要な際は温めて沈殿物を溶かした後、室温で使用してください。

## 操作手順

### サンプルの破碎およびホモジナイゼーション

1. Allprotect Tissue Reagentを使用する際には、Allprotect Tissue Reagent Handbook（日本語プロトコルあり）に記載されている組織安定化および組織破碎とホモジナイゼーション用のプロトコルに従った後、このプロトコルのステップ4に進む。Allprotect Tissue Reagentを使用しない場合、下のステップ2に進む。
2. 動物から組織サンプルを切除、あるいは保存していた組織を使用。サンプル組織の量を定める。30 mg以上使用しない。すぐにステップ3に進む。

組織の重量測定がスタートサンプルを一番正確に定量できる方法です。必要に応じて、組織を清潔な台上においてカットし、使用する切片の重量を測定します。組織をAllprotect Tissue Reagentで処理、瞬間凍結、あるいはステップ3で破碎とホモジナイゼーションを行なうまでは、採取した組織中のRNAとタンパク質は保護されていません。

凍結組織が操作中に解凍しないように注意してください。関連した操作はできるだけ迅速に行なってください。

注：残った新鮮な組織はAllprotect Tissue Reagentに入れDNA、RNA、タンパク質を安定化できます（Allprotect Tissue Handbookを参照、日本語プロトコルあり）。しかし、既に凍結した組織ではこの試薬内での融解がゆっくりすぎるため、試薬の組織への浸潤が迅速に行なわれず、RNAとタンパク質の分解を十分に防止することができません。

3. 3a、3b、3cあるいは3dに従って組織を破碎し、Buffer RLT（組織は30 mg以下を使用）中でライセートをホモジナイズする。

破碎およびホモジナイゼーションに関する詳細は英語版 Handbook 15 ページの “Disrupting and homogenizing starting material” を参照ください。

注：使用前にβ-MEをBuffer RLT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）。

注：不完全なホモジナイゼーションはRNA収量の著しい低下や、AllPrep DNAおよびRNeasy スピнкаラムの目詰まりの原因になります。TissueRuptorあるいはTissueLyserを用いたホモジナイゼーションの方が他の方法より核酸収量が一般的に増加します。しかしこれらのホモジナイザーを用いたホモジナイゼーションの時間が長いと、DNAの断片化が増加します。

表7. 組織破碎およびホモジナイゼーションに必要なBuffer RLT量

スタートサンプルの重量	Buffer RLTの容量
<20 mg	350 µlあるいは600 µl*
20 ~ 30 mg	600 µl

\* 安定化した組織や溶解しにくい組織には600 µlのBuffer RLTを用います。

### 3a. TissueRuptor を用いた破碎およびホモジナイゼーション：

- 組織を適切な大きさの容器に入れる。適切な量の Buffer RLT を添加する（表7参照）。

注：ホモジナイゼーション中に生じる可能性がある泡がこぼれないような容量を持つ最適な大きさの容器を使用します。

一般的にコニカルチューブよりも丸底チューブの方が効率的に破碎やホモジナイズを行なえます。

- TissueRuptor の使い捨てプローブのチップを容器に入れて、ライセートが均一になるまでTissueRuptorを最高速度で操作する（通常30秒）。ステップ4に進む。

注：TissueRuptor とディスポーザブル・プローブへの損傷を避けるため、サンプル破碎の際にプローブの先端がバッファーに確実に沈められていることを確認してください。

ホモジナイゼーションの際に気泡が生じることがあります。気泡が形成した場合には、ホモジネートを室温で2～3分放置し、泡が消えてから次のプロトコール・ステップに進みます。

