

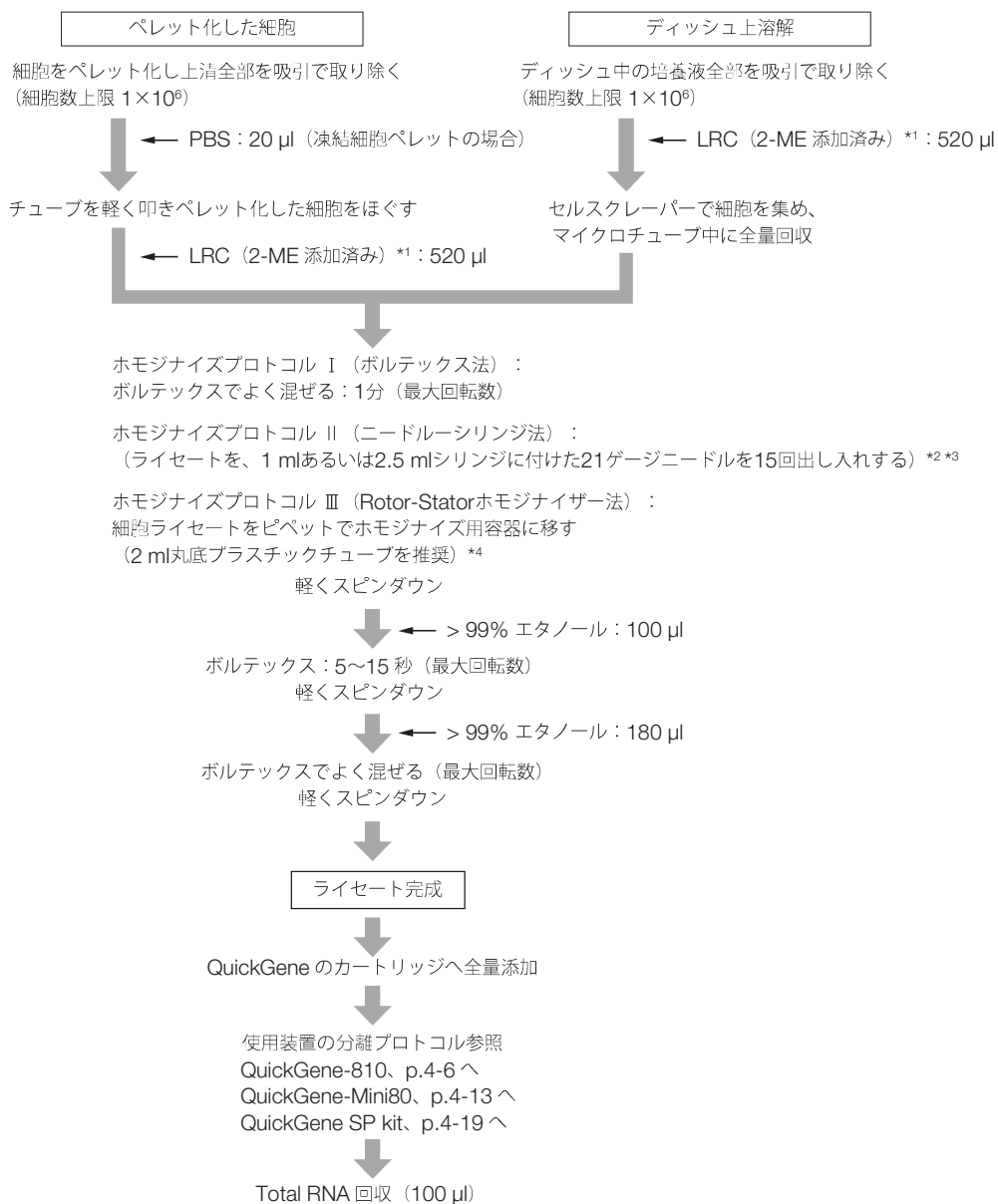
## 3-XVII 章

### 培養細胞からの total RNA分離

---

## COS-7 培養細胞からの total RNA分離 (～1×10<sup>6</sup>個)

### プロトコル



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を、使用前毎に必ず LRC に加えてください。  
1ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加えます。

\*2 サンプルの泡立ちを防ぐために空気の混入を避けてください。

\*3 感染性のサンプルを御使用の際は、ニードルの扱いには十分注意してください。

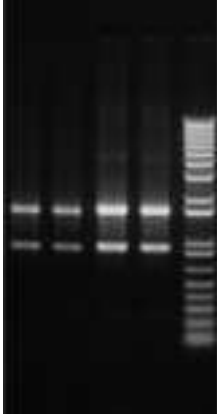
\*4 ホモジナイズ  
条件例: 20,000 rpm、30 秒、2 回、  
5 mm あるいは 7 mm プロブ使用。

## 結果

### 電気泳動図

COS-7 (1 ウエル / 6- ウエル プレート (3.5 cm ディッシュプレート)、6 cm ディッシュ)

1 2 3 4 M



1,2 : 1 ウエル / 6- ウエル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート)、  
ホモジナイズプロトコル II  
3,4 : 6 cm ディッシュ、ホモジナイズプロトコル III  
M : Ready Load 1kb Plus DNA Ladder : Invitrogen

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	収量 (μg)
COS-7	$0.3 \times 10^6$	II	13.6
	$0.8 \times 10^6$	III	34.4

### タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			タンパク質の混入 A260/280
COS-7	$0.3 \times 10^6$	II	2.19
	$0.8 \times 10^6$	III	1.96

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			カオトロピック塩の混入 A260/230
COS-7	$0.3 \times 10^6$	II	2.19
	$0.8 \times 10^6$	III	2.17

### その他

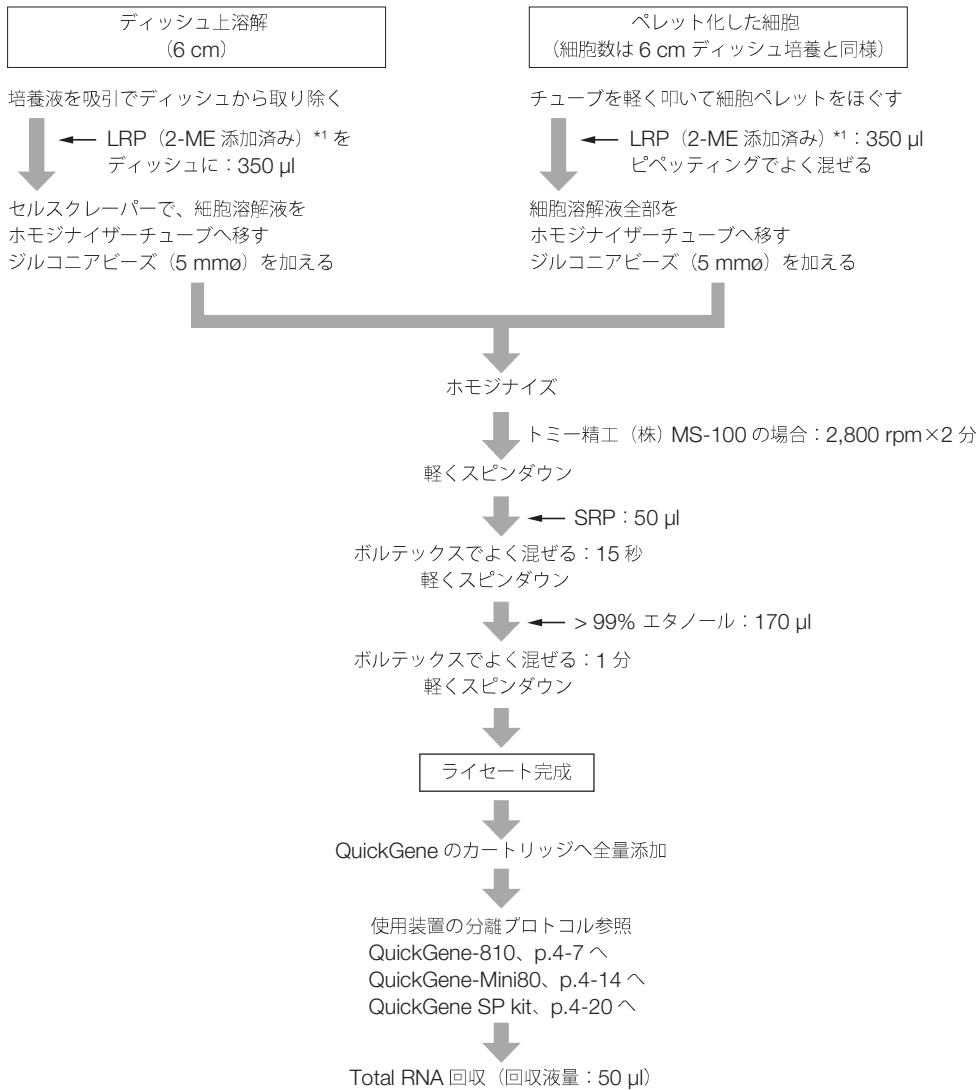
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HEK293 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 NIH/3T3 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)

# COS-7 培養細胞からの total RNA分離 (6 cmあるいは10 cmディッシュ)

## プロトコル A



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ずLRPに加えてください。  
1 mlのLRP当たり10 μlの2-MEを加えます。

## 結果

接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいは 6 cm ディッシュ上のペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

### ■ 電気泳動図

データなし

### ■ Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )	
		QuickGene	スピニング法 (A 社)
COS-7	1.0	42.3	51.4

### ■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

### ■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

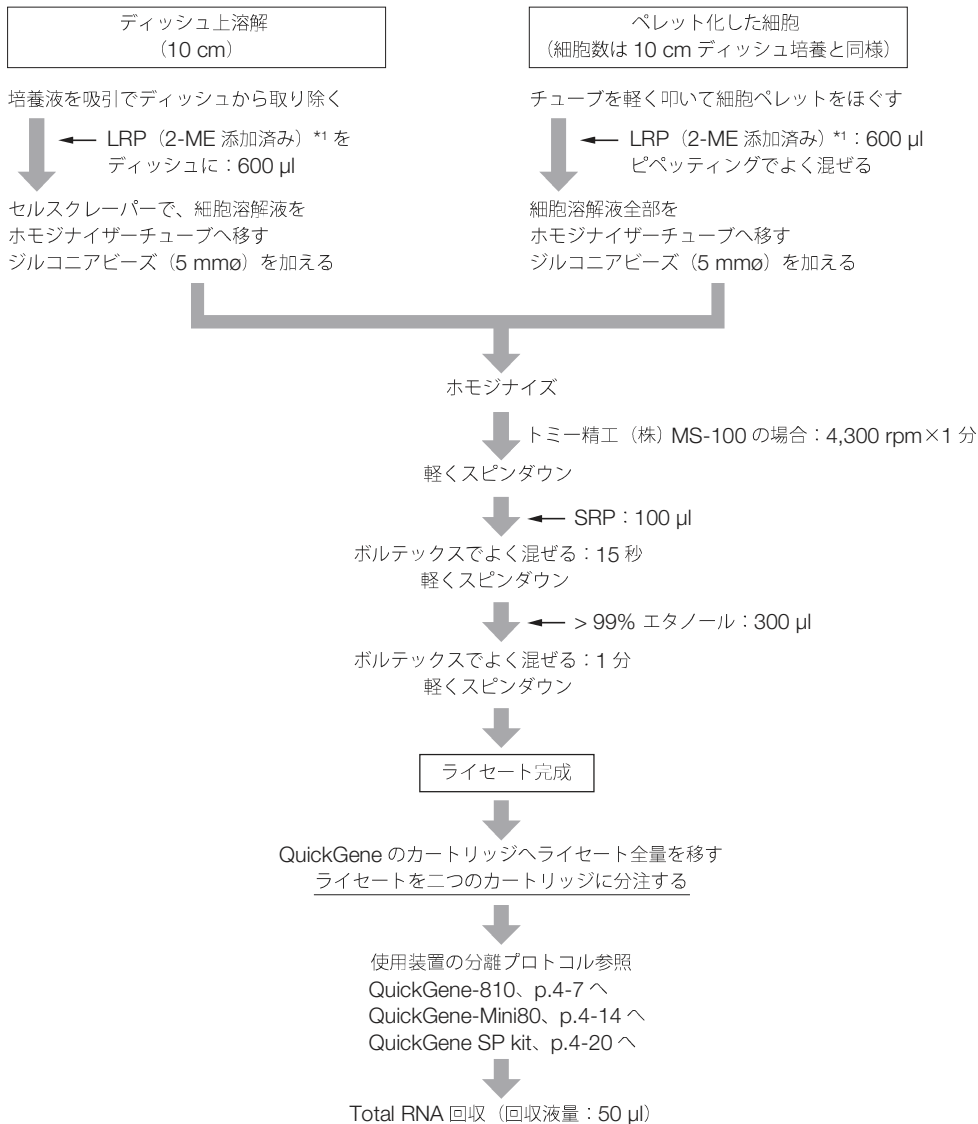
### ■ その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10cm ディッシュ)、培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル B



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

## 結果

接着細胞を 10 cm ディッシュで直接溶解するか、あるいは 10 cm ディッシュ上のペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
COS-7	2.5	104.2	98.2	90.0	79.0

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンプロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
COS-7	2.5	2.12	1.97	2.12	2.05

QuickGene システムを用いて、タンパク質の混入の少ない高純度 total RNA の分離ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
COS-7	2.5	2.11	2.03	1.94	2.19

