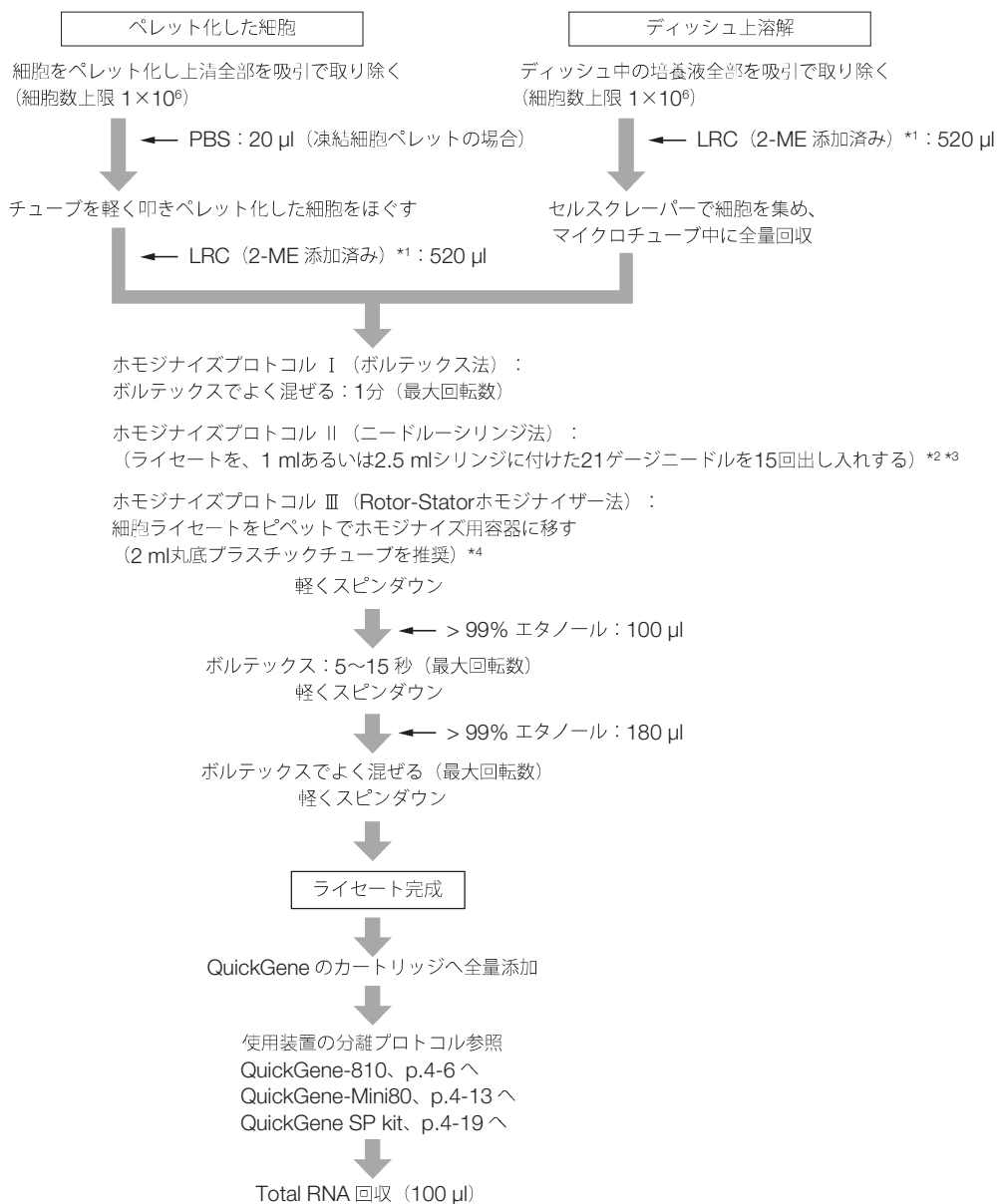


3-XVII 章

培養細胞からの total RNA分離

COS-7 培養細胞からの total RNA分離 (～1×10⁶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時は、ニードルの扱いには十分注意してください。

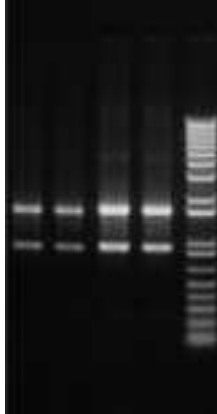
*4 ホモジナイズ
条件例: 20,000 rpm、30 秒、2 回、
5 mmφ あるいは 7 mmφ プロブ使用。

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	0.3×10^6	II	13.6
	0.8×10^6	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	0.3×10^6	II	2.19
	0.8×10^6	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	0.3×10^6	II	2.19
	0.8×10^6	III	2.17