### 3b. TissueLyser を用いた破碎およびホモジナイゼーション：

- 直径5 mmのステンレススチール製ビーズ1個が入った2 mlのマイクロ遠心チューブに組織を入れる。

新鮮あるいは凍結した組織サンプルを取り扱う際は、チューブをドライアイス上に置きます。

- チューブを室温にする。適切な量の Buffer RLT をチューブに迅速に添加する（表7参照）。

- TissueLyser Adapter Set 2 x 24 にチューブを入れる。

- TissueLyser にセットして 20 Hz で 2 分間破碎する。

時間は組織により異なりますが、組織が完全にホモジナイズされるまで破碎を継続します。

- 内側のコレクションチューブを外側に、外側のチューブを内側に置き換えます。TissueLyser にセットして 20 Hz でさらに 2 分間破碎する。

チューブの配置を換えることにより、均一なホモジナイゼーションが行なえます。

- ライセートを新しいマイクロ遠心チューブ（別途準備）にピペットで静かに入れる。ステップ4に進む。

ステンレススチール製ビーズは再使用しないでください。

3c. 乳鉢と乳棒を用いて破碎した後に QIAshredder ホモジナイザーでホモジナイゼーション：

- 重量測定した組織を迅速に液体窒素の中に入れて、乳鉢と乳棒を用いて細かい粉末にする。
- 粉末状の組織を液体窒素ごと、RNase フリーの液体窒素で冷却した 2 ml マイクロ遠心チューブ（別途準備）に移す。液体窒素を蒸発させるが、サンプルが解凍しないように注意する。
- 適切な量の Buffer RLT を添加する（表7参照）。
- 2 ml のコレクションチューブにセットした QIAshredder スピンカラムにライセートを直接ピペットで添加し、最高スピードで2分間遠心操作する。ステップ4に進む。

3d. 乳鉢と乳棒を用いて破碎した後に注射針とシリンジを用いてホモジナイゼーション：

- 計量した組織を迅速に液体窒素の中に入れて、乳鉢と乳棒を用いて細かい粉末にする。
- 粉末状の組織を液体窒素ごと、RNase フリーの液体窒素で冷却した 2 ml マイクロ遠心チューブ（別途準備）に移す。液体窒素を蒸発させるが、サンプルが解凍しないように注意する。
- 適切な量の Buffer RLT を添加し（表7参照）、20-G の注射針を取り付けた RNase フリーのシリンジ中にライセートを少なくとも5回通してホモジナイズする。ステップ4に進む。

4. ライセートを最高速度で3分間遠心する。ピペットで注意深く上清を採取し、2 ml のコレクションチューブ（付属品）にセットした AllPrep DNA スピンカラムに入れる。チューブの蓋を静かに閉めて、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で30秒間遠心操作する。

不溶性物質が非常に少量であるため3分間の遠心操作後にペレットが見えないサンプルもあります。

注：遠心操作後にカラムのメンブレン上に液体が残留していないことを確認します。必要に応じて、すべての液体がメンブレンを通過するまで同様に遠心操作を繰り返します。

5. AllPrep DNA スピンカラムを新しい 2 ml のコレクションチューブ（付属品）にセットし、室温（15 ~ 25 °C）あるいは 4 °C で保存した後に、ステップ 21 ~ 24 の DNA 精製に使用する。ステップ 6 ~ 13 の RNA 精製にはろ液を使用する。

注：AllPrep DNA スピンカラムを長期間室温あるいは 4 °C で放置しないでください。カラムを冷凍しないでください。

## トータルRNA精製

6. ステップ5からのろ液に、96 ~ 100%のエタノールを添加する：250  $\mu\text{l}$  (350  $\mu\text{l}$  のBuffer RLTを使用)あるいは430  $\mu\text{l}$  (600  $\mu\text{l}$  のBuffer RLTを使用)。ピペッティングにより混和する。遠心操作は行なわない。すぐにステップ7に進む。

ホモジナイズ - ションおよびAllPrep DNAスピнкаラムへのDNA結合ステップ中にライセート量が減少した場合には、その量に応じてエタノール量を調節してください。

注：エタノール添加後に沈殿物を生じることがありますが、これは本調製法に影響はありません。

7. 2 mlコレクションチューブ (添付) の中にセットしたRNeasyスピнкаラムに、最高700  $\mu\text{l}$  のサンプル (形成した沈殿物を含む) 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。ステップ14 ~ 20のタンパク質精製のために、2 mlチューブ (添付) にろ液\* を移す。

コレクションチューブはステップ8で再使用します。

サンプルが700  $\mu\text{l}$  以上の場合には、残りのサンプルを続けてRNeasyスピнкаラムにアプライし、上記の条件で遠心操作を行なってください。各遠心操作の後、ろ液を2 mlチューブ (添付) に移します。