QuickGene システムを用いて、カオトロピック塩の混入の少ない高純度 total RNA の分離ができた。

### その他

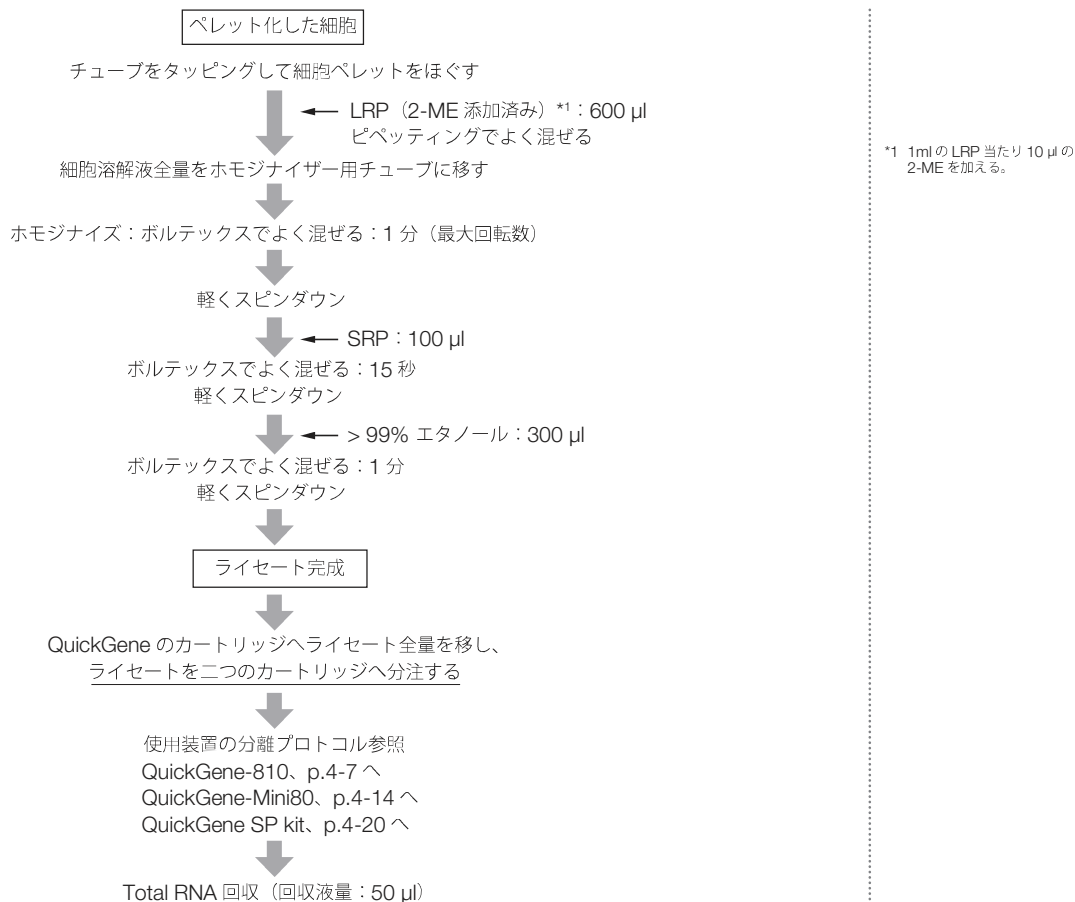
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## ES 培養細胞からの total RNA分離

### プロトコル



### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

ES 細胞数	収量 (µg)
$2 \times 10^6$	41.4 (カートリッジ 2 本分)

#### タンパク質の混入: A260/280

ES 細胞数	A260/280
$2 \times 10^6$	2.1

#### カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

#### その他

データなし

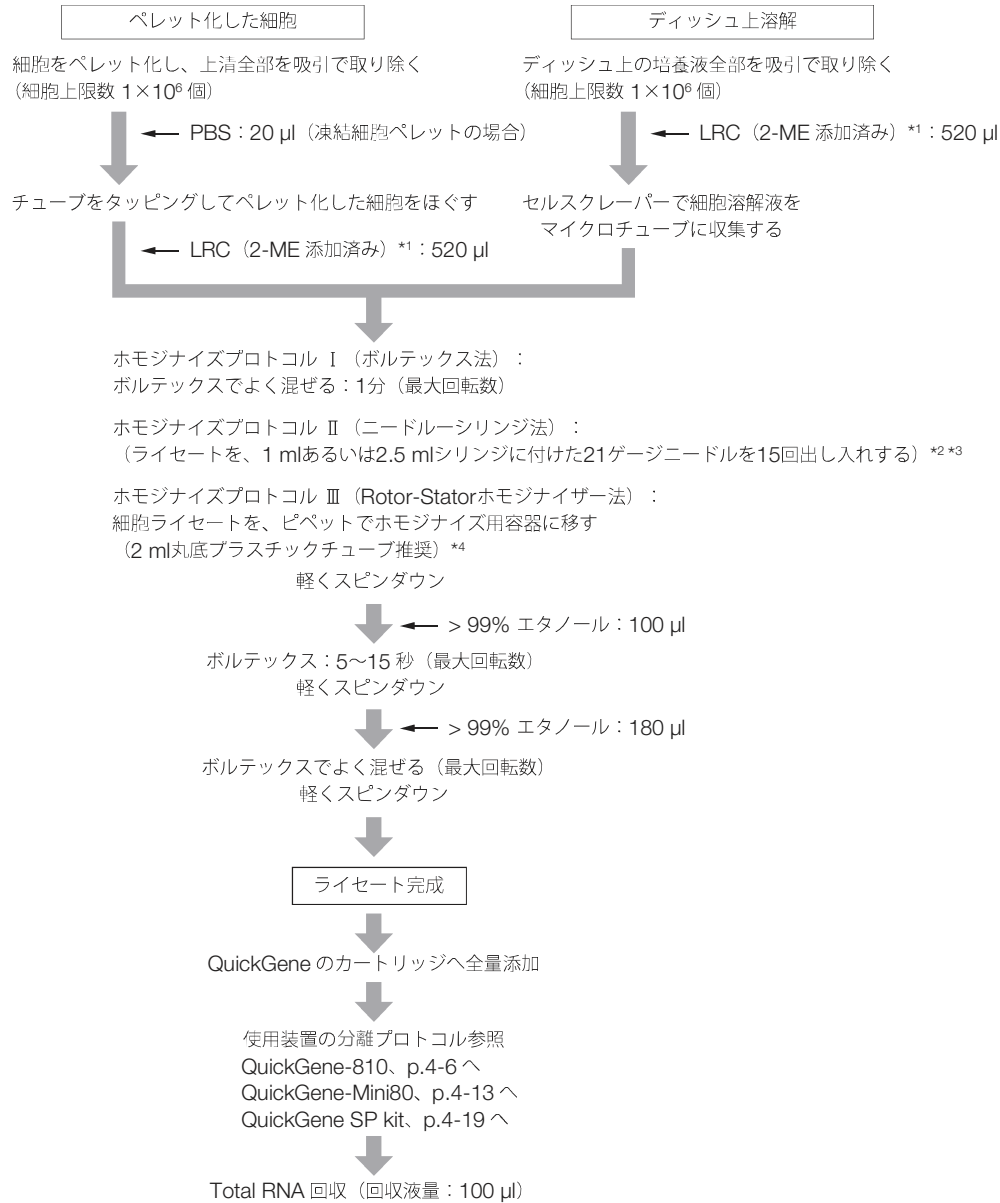
### 共通プロトコルサンプル

データなし



HEK293 培養細胞からの total RNA分離 (~1×10<sup>6</sup>個)

## ■ プロトコル



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用時毎に必ずLRCに加えてください。  
1mlのLRCあたり10µlの2-MEを加える。

\*2 サンプルの泡立ちを防ぐために空気の混入を避けてください。

\*3 感染性のサンプルを御使用の際は、ニードルの取扱いには十分注意してください。

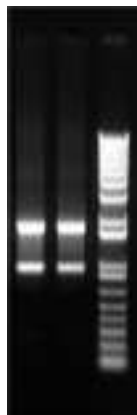
\*4 ホモジナイズ条件例: 20,000 rpm、30 秒、2 回 5 mm あるいは 7 mm プローブ使用。

## 結果

### 電気泳動図

HEK293 (1 ウエル / 6- ウエル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート))

1 2 M



1,2 : ホモジナイズ プロトコル II

M : Ready-Load 1kb Plus DNA Ladder : Invitrogen

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	収量 (μg)
HEK293	$2.1 \times 10^6$	II	30.4

### タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			タンパク質の混入 A260/280
HEK293	$2.1 \times 10^6$	II	2.27

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			カオトロピック塩の混入 A260/230
HEK293	$2.1 \times 10^6$	II	2.14

### その他

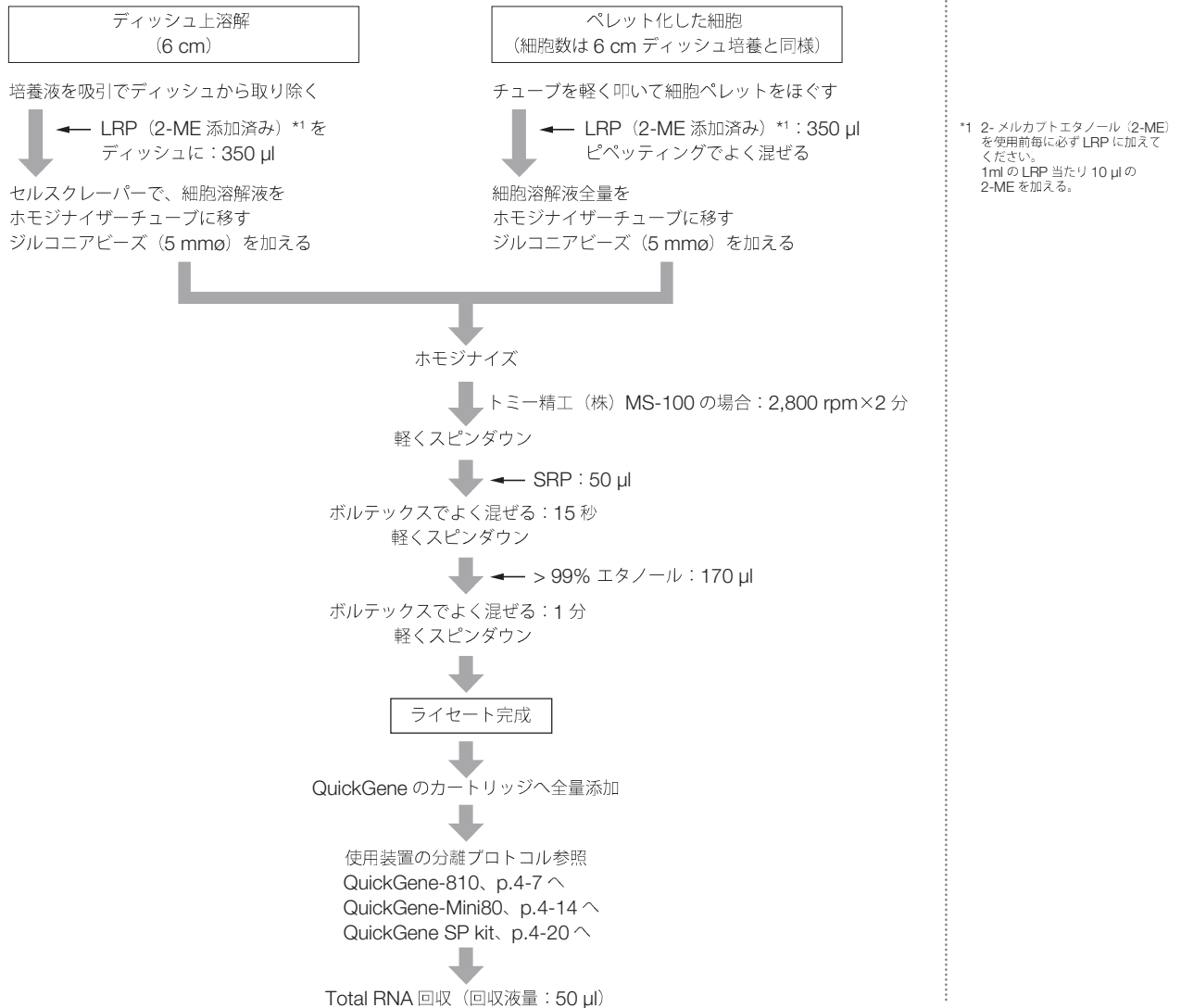
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 COS-7 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HeLa 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 NIH/3T3 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)

## HEK293培養細胞からのtotal RNA分離(6 cmあるいは10 cmディッシュ)

## プロトコル A



## 結果

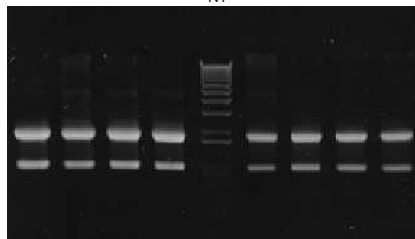
接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して、total RNA を分離した。

### 電気泳動図

非変性ゲル電気泳動 (1% アガロース / 1 × TAE 緩衝液)

HEK293 (5 × 10<sup>6</sup> 個)