その他

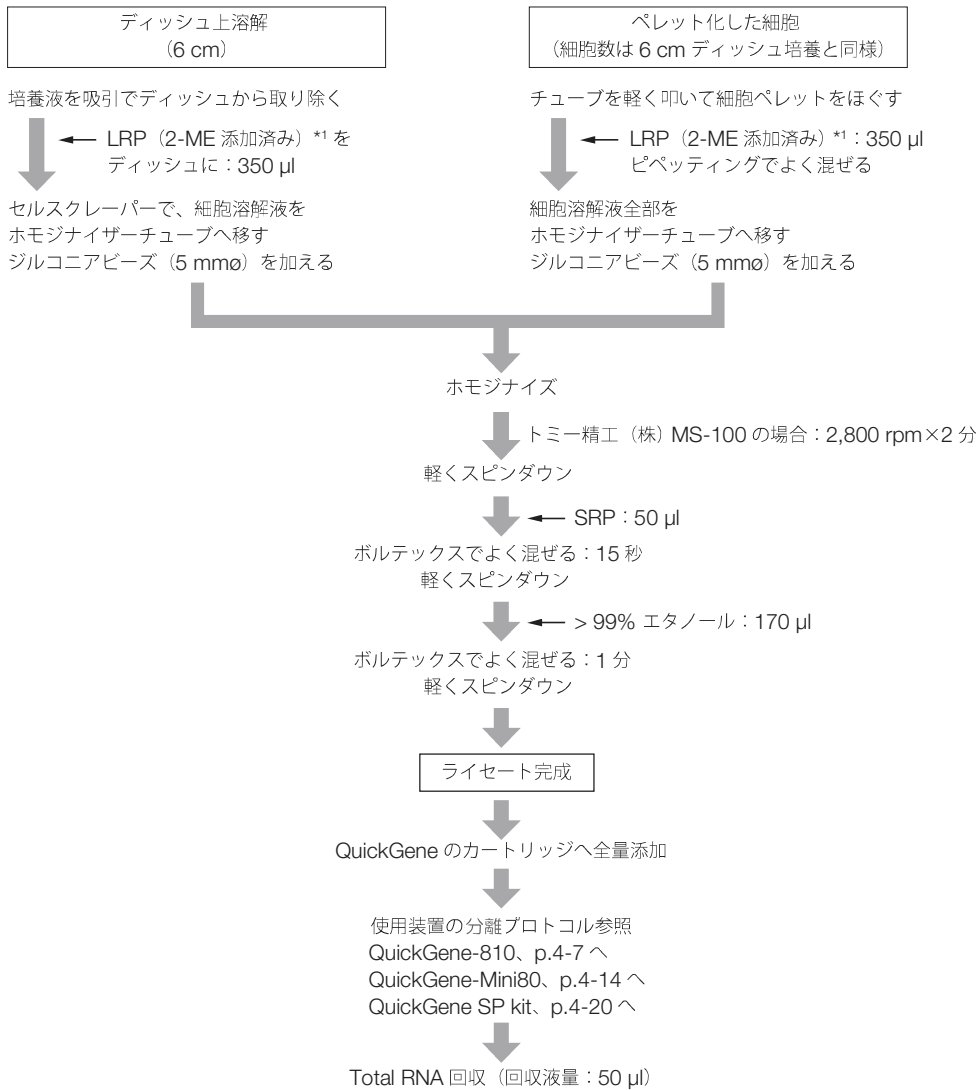
データなし

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 (μg)	
		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

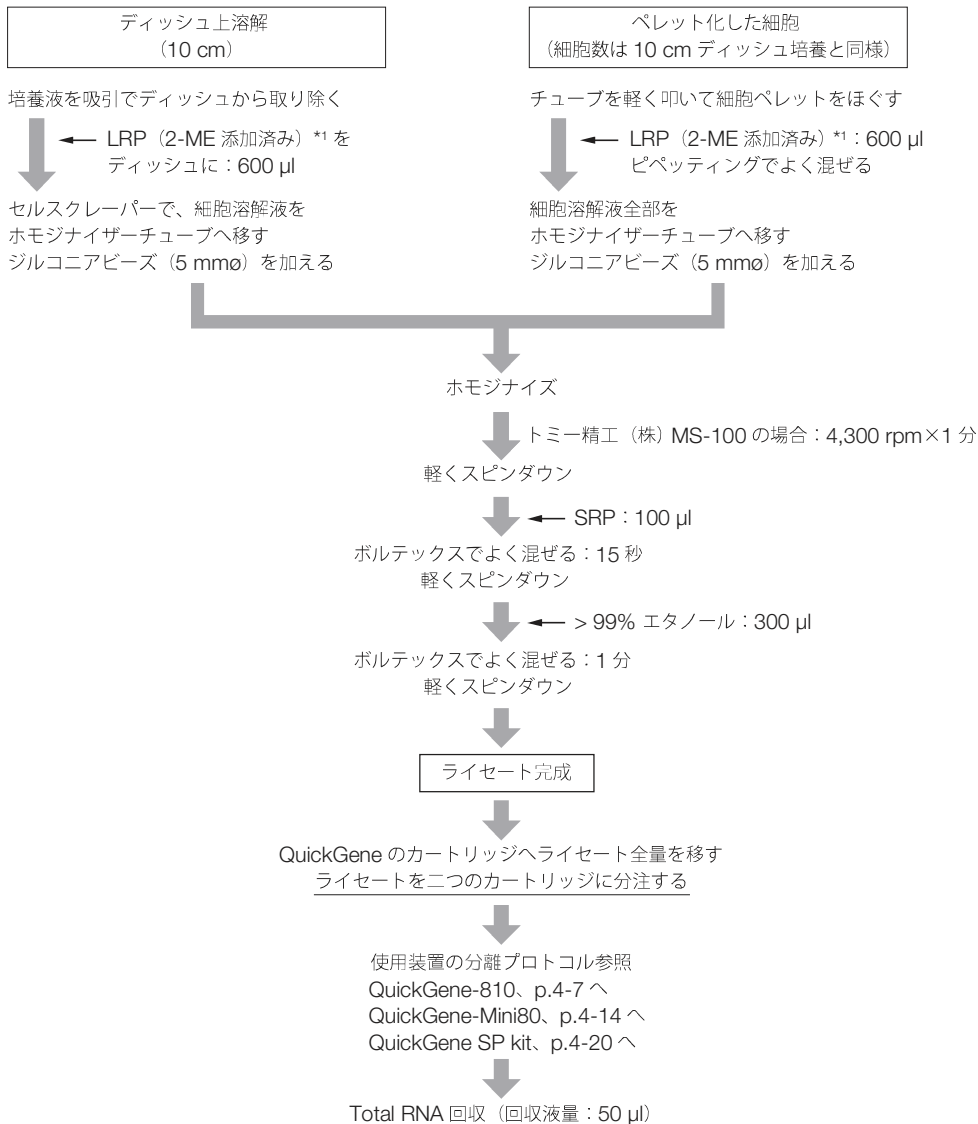
その他

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 (μg)			
		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