8. 700  $\mu\text{l}$  のBuffer RW1をRNeasyスピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレン洗浄のために8,000 x g (10,000 rpm) 以上で15秒間遠心する。ろ液を棄てる。\*

コレクションチューブはステップ9で再使用します。

注：遠心操作後、RNeasyスピнкаラムがろ液と接触しないように気をつけて、カラムをコレクションチューブから取り除きます。コレクションチューブを完璧に空にします。

オプション：DNA含量の高い組織からRNAを精製する場合や感度の高いダウンストリームでRNAを使用する場合は、ステップ8の代わりに、ステップE1 ~ E4 (英語版 Handbook 50 ページ、Appendix E) のDNase分解を行なうことを推奨します。

9. RNeasyスピнкаラムに500  $\mu\text{l}$  のBuffer RPEを添加する。蓋を静かに閉め、スピнкаラム・メンブレン洗浄のために8,000 x g (10,000 rpm) 以上で15秒間遠心する。ろ液を捨てる。

コレクションチューブはステップ10で再使用します。

注：Buffer RPEは濃縮液でお届けします。使用前にエタノールを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)。

\* Buffer RLTや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。



10. RNeasy スピнкаラムに 500  $\mu$ l の Buffer RPE を添加する。チューブを静かに閉め、RNeasy スピнкаラム・メンブレンを洗浄するため、8,000 x g ( 10,000 rpm ) 以上で 2 分間遠心操作する。

RNA 溶出中にエタノールがキャリーオーバーしないように、長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥します。残留エタノールはダウンストリーム反応を妨害することがあります。

注：遠心操作後、RNeasy スピнкаラムがろ液と接触しないように気をつけて、カラムをコレクションチューブから取り除きます。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ます。

11. オプション：RNeasy スピнкаラムを新しい 2 ml コレクションチューブ（付属品）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

ステップ 10 の後 RNeasy スピнкаラムの外側にある液が残っている場合や Buffer RPE のキャリーオーバーの可能性を排除するためにこのステップを行ないます。

12. RNeasy スピнкаラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブ（付属品）にセットする。RNase フリー水 30 ~ 50  $\mu$ l を直接スピнкаラム・メンブレンに添加する。チューブを静かに閉め、8,000 x g ( 10,000 rpm ) 以上で 1 分間遠心操作を行ない、RNA を溶出する。

13. 予想した RNA 収量が 30  $\mu$ g 以上の場合には、さらに追加で 30 ~ 50  $\mu$ l の RNase フリー水を用いるか、ステップ 12 での溶出液を用いて（高濃度の RNA が必要な場合）ステップ 12 を再度行なう。ステップ 12 のコレクションチューブに溶出する。

ステップ 12 の溶出液を用いた場合の RNA 量は、RNase フリー水を 2 倍量用いて得られる量より 15 ~ 30 % 少なくなります。RNA の最終濃度は高くなります。

#### トータルタンパク質の沈殿

14. ステップ 7 からのろ液に同容量の Buffer APP（通常 600  $\mu$ l または 1,000  $\mu$ l）を添加する。激しく混和し、室温で 10 分間インキュベートしてタンパク質を沈殿させる。
15. 最高スピードで 10 分間遠心操作を行ない、上清を注意深くデカントで除去する。\*
16. 500  $\mu$ l のエタノール（70%）をタンパク質ペレットに添加する。最高速度で 1 分間の遠心操作を行ない、ピペットあるいはデカントによりできるだけ多くの上清を除去する。

ペレットを再懸濁したり、インキュベートする必要はありません。

\* Buffer RLT を含んだ上清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。

17. 室温で5～10分間タンパク質ペレットを乾燥させる。

注：乾燥が不十分だとエタノールが残存し、これによりタンパク質をゲルにアプライする際に問題が生じることがあります。

18. 最高100  $\mu$ lまでのBuffer ALOを添加し、激しく混和することによりタンパク質ペレットを溶解する。

注：使用前にDTTをBuffer ALO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）。

添加するBuffer ALOの量は、スタートサンプル量により異なります。様々なスタートサンプルから精製した一般的なタンパク質量はTable 2に掲載しています（英語版Handbook 14ページ）。