QuickGene                      スピнкаラム法 (A 社)  
 DNase (+) DNase (-)    M    DNase (+) DNase (-)



M : マーカー (1Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	収量 (μg)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HEK293	5.0	79.1	57.5

### タンパク質の混入 : A260/280

データなし

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

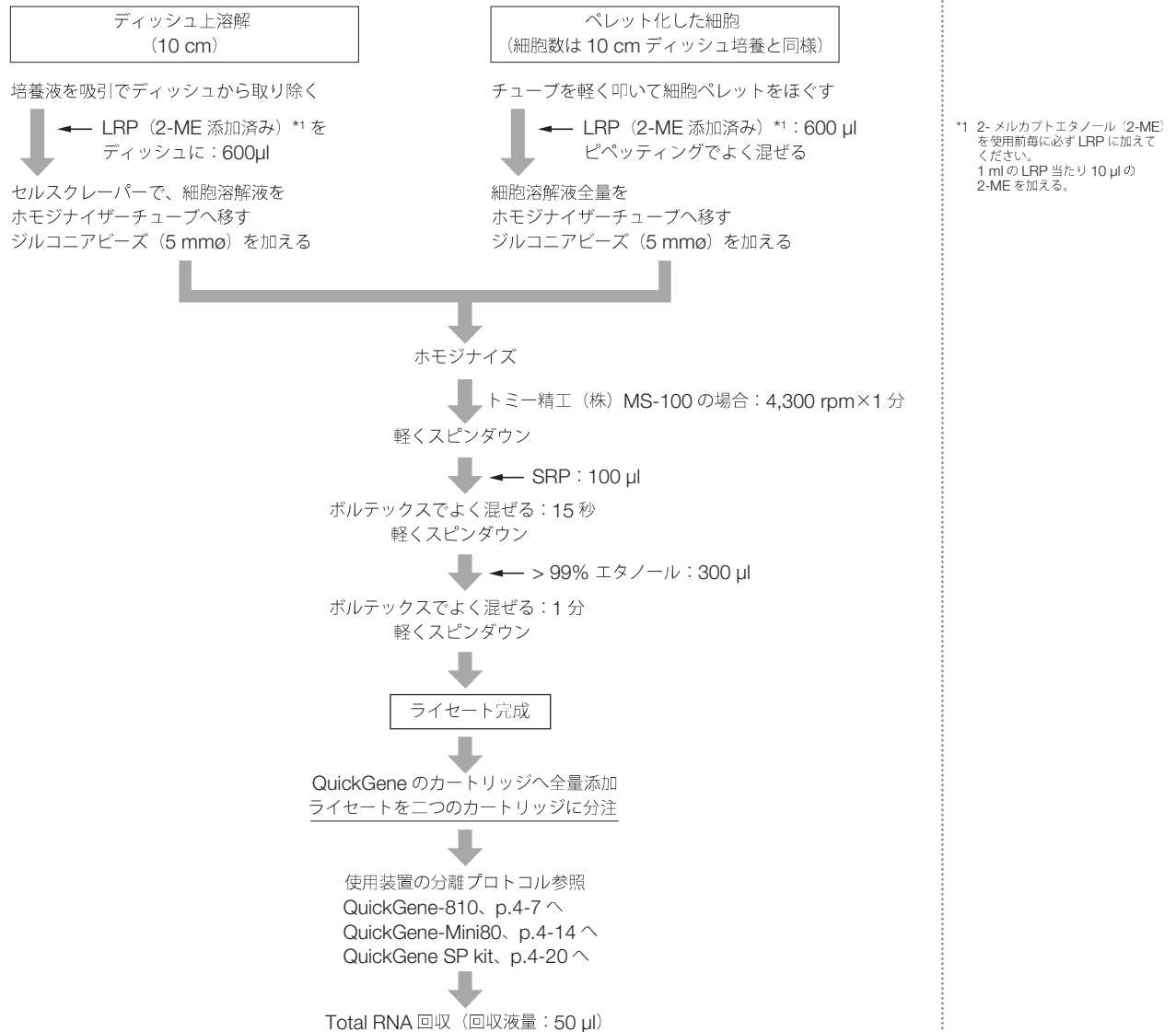
### その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

細胞 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル B



## 結果

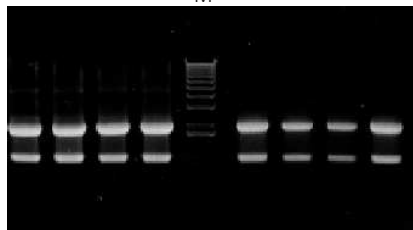
接着細胞を直接 10 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

### 電気泳動図

非変性ゲル電気泳動 (1% アガロース / 1 × TAE 緩衝液)

HEK293 (10 cm ディッシュ)

QuickGene                      スピнкаラム法 (A社)  
DNase (+) DNase (-) M      DNase (+) DNase (-)



M : マーカー (1Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	収量 (μg)			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A社)
HEK293	5.0-8.0	175.3	92.2	160.3	101.0

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンプロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入 : A260/280

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A社)
HEK293	5.0-8.0	2.29	2.11	2.27	2.11

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A社)
HEK293	5.0-8.0	2.12	2.16	2.11	2.18

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

### その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル B'

ディッシュ上で溶解 (8×10<sup>6</sup> 個以上の細胞がある 10 cm ディッシュ)

培養液を吸引でディッシュから取り除く



← LRP (2-ME 添加済み) \*1 をディッシュに : 800 µl

セルスクレーパーで、細胞溶解液をホモジナイズ用チューブに移す  
ジルコニアビーズ (5 mmφ) を加える



ホモジナイズ



トミー精工 (株) MS-100 の場合 : 4,300 rpm×1 分

軽くスピンドウン



← SRP : 100 µl

ボルテックスでよく混ぜる : 15 秒  
軽くスピンドウン



← > 99% エタノール : 300 µl

ボルテックスでよく混ぜる : 1 分  
軽くスピンドウン



ライセート完成



QuickGene のカートリッジへライセート全量に移す  
ライセートを二つのカートリッジに分注



使用装置の分離プロトコル参照  
QuickGene-810、p.4-7 へ  
QuickGene-Mini80、p.4-14 へ  
QuickGene SP kit、p.4-20 へ



Total RNA 回収 (回収液量 : 50 µl)

\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

## 結果

QuickGene システム (QuickGene および QuickGene RNA cultured cell HC kit S) およびスピнкаラム法 (A 社) を用いて、培養細胞 HEK293 から total RNA を分離した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A company)
HEK293	12.0	149.5	133.1	94.9	102.3

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンブロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HEK293	12.0	1.95	2.04	1.98	2.02

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HEK293	12.0	2.14	2.14	1.88	2.17

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

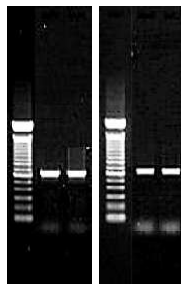
### その他

#### • RT-PCR (DNase 処理あり)

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて分離した total RNA (10 pg/ $\mu\text{l}$  あるいは 1pg/ $\mu\text{l}$ ) 中の  $\beta$ -actin mRNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。

HEK293 (12  $\times 10^6$  個の細胞)

10pg/ $\mu\text{l}$     1pg/ $\mu\text{l}$   
M 1 2    M 1 2



M : マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)

1 : QuickGene

2 : スピнкаラム法 (A 社)

Total RNA (1pg/ $\mu\text{l}$ ) で行った RT-PCR に対して、増幅産物に似た電気泳動バンドが両方のキットで検出された。

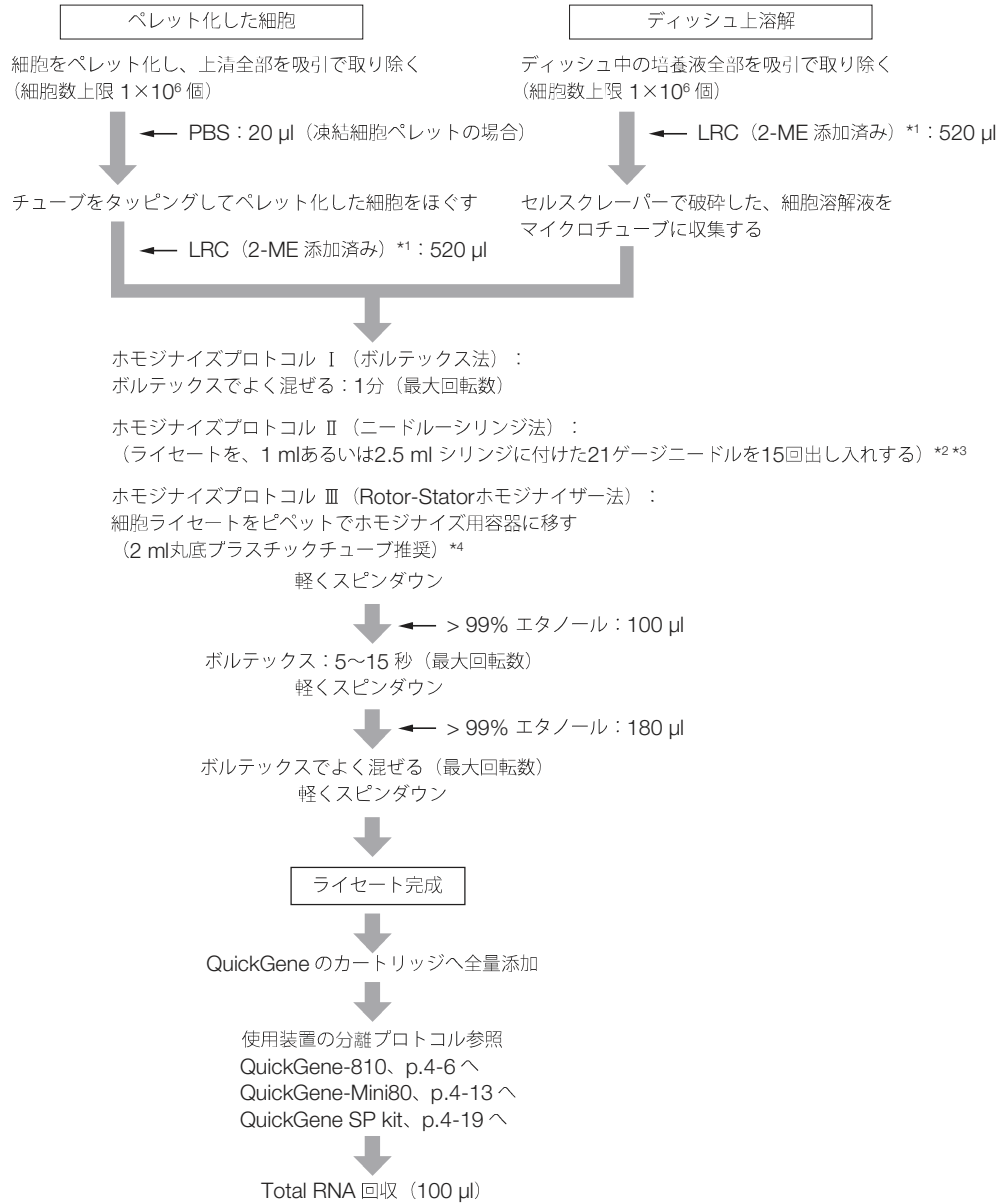
## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)



HeLa 培養細胞からの total RNA分離 (～1×10<sup>6</sup>個)

## プロトコル



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRC に加えてください。  
1 ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

\*2 サンプルの泡立ちを防ぐために空気の混入を避けてください。

\*3 感染性のサンプルを御使用の際は、ニードルの取扱いには十分注意してください。

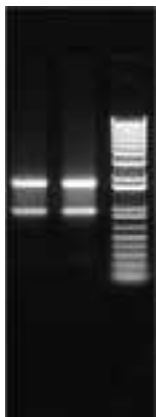
\*4 ホモジナイズ条件例: 20,000 rpm、30 秒、2 回 5 mm あるいは 7 mm プローブを使用。

## 結果

### 電気泳動図

HeLa (1 ウェル / 6- ウェル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート))

1 2 M



1,2 : ホモジナイズ プロトコル II

M : Ready Load 1kb Plus DNA Ladder : Invitrogen

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	収量 (μg)
HeLa	$1.2 \times 10^6$	II	28.1

### タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			タンパク質の混入 A260/280
HeLa	$1.2 \times 10^6$	II	2.28

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			カオトロピック塩の混入 A260/230
HeLa	$1.2 \times 10^6$	II	2.21