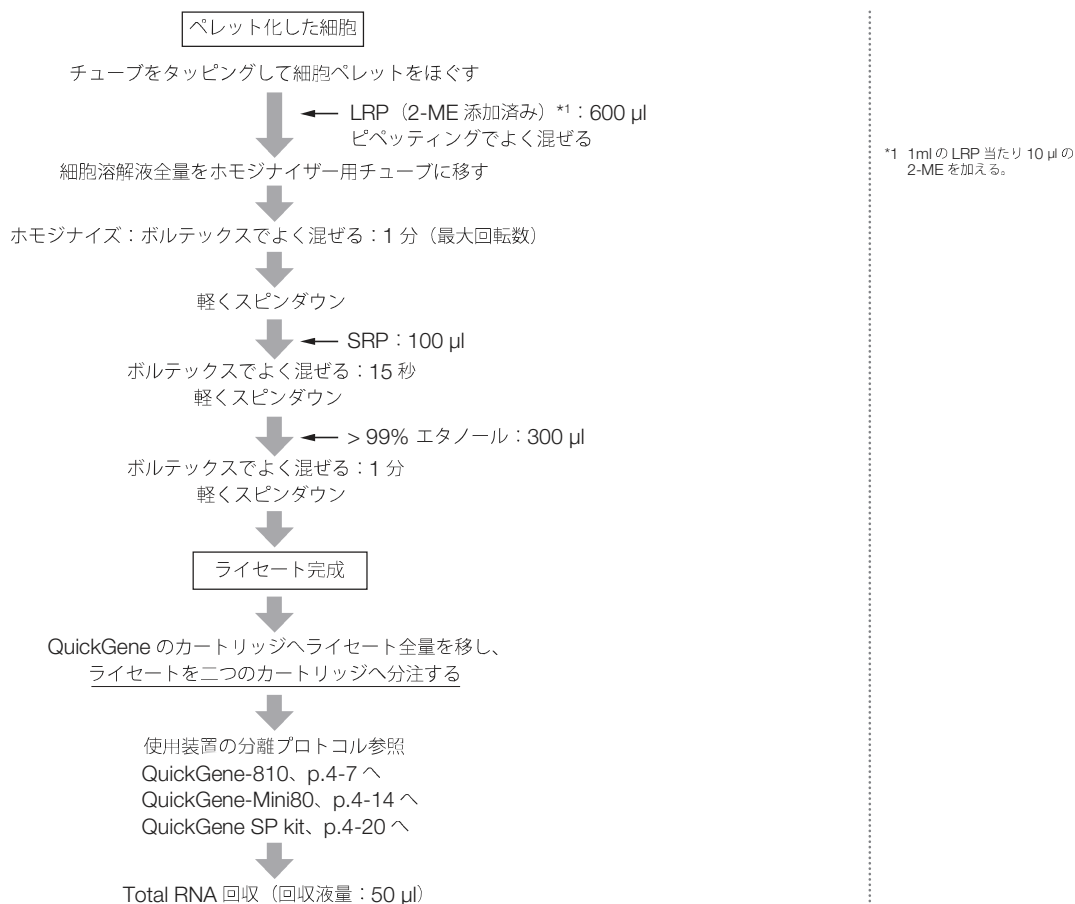
データなし

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)
2×10^6	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
2×10^6	2.1

カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

その他

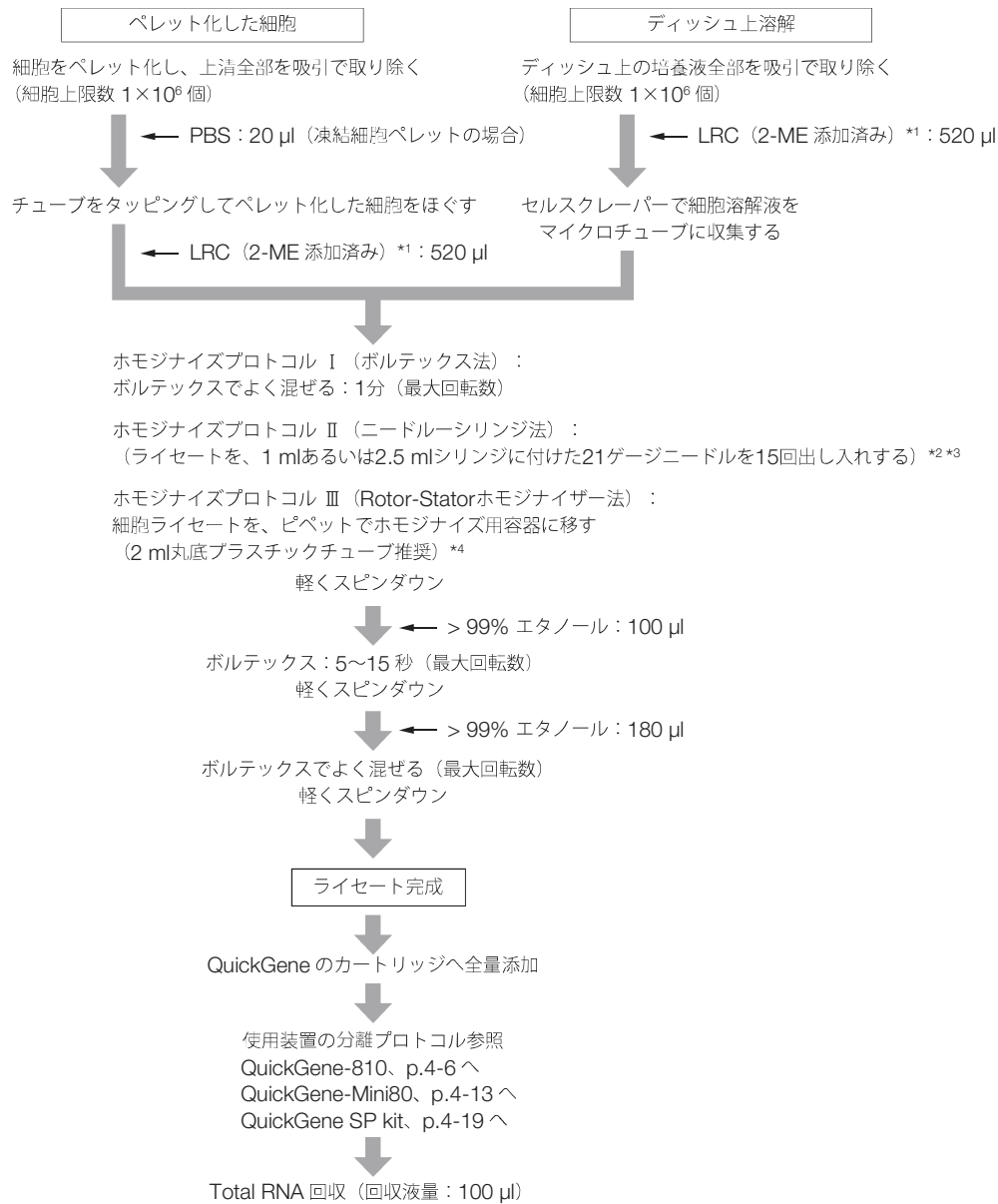
データなし

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 (~1×10⁶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。

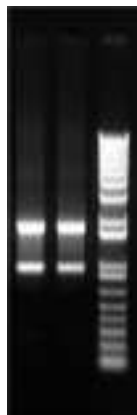
*4 ホモジナイズ条件例: 20,000 rpm、30秒、2回 5 mmあるいは7 mmプローブ使用。

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	2.1×10^6	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	2.1×10^6	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	2.1×10^6	II	2.14