Buffer ALOは、SDS-PAGEで使用するLaemmli類似のサンプルバッファーであり、プロモフェノール・ブルー色素を含んでいます。タンパク質をSDS-PAGEで解析しない場合には、目的のダウンストリーム・アプリケーションで使用可能なバッファーでペレットを溶解します。

RNaseやプロテアーゼの不活化に必要なBuffer RLTを用いた強力な変性条件のために、沈殿タンパク質の溶解度低下が見られることがあります。数分間ボルテックスするか、ピペットで数回アップダウンしてペレットを溶解します。

溶解しやすくする目的で、あるいはSDS-PAGEを行なう前にタンパク質の定量が必要な場合は、ペレットを5% (w/v) SDSあるいは8 M尿酸で溶解します。タンパク質の定量に関する詳細は英語版Handbook 52ページのAppendix Fを参照してください。

タンパク質の溶解に伴いBuffer ALOが黄色くなることがありますが、ダウンストリーム・アプリケーションには影響しません。本バッファーはSDS-PAGEサンプルバッファーで再び青くなります。自分で調製したサンプルバッファーのストック溶液を使用する場合は（例えば5倍に濃縮）、タンパク質サンプルをゲルにアプライした際にサンプルバッファーの濃度が1xになるように適宜希釈します。

19. タンパク質を完全に溶解し、変性するために95 °Cで5分間インキュベートする。サンプルを室温まで冷やす。
20. 最高速度で1分間遠心操作して、残った不溶性物質をペレット化する。SDS-PAGEやウエスタンブロットなどのダウンストリーム・アプリケーションで上清を使用する。

溶解したタンパクは-20 °Cで数ヶ月、4 °Cで数日間保存可能です。

## ゲノムDNA精製

21. ステップ5からのAllPrep DNA スピнкаラムに500  $\mu$ lのBuffer AW1を添加する。  
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。ろ液を棄てる。\*  
ステップ22でスピнкаラムを再使用します。  
注：Buffer AW1は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW1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）。
22. 500  $\mu$ lのBuffer AW2をAllPrep DNA スピнкаラムに添加する。蓋を静かに閉め、最高速度で2分間遠心操作し、スピнкаラム・メンブレンを洗浄する。  
注：Buffer AW2は濃縮液でお届けします。使用前にエタノールをBuffer AW2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）。  
長時間の遠心操作でスピнкаラム・メンブレンを乾燥することにより、DNA溶出中にエタノールがキャリアオーバーしないようにします。残留エタノールはダウンストリーム反応を妨害することがあります。  
注：遠心操作後、コレクションチューブからAllPrep DNA スピнкаラムを注意して取り除いてください。カラムがろ液と接触した場合には、コレクションチューブを空にしてスピнкаラムを最高速度で1分間、再度遠心操作します。
23. AllPrep DNA スピнкаラムを新しい1.5 mlのコレクションチューブ（付属品）に移す。100  $\mu$ lのBuffer EBを直接スピнкаラム・メンブレンに添加し、カラムの蓋を静かに閉る。室温（15 ~ 25 °C）で1分間インキュベートし、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で1分間遠心操作してDNAを溶出する。
24. ステップ23を繰り返し、さらにDNAを溶出する。  
最初のDNA溶出液の希釈を防ぐには、新しい1.5 mlのコレクションチューブ（別途準備）を用いて2回目のDNA溶出液を回収します。1回目と2回目のDNA溶出液を一緒にする際には、ステップ23で用いたコレクションチューブを再利用します。  
注：より高濃度のDNAを得るためには50  $\mu$ lのBuffer EBで2回溶出します。この場合には最終DNA収量は低下します。