### その他

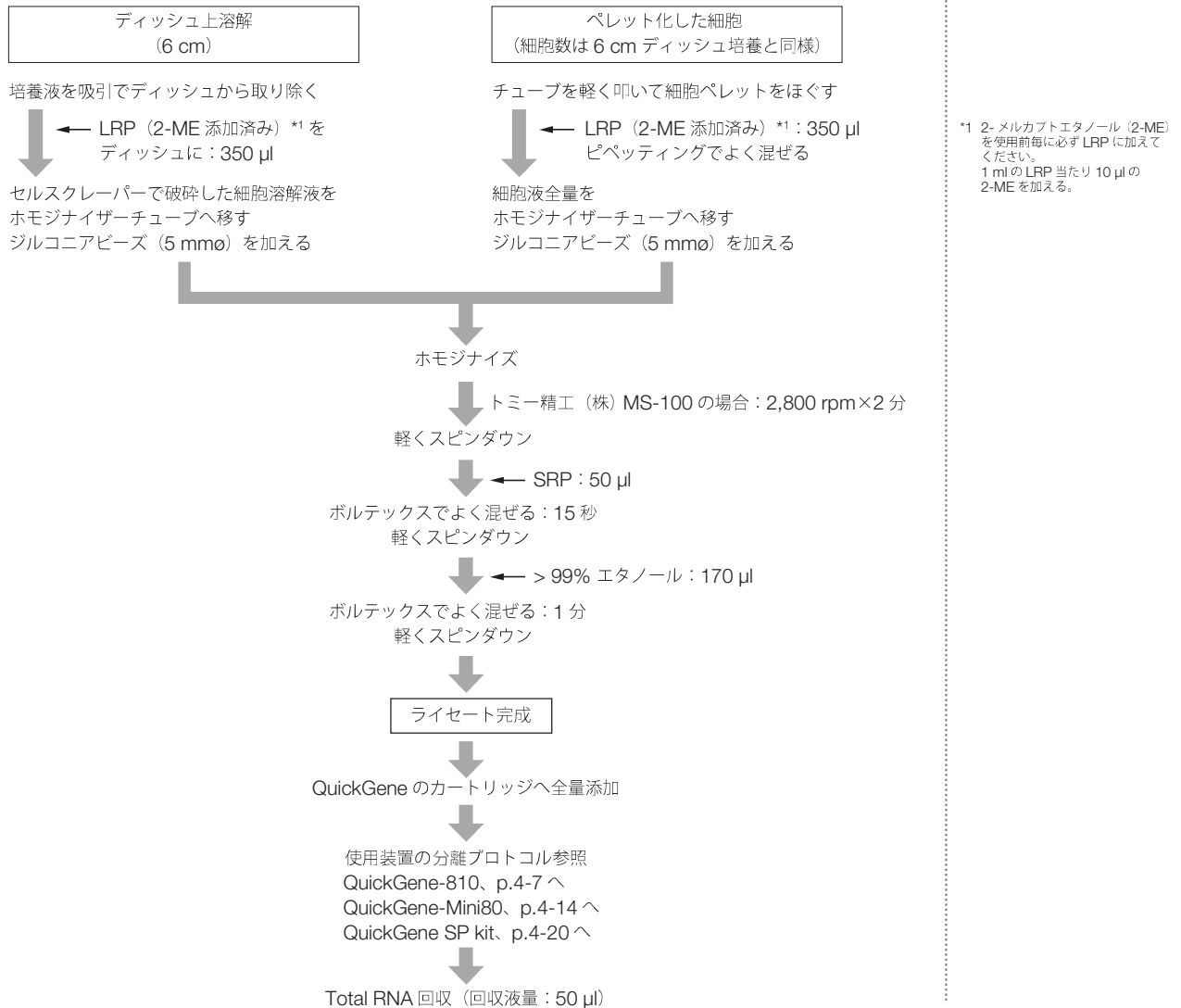
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 COS-7 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HEK293 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 NIH/3T3 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)

## HeLa 培養細胞からのtotal RNA分離(6 cmあるいは10 cmディッシュ)

## プロトコル A



## 結果

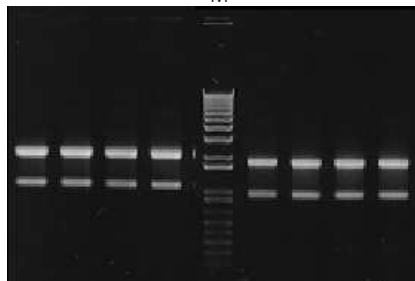
接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

### 電気泳動図

非変性ゲル電気泳動 (1% アガロース / 1 × TAE 緩衝液)

HeLa (2 × 10<sup>6</sup> 個の細胞)

QuickGene                      スピнкаラム法 (A 社)  
DNase (+) DNase (-)    M    DNase (+) DNase (-)



M : マーカー (1Kb Plus DNA Ladder : Invitrogen)

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	収量 (μg)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HeLa	2.0	47.2	46.1

### タンパク質の混入 : A260/280

データなし

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

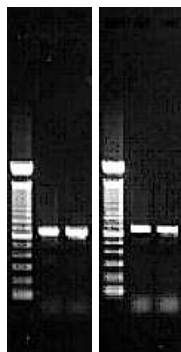
### その他

#### • RT-PCR (DNase 処理あり)

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて分離した total RNA (10pg/μl あるいは 1pg/μl) 中の β -actin mRNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。

HeLa (6 cm ディッシュ)

10pg/μl    1pg/μl  
M 1 2    M 1 2



M : マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)

1 : QuickGene

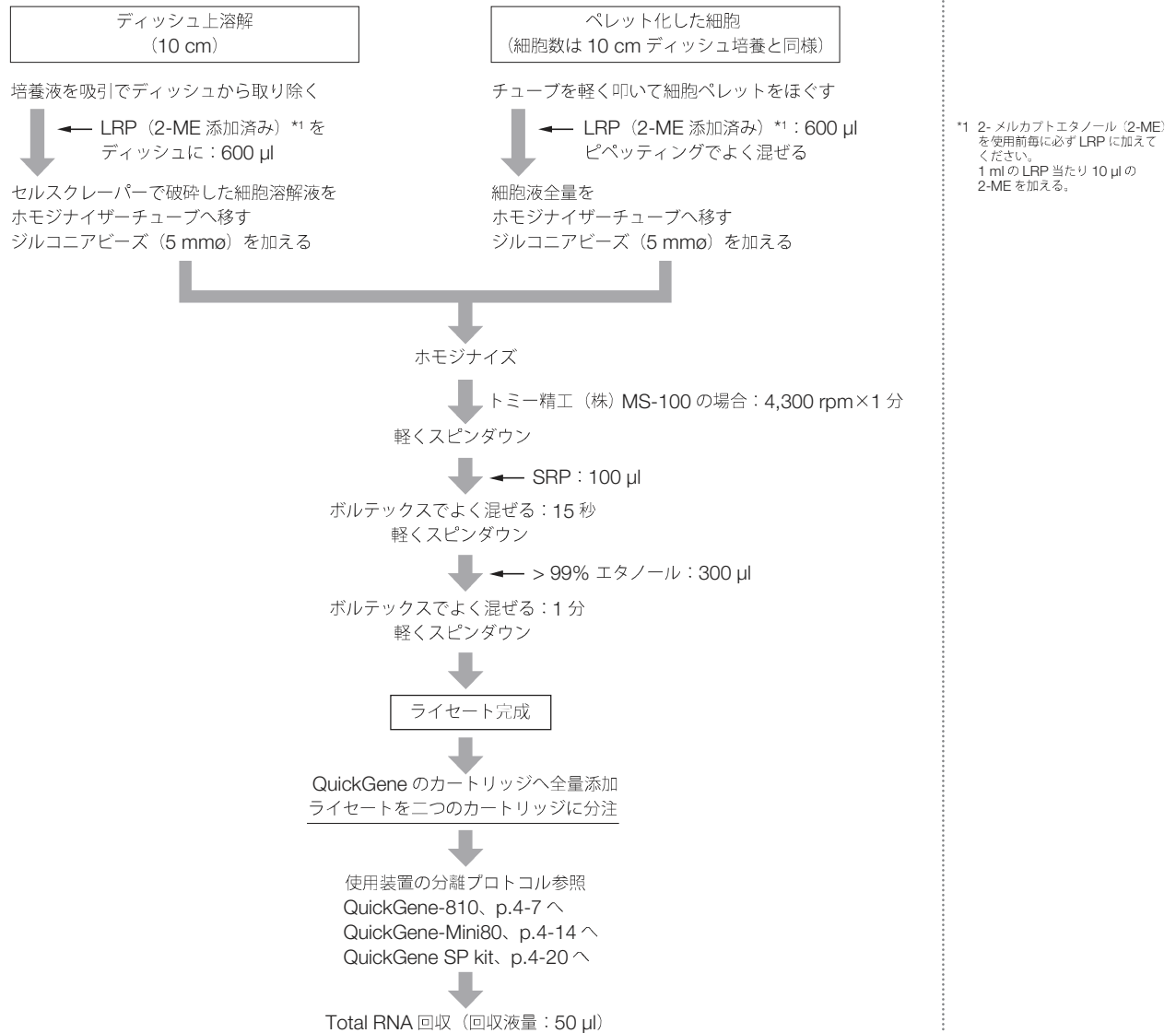
2 : スピнкаラム法 (A 社)

N : ネガティブコントロール

## 共通プロトコルサンプル

培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

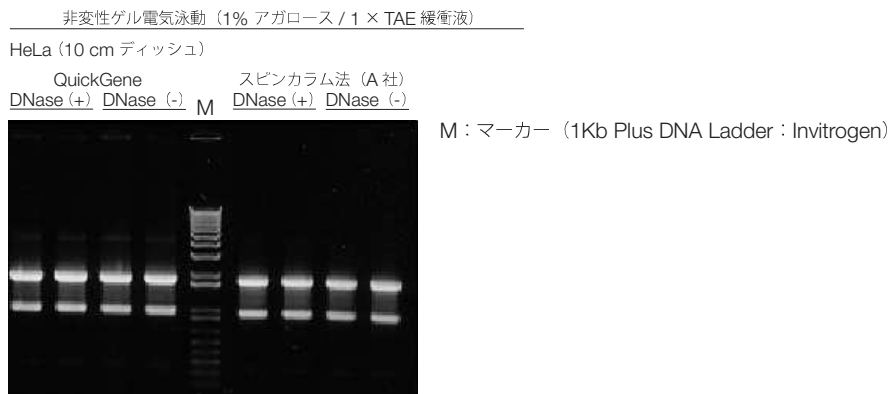
## プロトコル B



## 結果

接着細胞を直接 10 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

### 電気泳動図



### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HeLa	5.0	129.0	115.7	122.0	104.0

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HeLa	5.0	2.20	1.99	2.20	2.02

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HeLa	5.0	2.18	2.10	2.05	2.12

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

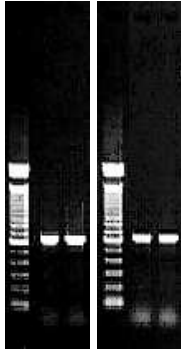
### その他

#### ● RT-PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて分離した total RNA (10pg/ $\mu\text{l}$  or 1pg/ $\mu\text{l}$ ) 中の  $\beta$ -actin mRNA をテンプレートにして RT-PCR を行った。

HeLa (10 cm ディッシュ)

10pg/ $\mu\text{l}$     1pg/ $\mu\text{l}$   
M 1 2    M 1 2



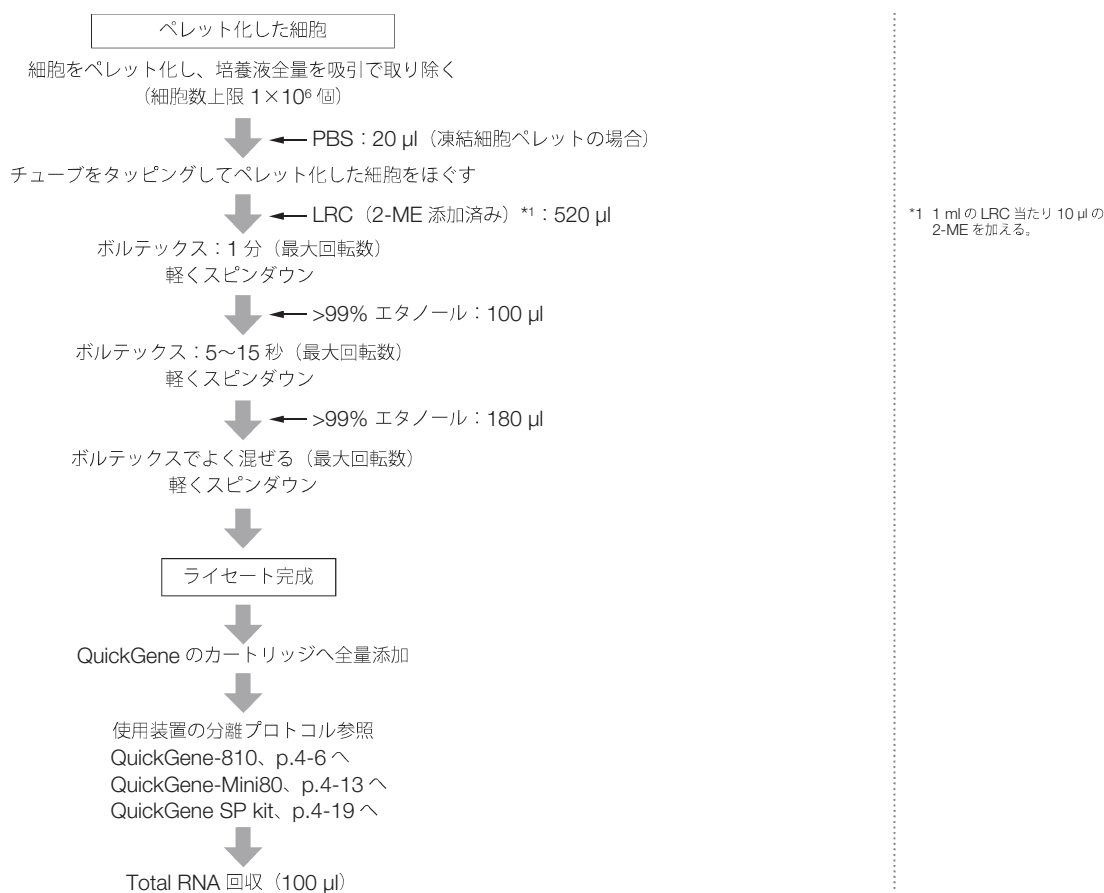
M：マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)  
1：QuickGene  
2：スピнкаラム法 (A 社)  
N：ネガティブコントロール