その他

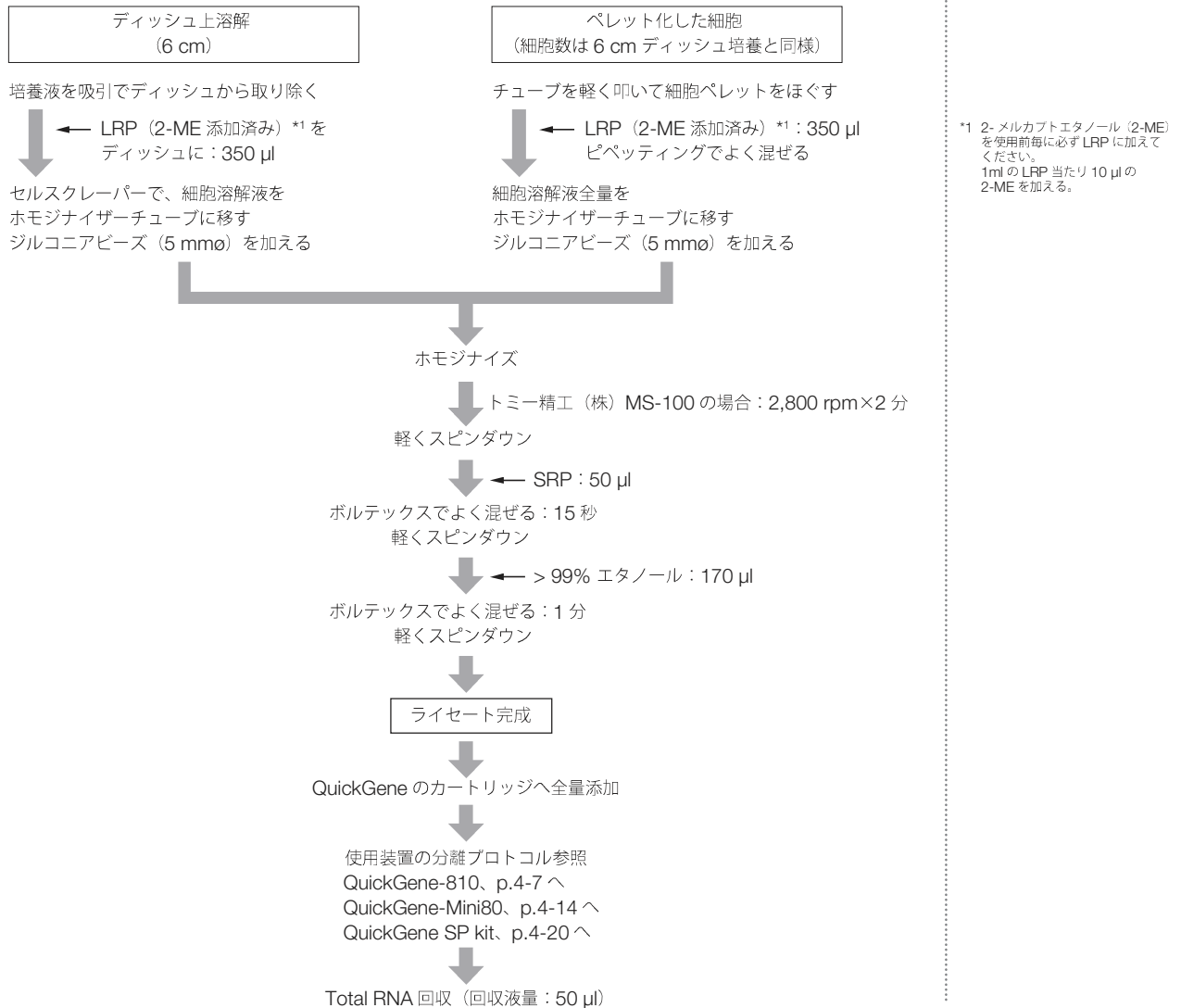
データなし

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

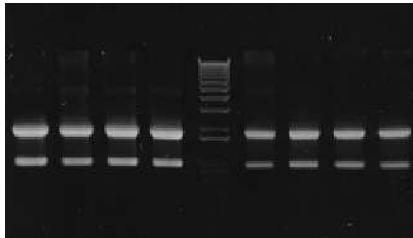
接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して、total RNA を分離した。

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 × 10⁶ 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 ⁶)	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

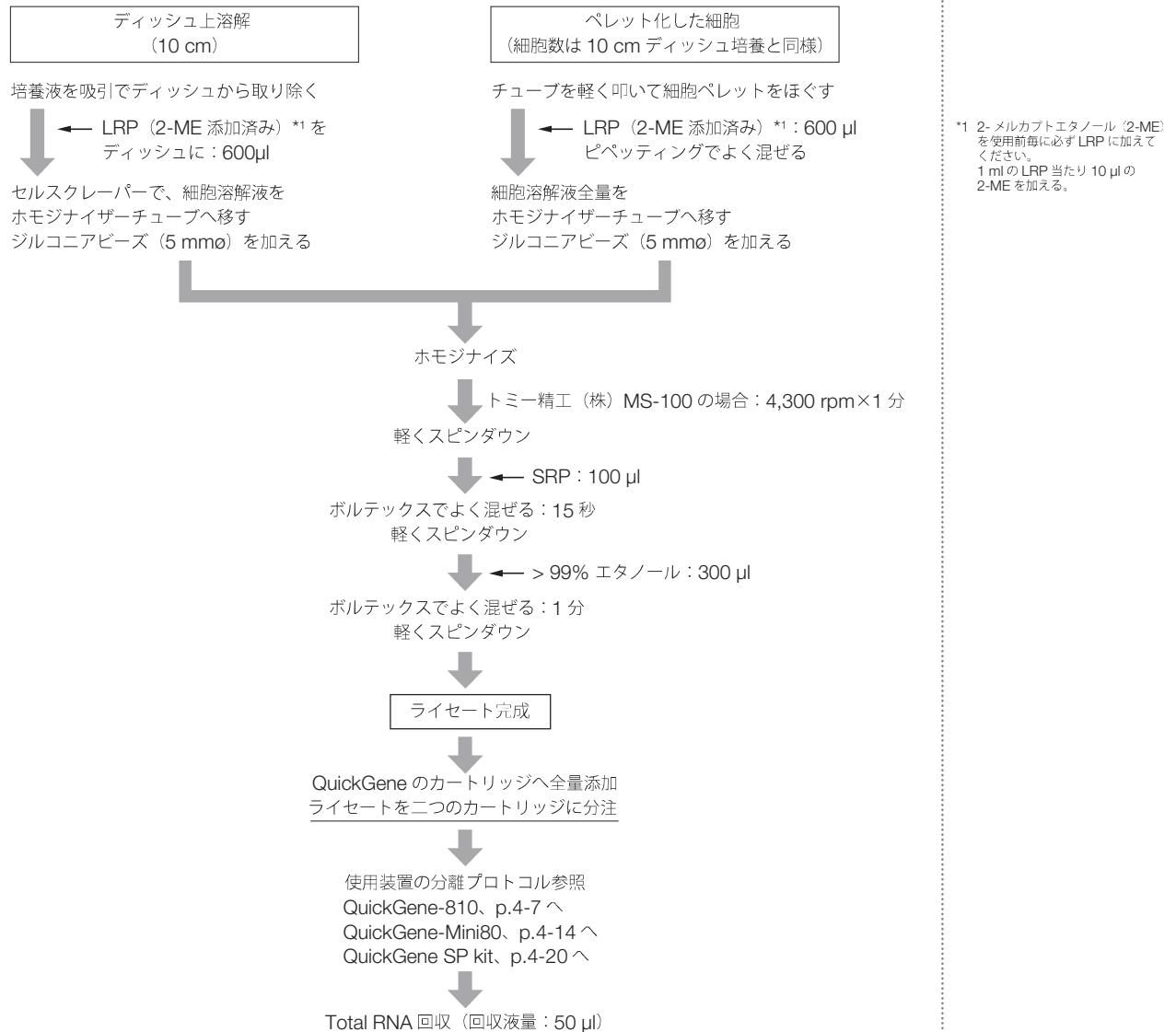
その他

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

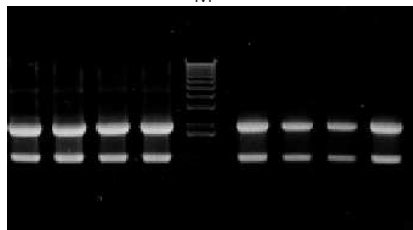
接着細胞を直接 10 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