\* Buffer AW1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。

# トラブルシューティングガイド

## コメント

---

### AllPrep DNAあるいはRNeasy スピнкаラムが目詰まり

- a) 不完全な破碎および/  
あるいはホモジナイ  
ゼーション
- 破碎およびホモジナイゼーション法の詳細は“ Disrupting and homogenizing starting material ”(英語版 Handbook15ページ)を参照する。  
必要に応じて遠心速度と遠心時間を増加する。  
今回の調製ではスタート・サンプル量を減らす(2および11ページ、プロトコル参照)。またはホモジナイゼーション時間を延長する。
- b) スタートサンプル量が  
多すぎる
- スタートサンプル量を減らす。正確なサンプル量で実験を始めることが重要である(英語版 Handbook 12ページ参照)。
- c) 遠心温度が低すぎる
- 遠心温度は20 ~ 25 にする。20 に設定しても遠心時に20 以下になる遠心機もある。これがスピнкаラムの目詰りをおこす沈殿物を形成する原因となる。このような場合には遠心機を25 に設定する。AllPrep DNAスピнкаラムにライセートを入れる前に、37 でライセートを温める。

### 核酸収量が低い

- a) 不完全な破碎とホモジ  
ナイゼーション
- 破碎およびホモジナイゼーション法の詳細は“ Disrupting and homogenizing starting material ”(英語版 Handbook15ページ)を参照する。  
今回の調製ではスタート・サンプル量を減らす(2および11ページ、プロトコル参照)。溶解バッファーを増やしホモジナイゼーション時間を延長する。
- b) スタートサンプル量が  
多すぎ
- スピнкаラムへのオーバーロードは核酸収量を顕著に低下させる。スタート・サンプル量を減らす(英語版 Handbookの12ページ参照)。
- c) RNAがRNeasy スピ  
ンカラムメンブレンに  
まだ結合
- RNA溶出を再度行なうが、RNaseフリー水をRNeasy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。

## コメント

---

- d) DNAがAllPrep DNA スピнкаラムにまだ結合している DNA 溶出を再度行なうが、遠心操作前に Buffer EB を AllPrep DNA スピнкаラムに入れて実験台上で 10 分間インキュベートする。  
または、DNA 溶出前に Buffer EB を 70 °C に加熱する。
- e) エタノールの混入 Buffer RPE で二回目の洗浄を行なう際に、RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥するために 8,000 x g (10,000 rpm) 以上で 2 分間 (20 ~ 25 °C) 必ず遠心する。  
カラムの外側になる液が付着している場合には、必ずオプションの遠心操作を行ない、RNeasy スピнкаラム・メンブレンを乾燥させる(プロトコールのステップ 11)。
- f) 細胞培養液の除去が不完全 (細胞サンプルの場合) 培養細胞を調製する際は、細胞回収後に培養液を完全に除去する (2 ページ、プロトコール参照)。

### DNA に RNA が混入している

- a) AllPrep DNA スピнкаラムに入れたライセートがエタノールを含む AllPrep DNA スピнкаラムを通過させた後にライセートにエタノールを添加する。
- b) サンプルがホモジネート溶液の pH に影響 最終的なホモジネート溶液の pH は 7 であるべきである。  
サンプルが極端にアルカリあるいは酸性でないことを確認する。

### DNA が RNA に混入し、ダウンストリーム実験に影響する

- a) 細胞数が多いすぎる ある種の細胞タイプでは、処理する細胞数が多いすぎると AllPrep DNA スピнкаラムへの DNA 結合効率が低下することがある。溶出した RNA に DNA が混入している場合には、細胞数を減らして調製してみる。
- b) 細胞培養液あるいは安定化試薬の除去が不完全 細胞培養液あるいは安定化試薬が完全に除去され、溶解バッファーが希釈されていないことを確認する。溶解バッファーが希釈されると AllPrep DNA スピнкаラムは効果的に DNA を結合しない。

## コメント

- c) 組織が多量のDNAを含む
- DNA含量の非常に高いある種の組織（例えば脾臓）では、DNAがAllPrep DNAスピнкаラムを通過することがある。サンプル量を減らして再度行なう。あるいは、RNeasyスピнкаラム・メンブレン上でDNase分解を行なう（英語版 Handbook 50ページ、Appendix E参照）あるいは溶出したRNAのDNase分解後、続いてRNAクリーンアップする。

### RNA溶出液の $A_{260}/A_{280}$ 値が低い

- $A_{260}/A_{280}$ の測定用にRNAを水で希釈
- 純度を測定する前のサンプルの希釈にはRNaseフリー水ではなく、10 mM Tris-Cl、\*pH 7.5を使用する（英語版 Handbook 43ページ、Appendix B参照）。