### 共通プロトコルサンプル

培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

HL60 培養細胞からの total RNA分離 (~1×10<sup>6</sup>個)

## ■ プロトコル



## ■ 結果

## ■ 電気泳動図

データなし

## ■ Total RNA の収量

	細胞数	収量 (μg)
HL60	1.0 × 10 <sup>6</sup>	9.7

## ■ タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	A260/280
HL60	1.0 × 10 <sup>6</sup>	1.88

## ■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	A260/230
HL60	1.0 × 10 <sup>6</sup>	2.08

## ■ その他

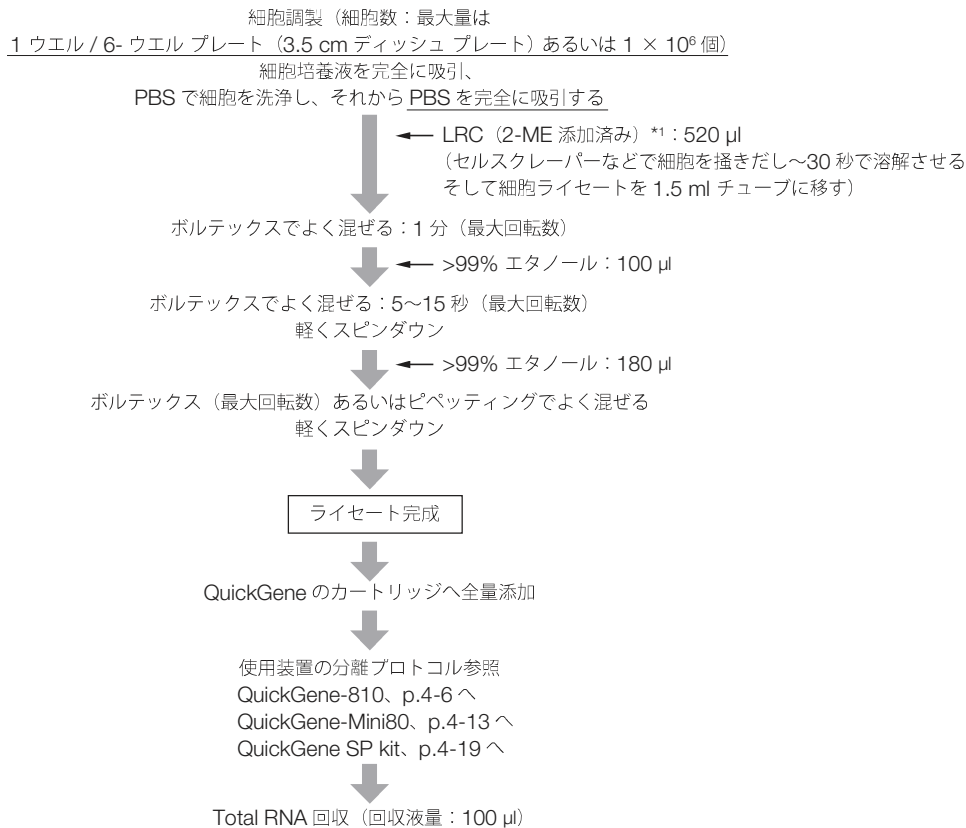
データなし

## ■ 共通プロトコルサンプル

データなし

## 水晶体上皮培養細胞からのtotal RNA分離 (培養ディッシュでの直接溶解の場合)

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

データなし

#### タンパク質の混入: A260/280

水晶体上皮細胞数	A260/280
$1 \times 10^6$	1.77

#### カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

#### その他

データなし

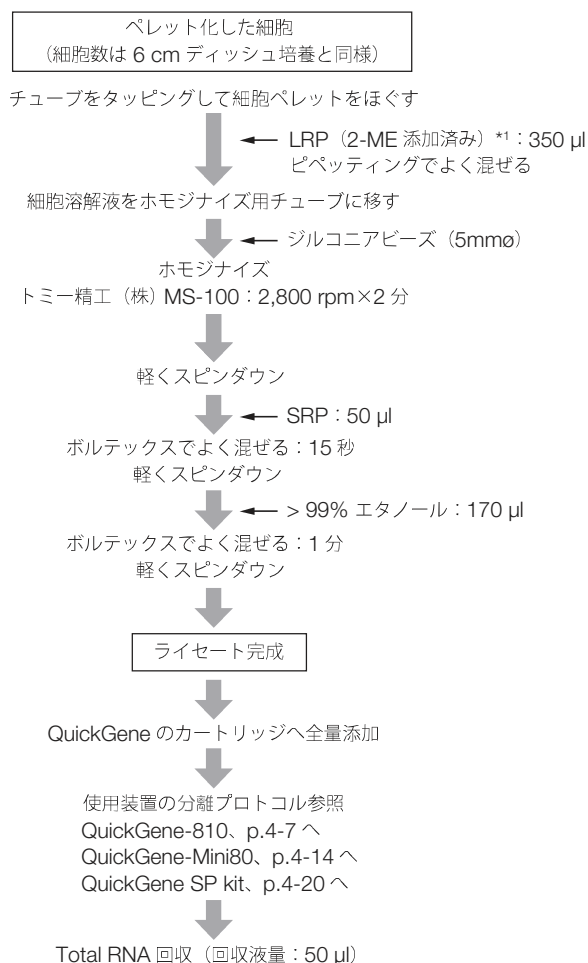
### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養 HuH-7 細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養平滑筋細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養 PC12 細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養ブタ脂肪細胞 (培養ディッシュで直接溶解)、培養歯根膜細胞 (培養ディッシュで直接溶解)



## リンパ球培養細胞からの total RNA分離

## プロトコル



\*1 1 ml の LRP 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

## 結果

## ■ 電気泳動図

データなし

## ■ Total RNA の収量

リンパ球細胞数	収量 ( $\mu$ g)
$1 \times 10^6$	13.4

## ■ タンパク質の混入 : A260/280

リンパ球細胞数	A260/280
$1 \times 10^6$	1.67

## ■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

## ■ その他

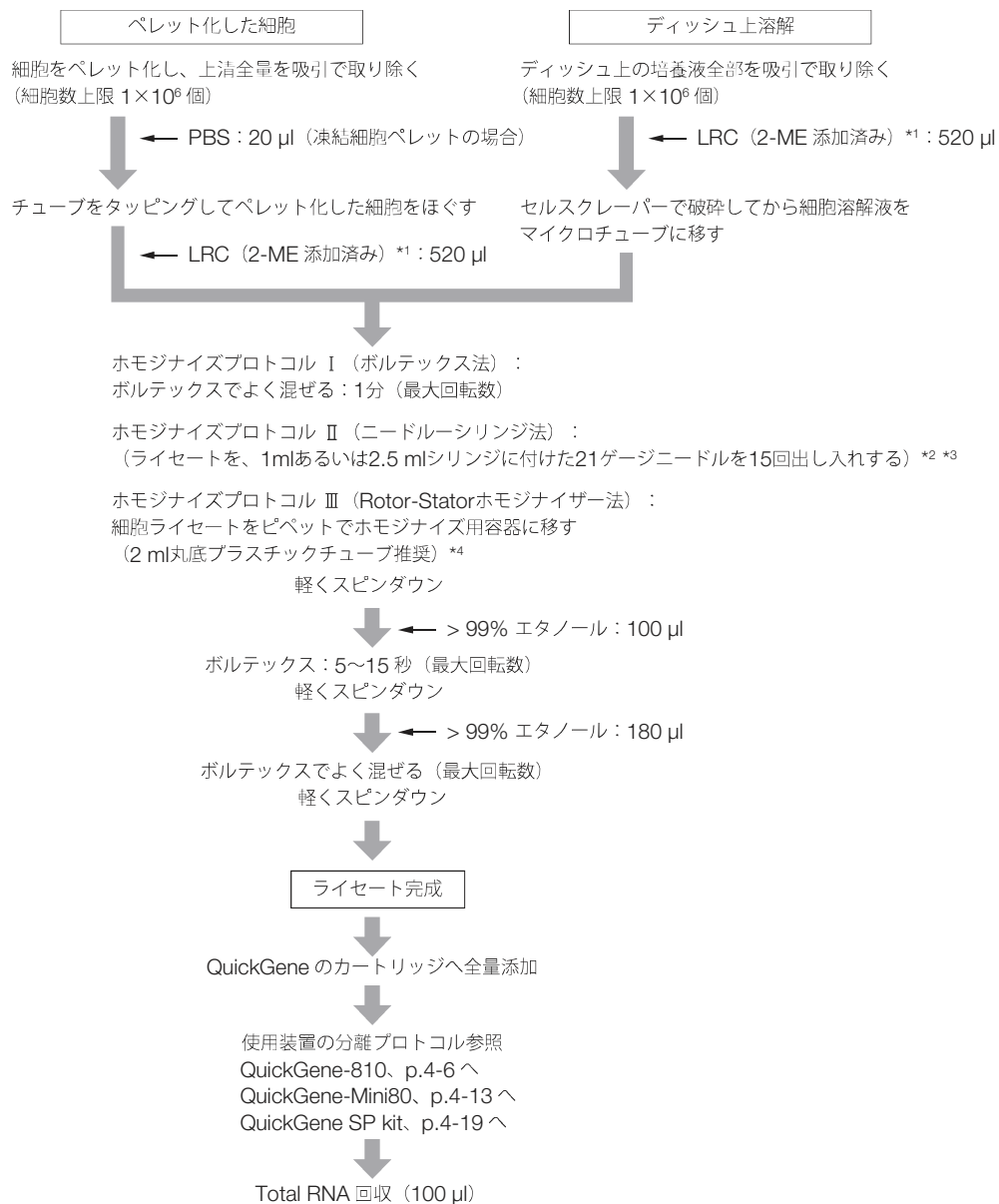
データなし

## 共通プロトコルサンプル

データなし

# NIH/3T3 培養細胞からの total RNA分離 (～1×10<sup>6</sup>個)

## プロトコル



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRC に加えてください。  
1 ml の LRC 当たり 10 μl の 2-ME を加える。

\*2 サンプルの泡立ちを防ぐために空気の混入を避けてください。

\*3 感染性のサンプルを各使用の時は、ニードルの取扱いには十分注意してください。

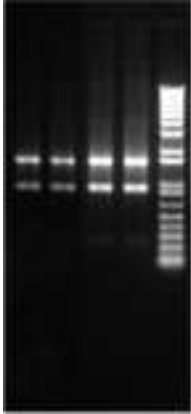
\*4 ホモジナイズ  
条件例: 20,000 rpm、30 秒、2 回  
5 mmφ あるいは 7 mmφ プロブ使用。

## 結果

### 電気泳動図

NIH/3T3 (1 ウェル / 6- ウェル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート)、6 cm ディッシュ)

1 2 3 4 M



1,2 : 1 ウェル / 6- ウェル プレート (3.5 cm ディッシュ プレート)、  
 ホモジナイズプロトコル I  
 3,4 : 6 cm ディッシュ、ホモジナイズ プロトコル II  
 M : Ready-Load 1kb Plus DNA Ladder : Invitrogen

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	Yield (μg)
NIH/3T3	$0.3 \times 10^6$	I	15.6
	$1.2 \times 10^6$	II	22.6

### タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			タンパク質の混入 A260/280
NIH/3T3	$0.3 \times 10^6$	I	2.17
	$1.2 \times 10^6$	II	2.26

### カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	ホモジナイズ プロトコル	純度
			カオトロピック塩の混入 A260/230
NIH/3T3	$0.3 \times 10^6$	I	2.18
	$1.2 \times 10^6$	II	2.22

### その他

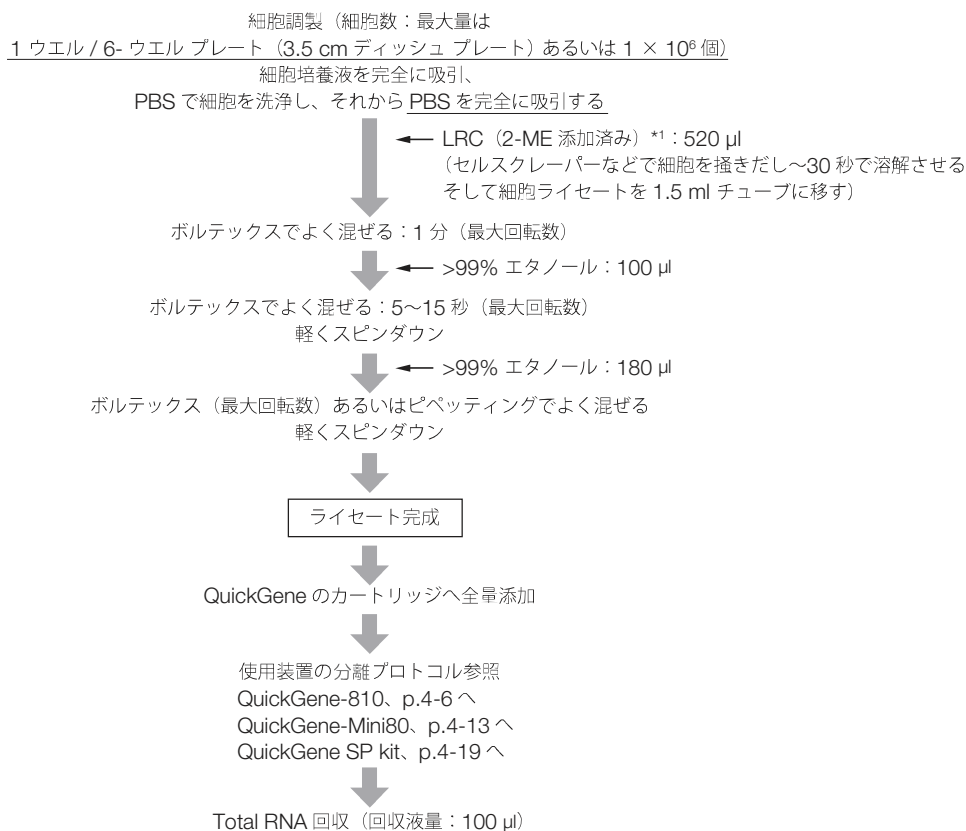
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 COS-7 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HeLa 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)、培養 HEK293 細胞 ( $\sim 1 \times 10^6$  個)