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 ⁶)	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 ⁶)	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 ⁶)	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 (8×10⁶ 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 mmø) 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 (μg)			
		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)
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。

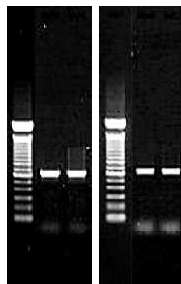
その他

• 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/ 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。

HEK293 (12 $\times 10^6$ 個の細胞)

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)

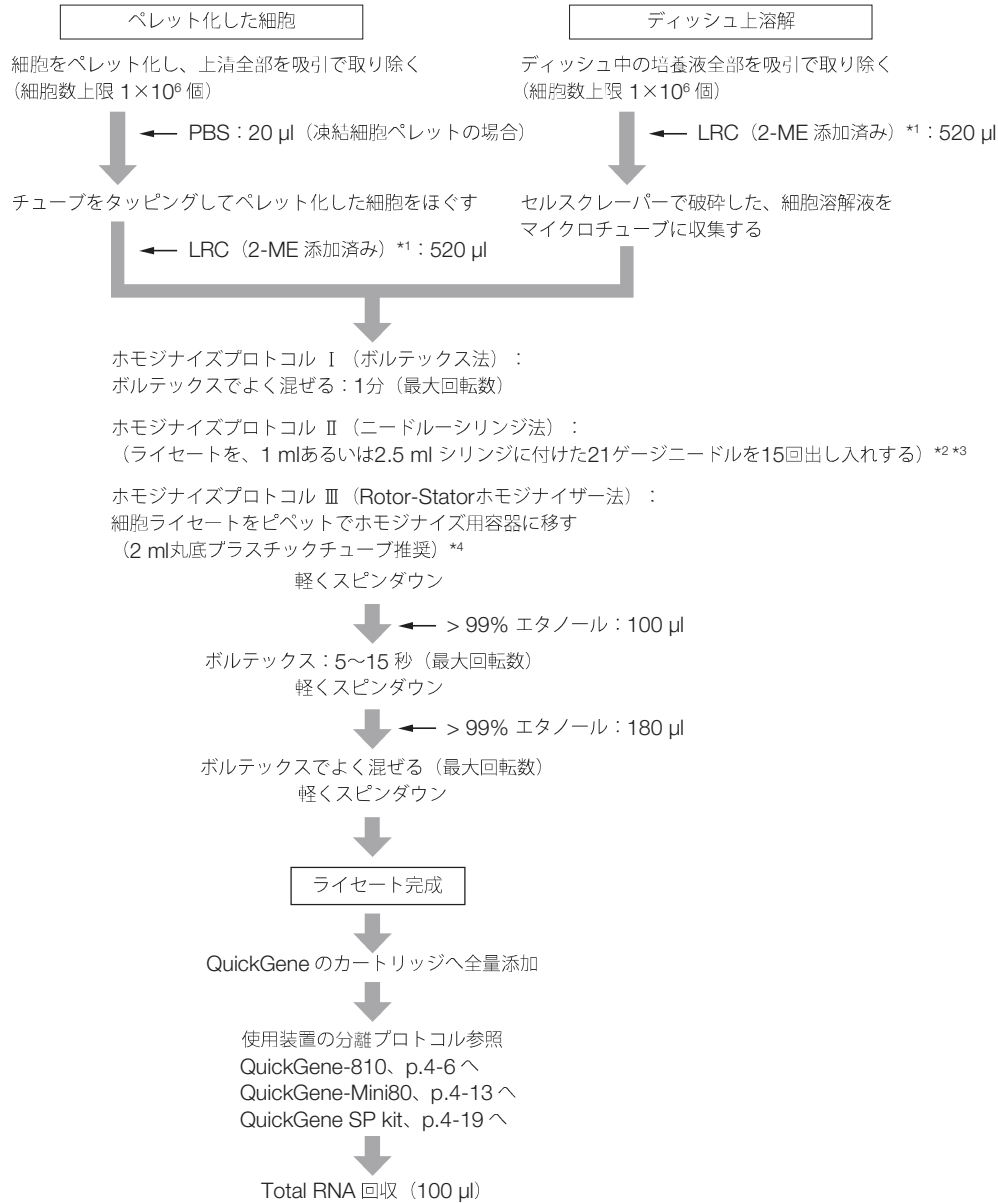
Total RNA (1pg/ μl) で行った RT-PCR に対して、増幅産物に似た電気泳動バンドが両方のキットで検出された。

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 (～1×10⁶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。

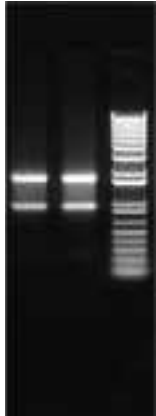
*4 ホモジナイズ条件例: 20,000 rpm、30 秒、2 回 5 mm あるいは 7 mm プローブを使用。

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	1.2×10^6	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	1.2×10^6	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	1.2×10^6	II	2.21