### RANが分解

- a) スタート・サンプルの不適切な取り扱い
- 組織サンプルがAllprotect Tissue Reagentあるいは、RNA<sup>later</sup> RNA Stabilization Reagent中で適切に安定化され保存されたことを確認する。
- 凍結細胞ペレットあるいは凍結組織サンプルは、液体窒素中で瞬間凍結し、-70 で保存する。AllPrep DNA/RNA/Protein操作は迅速に行なう（特に最初の数ステップは重要）。
- Appendix A（英語版 Handbook 41ページ）および“Handling and storage of starting material”（英語版 Handbook 14ページ）を参照。
- b) RNaseの混入
- 全てのAllPrepバッファは試験済みでRNaseフリーであることが保証されているが、RNaseは使用中に混入することがある。AllPrep DNA/RNA/Proteinでの操作および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 41ページのAppendix Aを参照する。

化学薬品を取り扱う際には、適切な実験着と使い捨て手袋、保護用眼鏡を着用してください。詳細は製品メーカーの相当するMSDS (material safety data sheet) をご覧ください。

## DNAの切断化

ホモジナイゼーション  
条件が激しすぎる

精製DNAの長さ（一般的には15～30 kb）はホモジナイゼーション条件に依存する。より長いDNAフラグメントが必要な際は、できる限りホモジナイゼーション時間を短くし、緩和な条件を使用する（例；ローター/ステーター方式ホモジナイザーの代わりにQIAshredderホモジナイザーを使用）。

核酸濃度が低すぎる

溶出量が多すぎた

より少量で核酸を溶出する。AllPrep DNA スピニングカラムでは50 µl以上のBuffer EB、RNeasyスピニングカラムでは30 µl以上のRNaseフリー水を使用する。より少量で溶出すると核酸濃度は増加するが、収量は低下することがある。

核酸を用いたダウンストリーム実験で良い結果がでない

a) 塩が溶出液に混入

バッファーは必ず20～30 で使用する。

操作中の各ステップで正しいバッファーを使用したことを確認する。

洗浄ステップ中にコレクションチューブを再利用する際は、きれいなペーパータオル上でチューブを叩き、チューブの縁に付着した残りのろ液を除去する。

b) エタノールの混入

Buffer RPEによる二回目の洗浄では、8,000 x g (10,000 rpm) 以上で2分間 (20～25 ) 遠心操作し、必ずRNeasyスピニングカラム・メンブレンを乾燥させる。遠心操作後、カラムがろ液と接触しないように気をつけて、カラムをコレクションチューブから取り除く。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。

カラムの外側にろ液が付着している場合には、必ずオプションの遠心操作を行ない、RNeasyスピニングカラム・メンブレンを乾燥させる(プロトコルのステップ11)。

## コメント

---

ウエスタンブロットあるいはCoomassie® 染色ゲルでタンパク質が観察されない

- a) タンパク質ペレットを紛失      タンパク質沈殿操作で、タンパク質ペレットはチューブの内壁に弱く付着している。上清を注意深くデカントで除去する。
- b) タンパク質ペレットが完全に溶解していない      タンパク質沈殿操作では、タンパク質ペレットを Buffer ALO または 1x SDS-PAGE サンプルバッファーで完全に溶解する。
- 更にタンパク質を溶解しやすくする目的で、ペレットを 5% (w/v) SDS あるいは 8 M 尿酸で溶解する。

SDS-PAGE ゲルあるいはウエスタンブロットでのタンパク質のバンドがジグザグ型あるいはスメア状を示す

- タンパク質サンプルが不溶性物質を含む      不溶性物質はゲルの泳動を妨害することがある。タンパク質沈殿操作のステップ 19 および 20 を繰り返し、不溶性物質がダウンストリーム・アプリケーションに混入しないようにする。









Trademarks: QIAGEN®, AllPrep®, DNeasy®, QuantiTect®, RNeasy® (QIAGEN Group). Coomassie® (ICI (Imperial Chemical Industries) Organics Inc.).

\*RNAlater® is a trademark of AMBION, Inc., Austin, Texas and is covered by various U.S. and foreign patents.

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

© 2007 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp)

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