## 歯根膜培養細胞からの total RNA分離 (培養ディッシュでの直接溶解)

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

歯根膜細胞数	収量 ( $\mu$ g)
約 $1 \times 10^5$	1.2

#### タンパク質の混入 : A260/280

歯根膜細胞数	A260/280
約 $1 \times 10^5$	1.9

#### カオトロピック塩の混入 : A260/230

歯根膜細胞数	A260/230
約 $1 \times 10^5$	1.2

#### その他

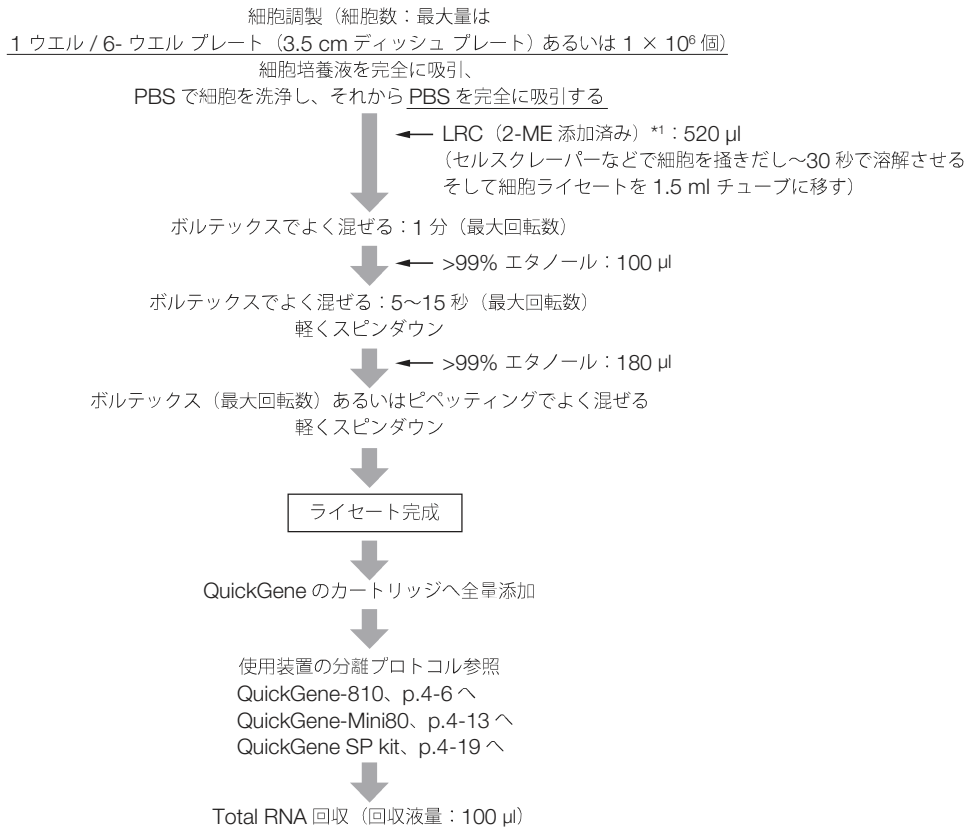
データなし

### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 HuH-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養平滑筋細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 PC12 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養ブタ脂肪細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養水晶体上皮膜細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)

# ブタ脂肪培養細胞からの total RNA分離 (培養ディッシュでの直接溶解)

## プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

## 結果

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞種	収量 ( $\mu$ g)
分化細胞	0.6
未分化細胞	1.2

### タンパク質の混入: A260/280

Kind of cells	A260/280
分化細胞	2.09
未分化細胞	2.07

### カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

### その他

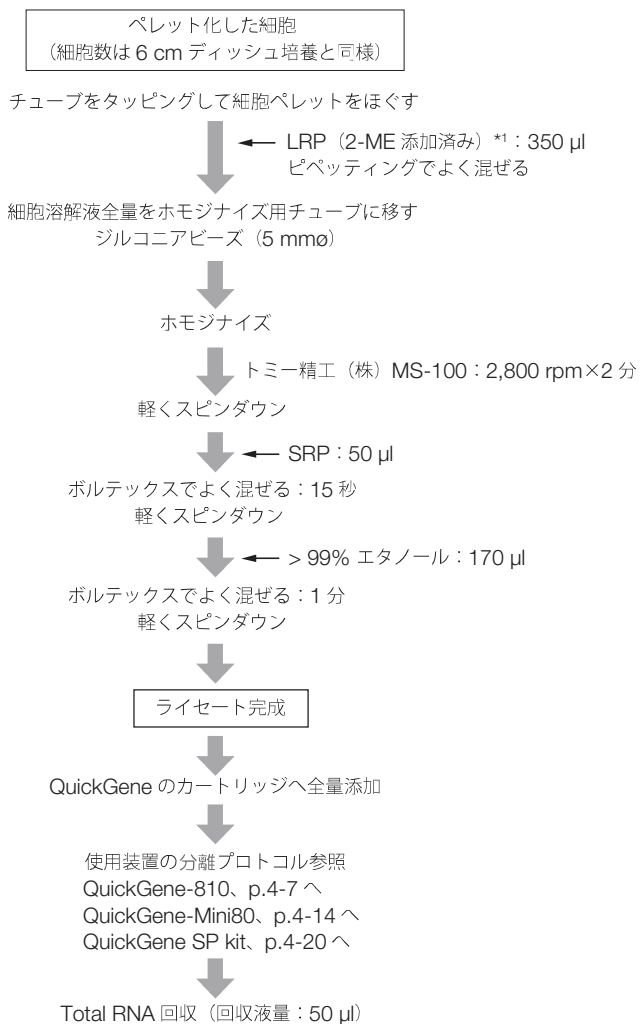
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 HuH-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養平滑筋細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 PC12 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養ブタ脂肪細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養水晶体上皮細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養歯根膜細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)

# HL60 細胞からのtotal RNA分離 (6 cmあるいは10 cmディッシュ)

## プロトコル A



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ずLRPに加えてください。  
1 mlのLRP当たり10 μlの2-MEを加える。

## 結果

接着細胞を 6 cm ディッシュで直接溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解させて total RNA を分離した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
HL60	5.0	33.1	46.2

### タンパク質の混入：A260/280

データなし

### カオトロピック塩の混入：A260/230

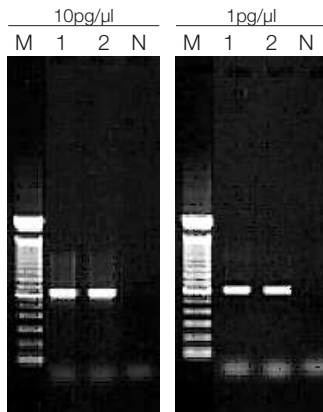
データなし

### その他

#### • RT-PCR (DNase 処理あり)

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて分離した total RNA (10pg/ $\mu\text{l}$  or 1pg/ $\mu\text{l}$ ) 中の  $\beta$ -actin mRNA をテンプレートにして RT-PCR を行った。

HL60 ( $5 \times 10^6$  個の細胞)



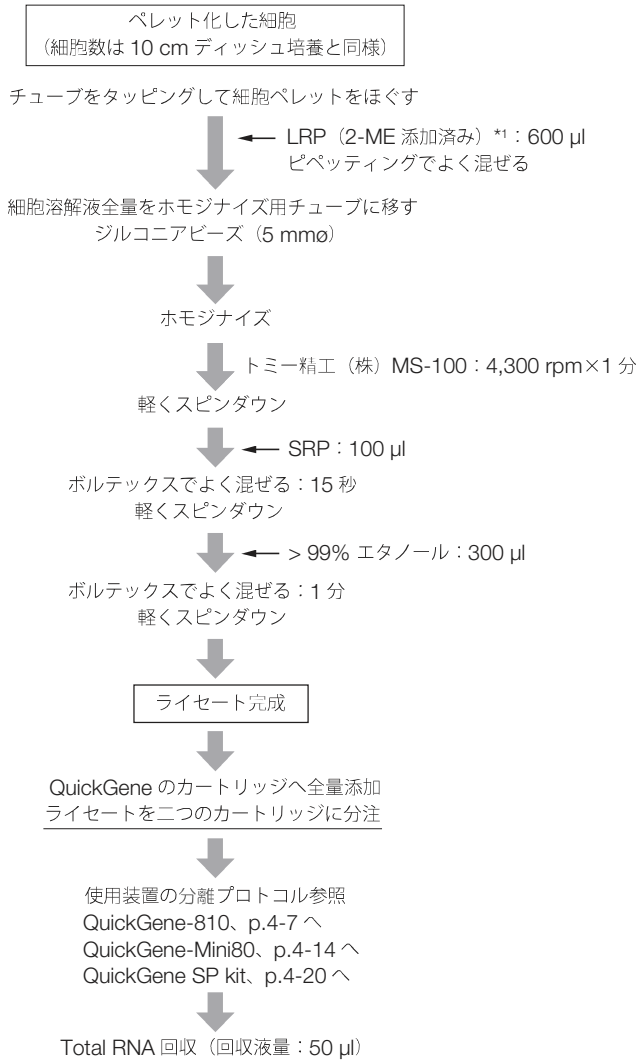
M：マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)  
1：QuickGene  
2：スピнкаラム法 (A 社)  
N：ネガティブコントロール

Total RNA (1pg/ $\mu\text{l}$ ) で行った RT-PCR に対して、増幅産物のバンドに似たバンドが両方のキットで検出された。

## 共通プロトコルサンプル

データなし

プロトコル B



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。1 ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加える。



## 結果

接着細胞を 10 cm ディッシュで直接溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HL60	15.0	167.3	154.4	144.4	140.5

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンプロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HL60	15.0	1.92	1.85	2.18	2.09

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
HL60	15.0	2.17	2.15	2.18	2.12

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

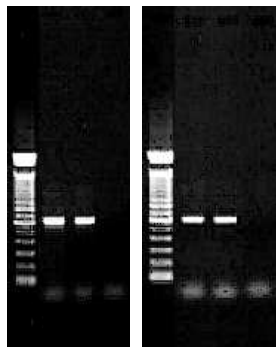
### その他

#### • RT-PCR

QuickGene システムおよびスピнкаラム法 (A 社) を用いて分離した total RNA (10pg/ $\mu\text{l}$  あるいは 1pg/ $\mu\text{l}$ ) 中の  $\beta$ -actin mRNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。

HL60 ( $15 \times 10^6$  個の細胞)

10pg/ $\mu\text{l}$				1pg/ $\mu\text{l}$			
M	1	2	N	M	1	2	N



M : マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)

1 : QuickGene

2 : スピнкаラム法 (A 社)