その他

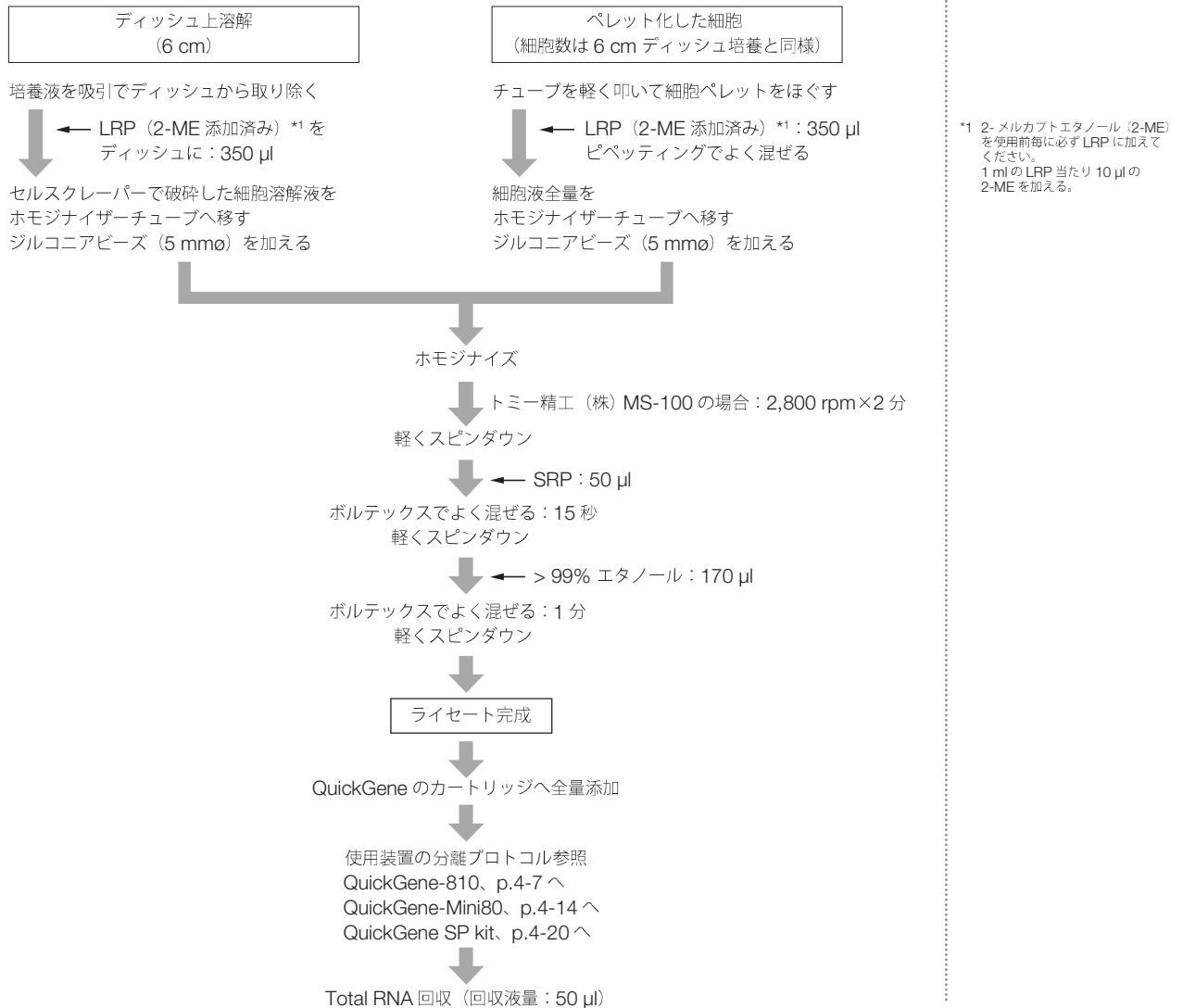
データなし

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

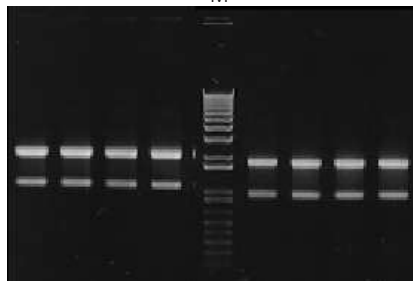
接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

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 × 10⁶ 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 ⁶)	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

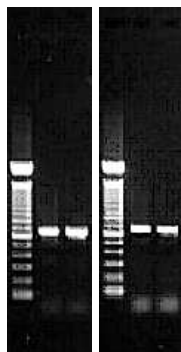
その他

• 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

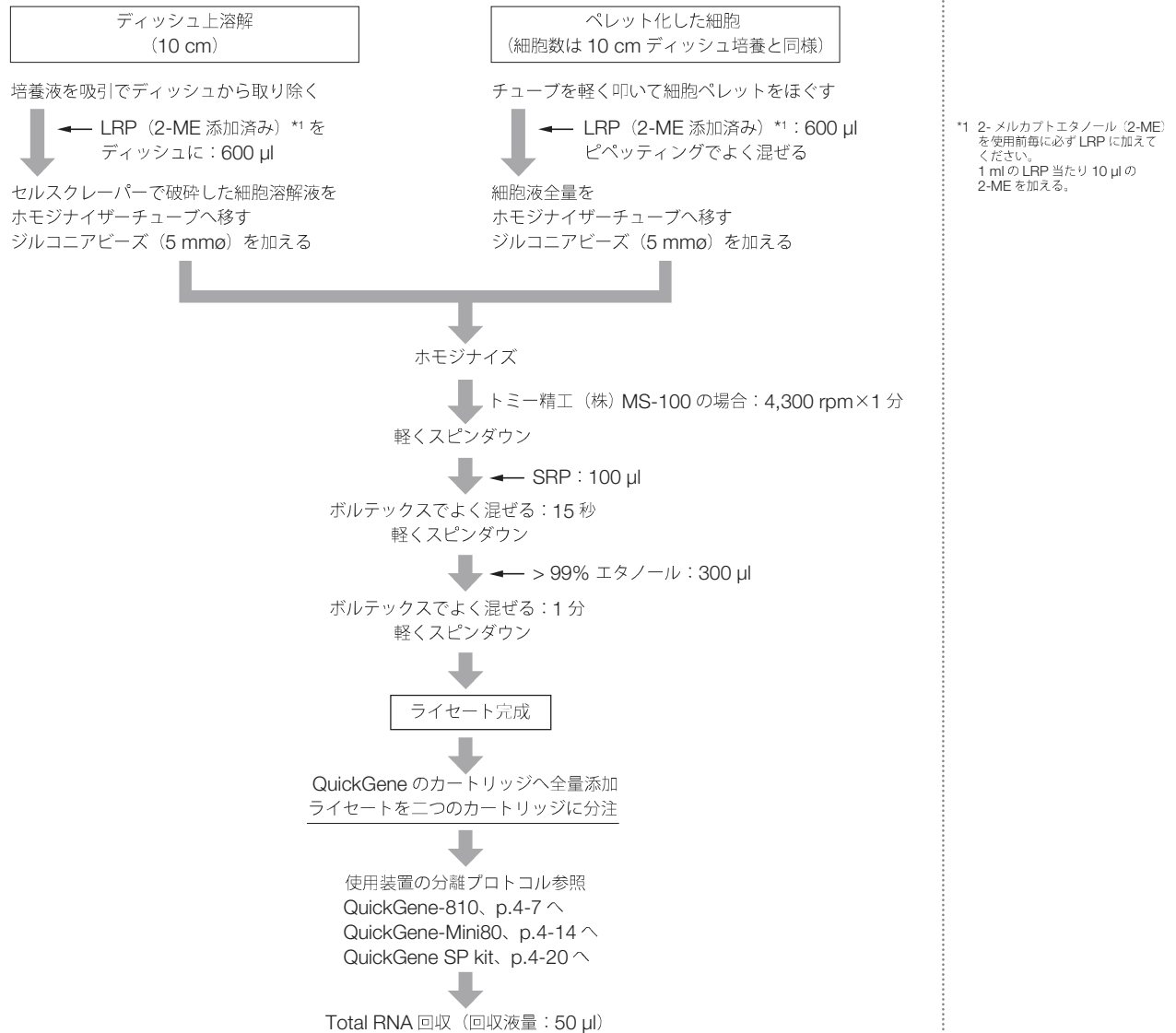
2 : スピнкаラム法 (A 社)

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)

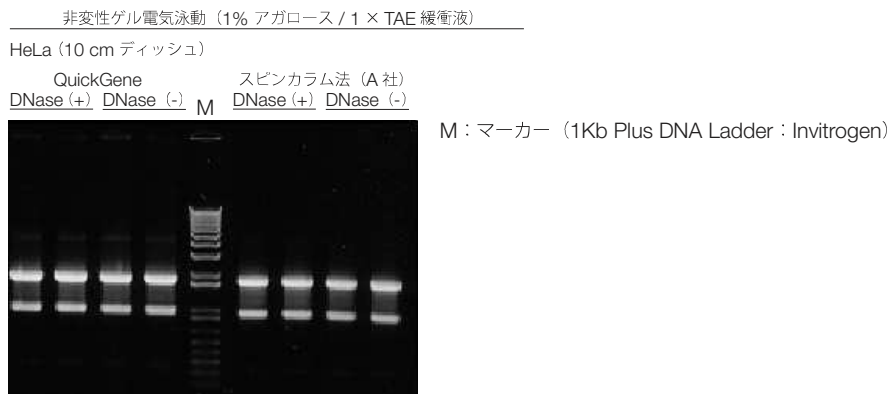
プロトコル B



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 (μg)			
		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。

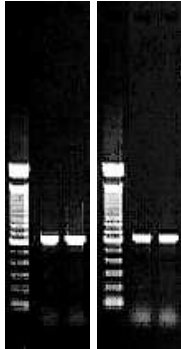
その他

• 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/ μl or 1pg/ μl) 中の β -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/ μl 1pg/ μl
M 1 2 M 1 2



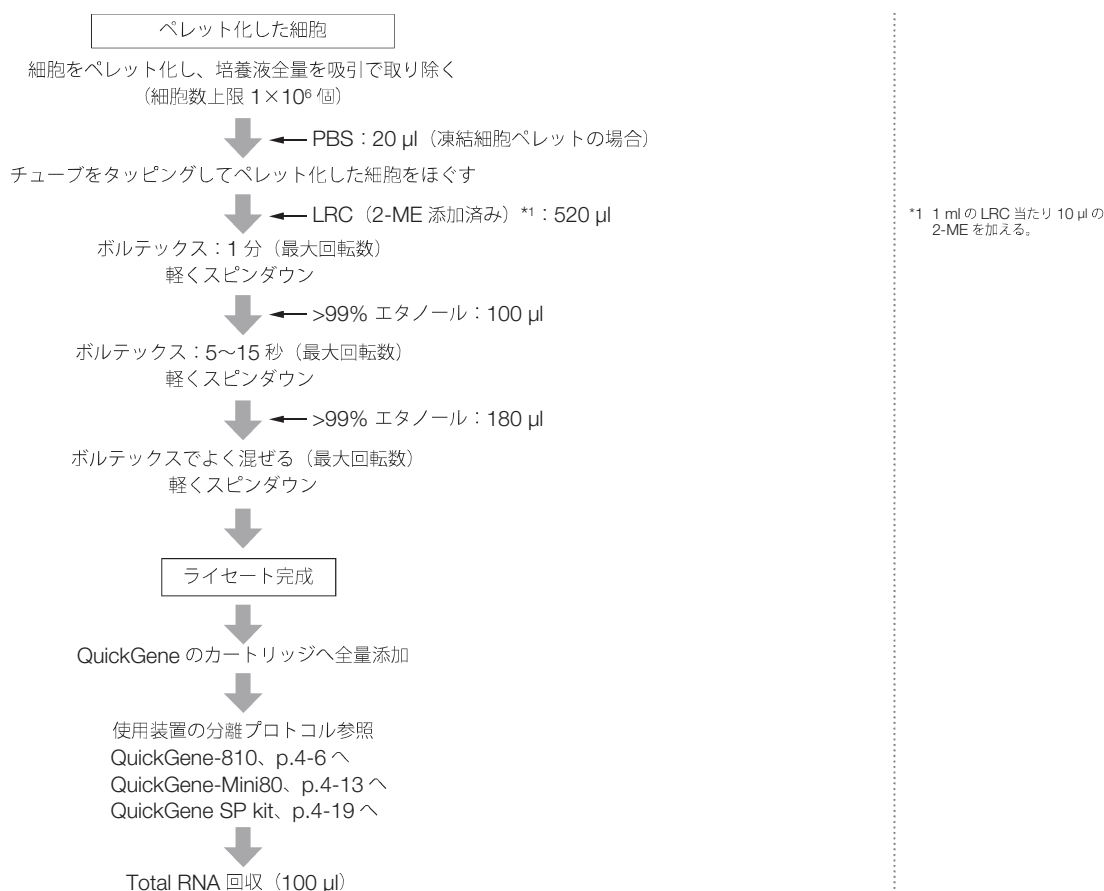
M：マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)
1：QuickGene
2：スピнкаラム法 (A 社)
N：ネガティブコントロール

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)

HL60 培養細胞からの total RNA分離 (~1×10⁶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 ⁶	9.7

■ タンパク質の混入 : A260/280

	細胞数	A260/280
HL60	1.0 × 10 ⁶	1.88

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

	細胞数	A260/230
HL60	1.0 × 10 ⁶	2.08

■ その他

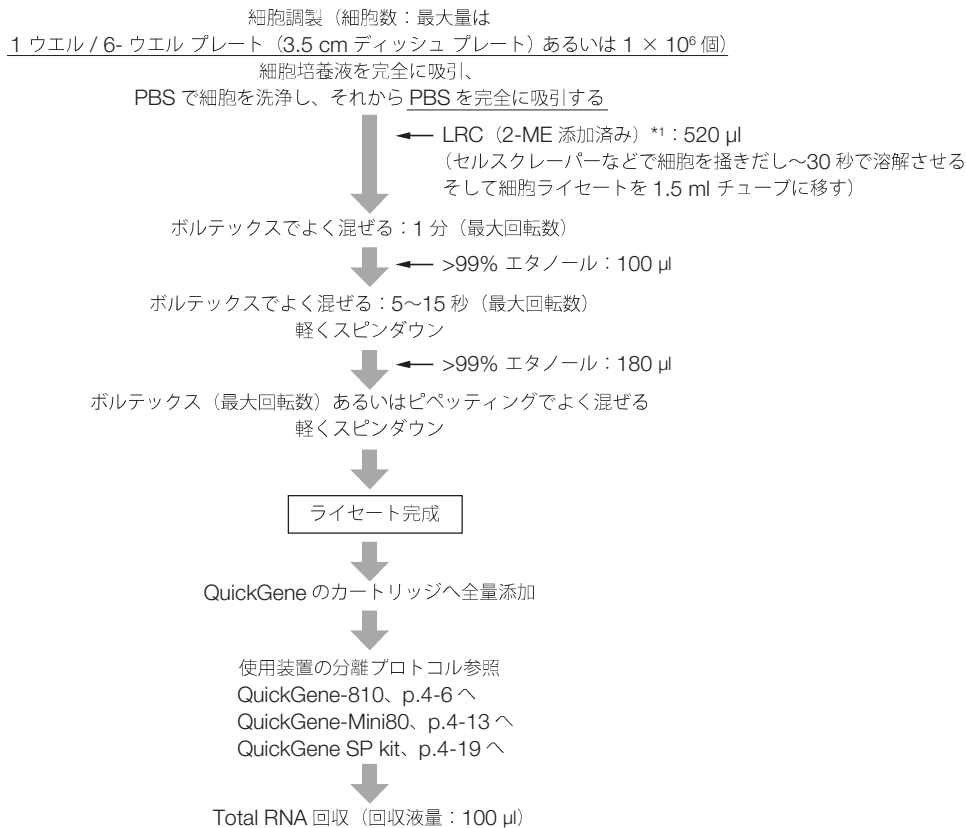
データなし

■ 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 μ 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
1×10^6	1.77