N : ネガティブコントロール

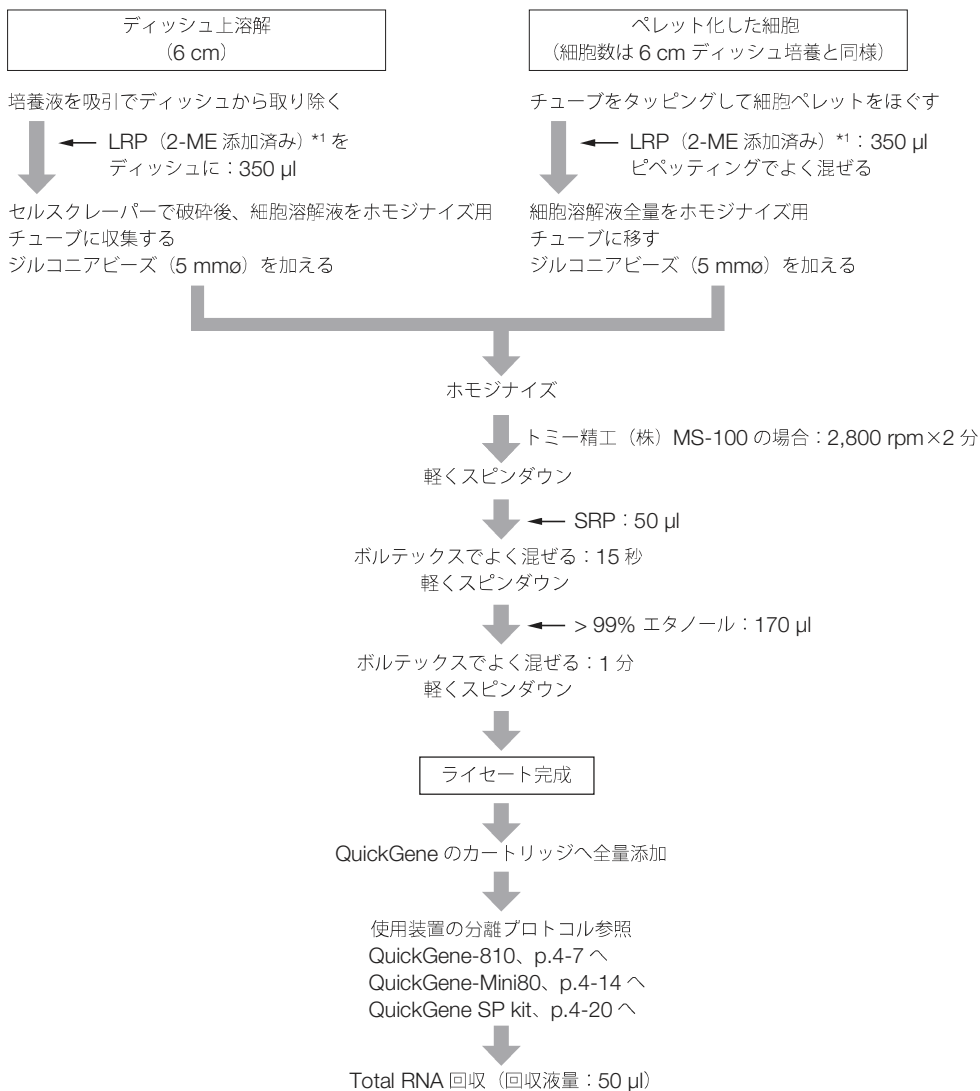
Total RNA (1pg/ $\mu\text{l}$ ) で行った RT-PCR に対して、増幅産物のバンドに似たバンドが両方のキットで検出された。

## 共通プロトコルサンプル

データなし

# NIH/3T3 細胞からのtotal RNA分離 (6 cmあるいは10 cmディッシュ)

## プロトコル A



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ずLRPに加えてください。  
1 mlのLRP当たり10 µlの2-MEを加える。

## 結果

接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

### ■ 電気泳動図

データなし

### ■ Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)
NIH / 3T3	1.5	27.9	35.7

### ■ タンパク質の混入：A260/280

データなし

### ■ カオトロピック塩の混入：A260/230

データなし

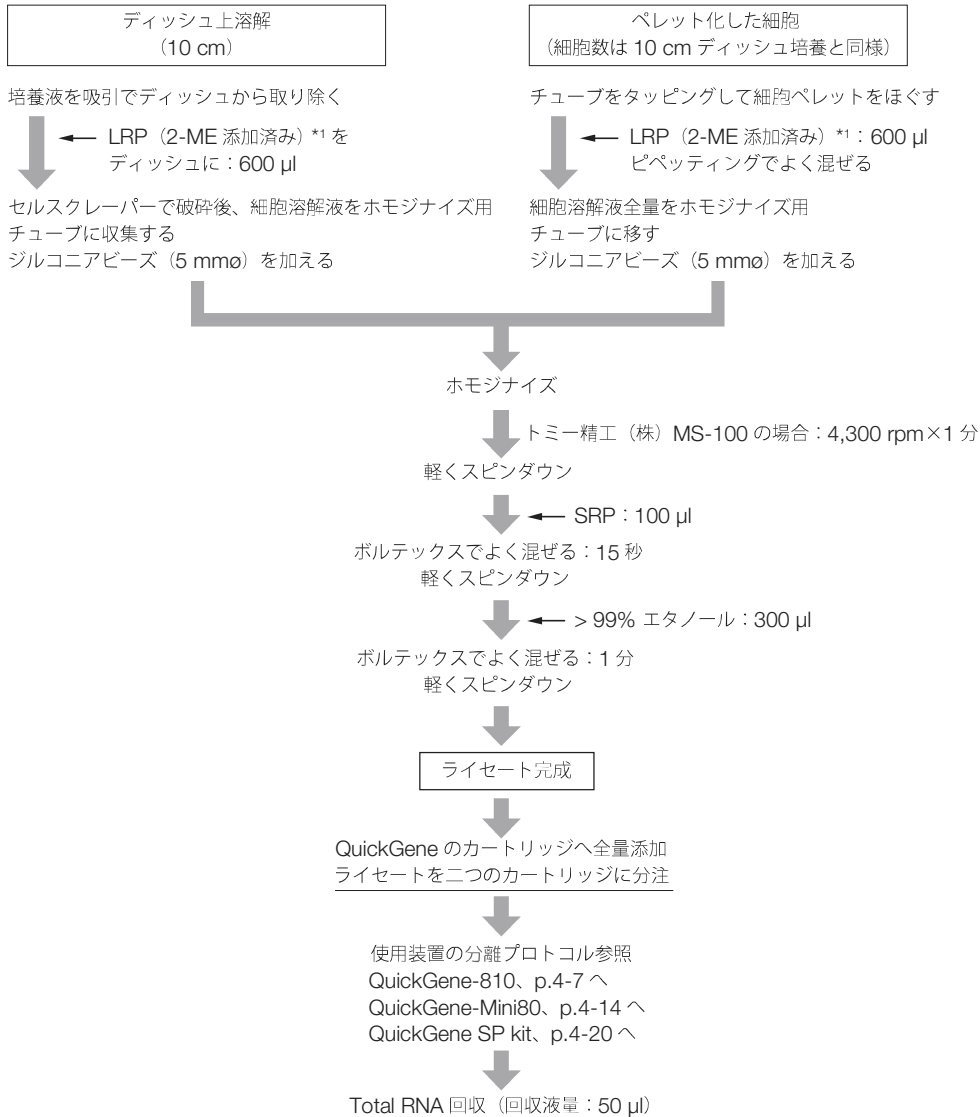
### ■ その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

## プロトコル B



\*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えてください。  
1 ml の LRP 当たり 10 µl の 2-ME を加える。

## 結果

接着細胞を直接 10 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解し total RNA を分離した。

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	収量 ( $\mu\text{g}$ )			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
NIH / 3T3	4.5	89.4	100.2	79.0	84.0

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンプロットングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### タンパク質の混入：A260/280

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
NIH / 3T3	4.5	2.19	2.02	2.17	2.12

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

### カオトロピック塩の混入：A260/230

細胞株	細胞数 ( $\times 10^6$ )	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法	QuickGene	スピнкаラム法
NIH / 3T3	4.5	2.02	2.26	1.94	1.75

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

### その他

データなし

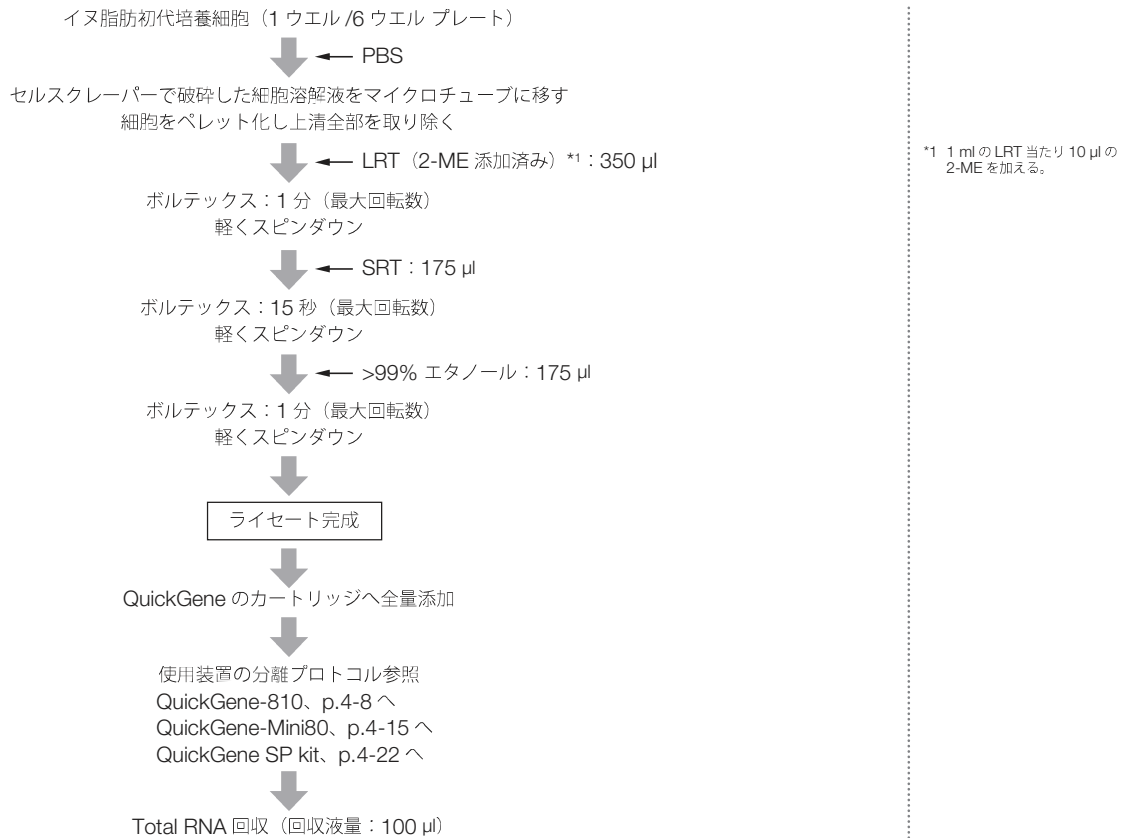
## 共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 HEK293 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

RG-16

# イヌの脂肪初代培養細胞からのtotal RNA分離

## プロトコル



## 結果

### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

細胞数	QuickGene	競合 A キット
1 ウェル / 6 ウェル プレート	7.9 µg	1.3 µg

### タンパク質の混入 : A260/280

細胞数	QuickGene	競合 A キット
1 ウェル / 6 ウェル プレート	2.04	2.67

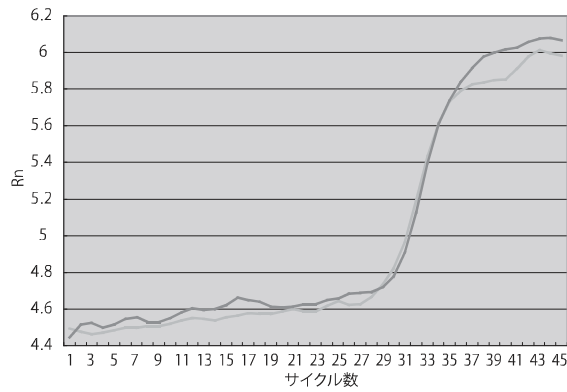
### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

## ■ その他

### ● ワンステップ リアルタイム RT-PCR

QuickGene システムを用いてイヌの脂肪初代培養細胞から分離した total RNA で、QuantiTect プローブ RT-PCR キット (QIAGEN) および ABI PRISM7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用してワンステップ リアルタイム RT-PCR を行い、GAPDH を増幅した。



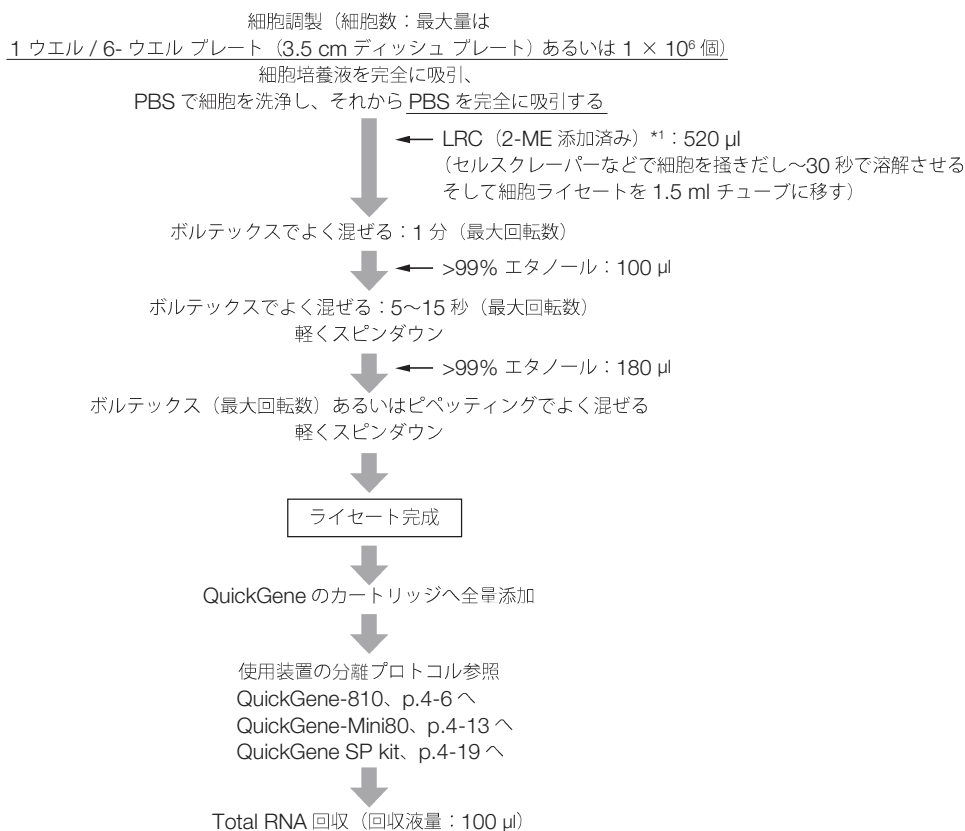
\* 両方とも、QuickGene システムで分離した total RNA に対するデータである。

## ■ 共通プロトコルサンプル

データなし

## HuH-7 培養細胞からのtotal RNA分離(培養ディッシュでの直接溶解)

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

- 電気泳動図  
データなし
- Total RNA の収量  
データなし
- タンパク質の混入: A260/280  
データなし
- カオトロピック塩の混入: A260/230  
データなし
- その他
  - PCR  
PCR 成功

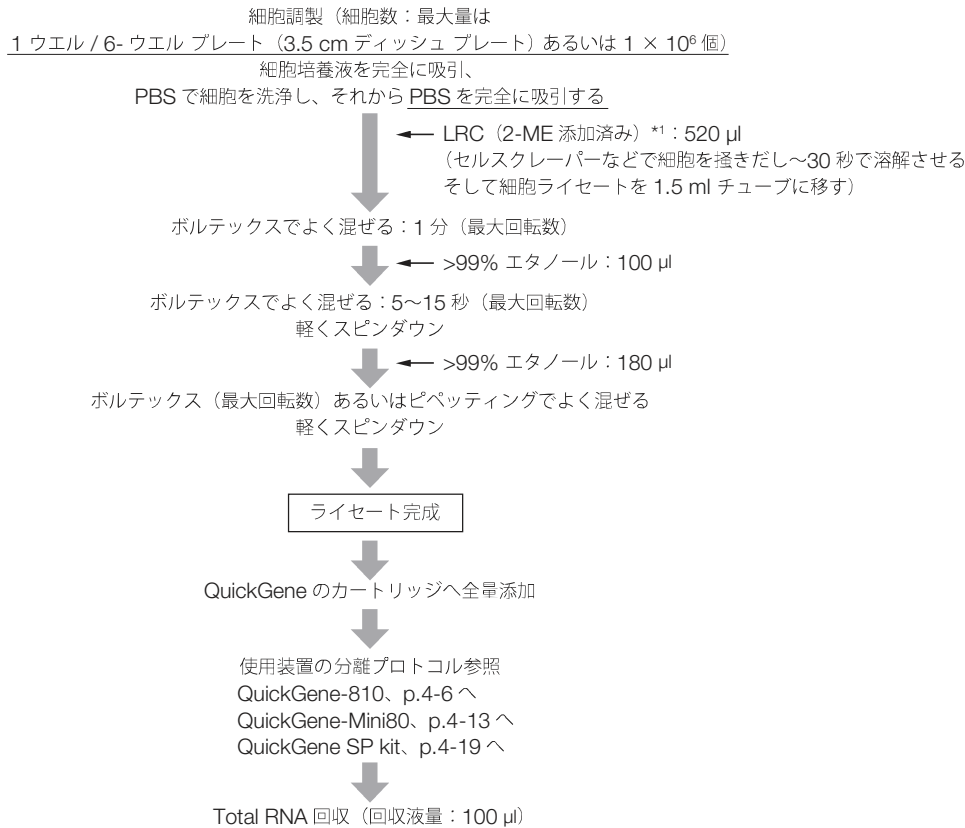
### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養平滑筋細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 PC12 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養ブタ脂肪細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養水晶体上皮細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養歯根膜細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)



## MCF-7 培養細胞からのtotal RNA分離(培養ディッシュでの直接溶解)

## プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

## 結果

## 電気泳動図

データなし

## Total RNA の収量

MCF-7 細胞数	収量 ( $\mu$ g)
$1 \times 10^6$	9.7

## タンパク質の混入: A260/280

MCF-7 細胞数	A260/280
$1 \times 10^6$	2.06

## カオトロピック塩の混入: A260/230

MCF-7 細胞数	A260/230
$1 \times 10^6$	2.10

## その他

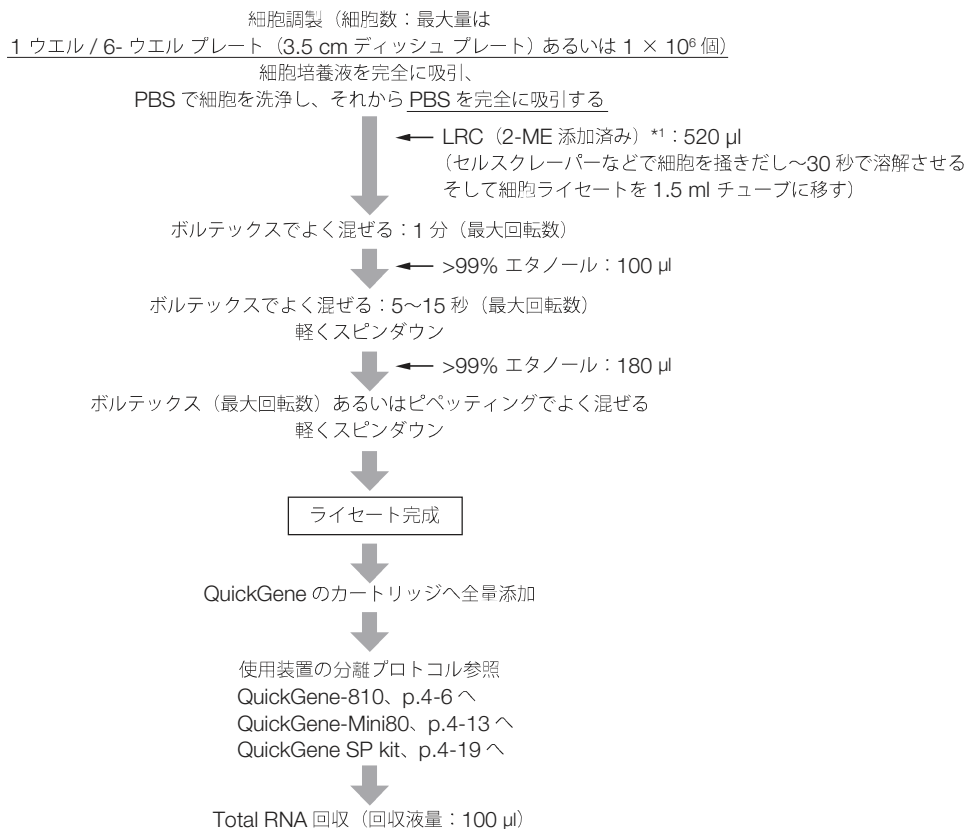
データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 HuH-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養平滑筋細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 PC12 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養ブタ脂肪細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養水晶体上皮細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養歯根膜細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)

## PC12 培養細胞からのtotal RNA分離(培養ディッシュでの直接溶解)

### プロトコル



\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

### 結果

#### 電気泳動図

データなし

#### Total RNA の収量

PC12 細胞数	収量 ( $\mu$ g)
$1 \times 10^6$	約 20.0

#### タンパク質の混入 : A260/280

PC12 細胞数	A260/280
$1 \times 10^6$	1.75

#### カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

#### その他

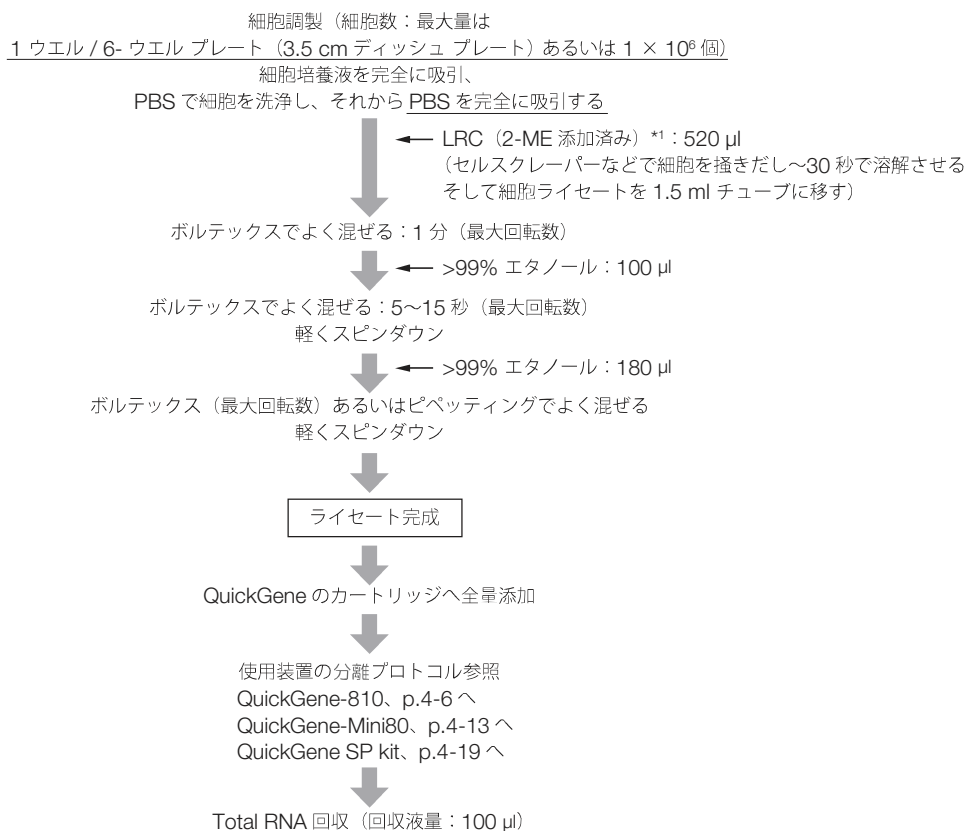
データなし

### 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 HuH-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養平滑筋細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養ブタ脂肪細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養水晶体上皮細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養歯根膜細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)

## 平滑筋培養細胞からのtotal RNA分離(培養ディッシュでの直接溶解)

## プロトコル

\*1 1 ml の LRC 当たり 10  $\mu$ l の  
2-ME を加える。

## 結果

## ■ 電気泳動図

データなし

## ■ Total RNA の収量

データなし

## ■ タンパク質の混入: A260/280

データなし

## ■ カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

## ■ その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

培養 MCF-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 HuH-7 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養 PC12 細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養ブタ脂肪細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養水晶体上皮細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)、培養歯根膜細胞 (培養ディッシュでの直接溶解)

RG-21

DNAチップ “ジェノパール®” ※のため培養細胞からのtotal RNA分離

プロトコル

アスピレーターを使用して、全ての培養上清を除去し、細胞をペレット化する  
( $1 \times 10^6$  個以上の細胞は使用しないでください)



← PBS : 20  $\mu$ l (凍結ペレットの場合に必要)

チューブを軽くタッピングし、ペレットを分散させる



← LRC (2-ME 添加済み) \*1 : 520  $\mu$ l

ホモジナイズ: ボルテックス  
ボルテックス (最大回転数) : 1分  
軽くスピンドウン (数秒)



← >99% エタノール : 100  $\mu$ l

ボルテックス (最大回転数) : 5 ~ 15秒  
軽くスピンドウン (数秒)



← >99% エタノール : 180  $\mu$ l

ボルテックス (最大回転数)  
軽くスピンドウン (数秒)



ライセート完成



QuickGene のカートリッジにライセートの全量を添加



使用する機器によって、下記の分離プロトコルを参照してください  
QuickGene-810 : p.4-8  
QuickGene-Mini80 : p.4-15



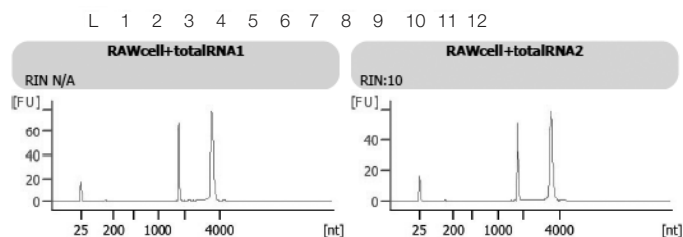
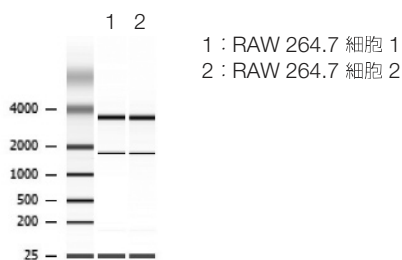
total RNA 回収 (溶出液量 : 50  $\mu$ l)

\*1 1 ml の LRT に対し、10  $\mu$ l の 2-ME を添加してください

結果

電気泳動図

QuickGene システムを用いて、RAW 264.7 細胞 (マウスマクロファージ細胞) から total RNA を分離した。



2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.)

※ “ジェノパール®” は、三菱レイヨン株式会社の登録商標です。

## total RNA の収量

サンプル	収量 (μg)	
	1	2
RAW 264.7	38.0	30.0

## タンパク質の混入：A260/280

データなし

## カオトロピック塩の混入：A260/280

データなし

## その他

データなし

## 共通プロトコルサンプル

データなし

※ "ジェノパール®" は、三菱レイヨン株式会社の登録商標です。