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

その他

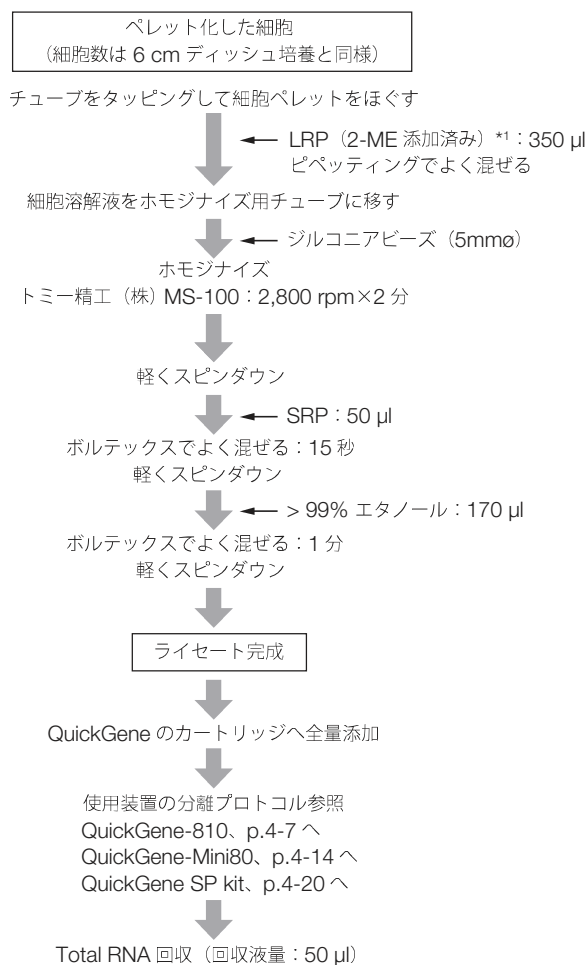
データなし

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 μ 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 (μ g)
1×10^6	13.4

■ タンパク質の混入 : A260/280

リンパ球細胞数	A260/280
1×10^6	1.67

■ カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

■ その他

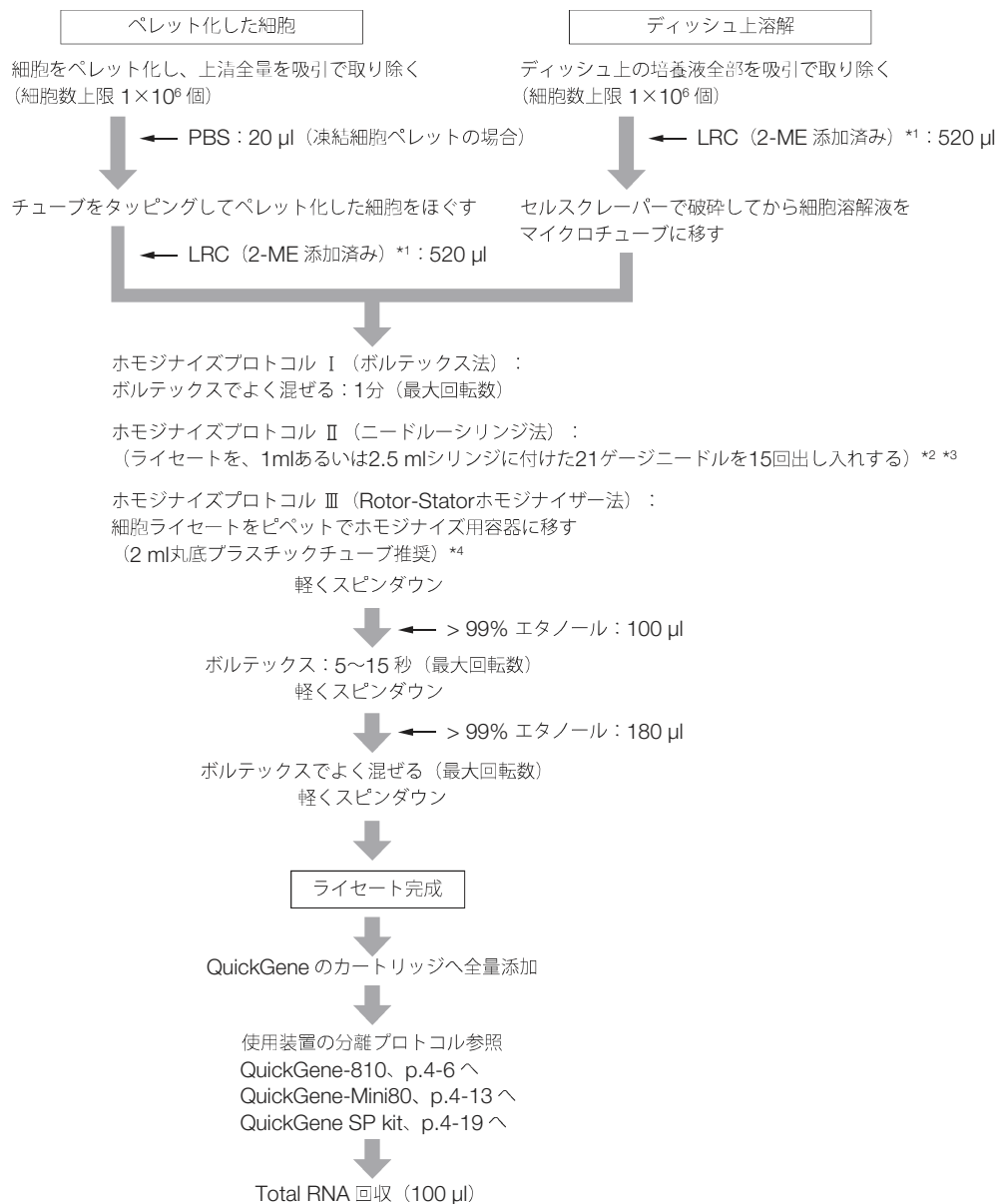
データなし

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 (～1×10⁶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。

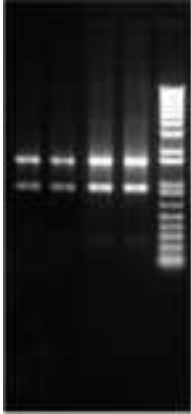
*4 ホモジナイズ
条件例: 20,000 rpm、30 秒、2 回
5 mmφ あるいは 7 mmφ プロブ使用。

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	0.3×10^6	I	15.6
	1.2×10^6	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	0.3×10^6	I	2.17
	1.2×10^6	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	0.3×10^6	I	2.18
	1.2×10^6	II	2.22

その他

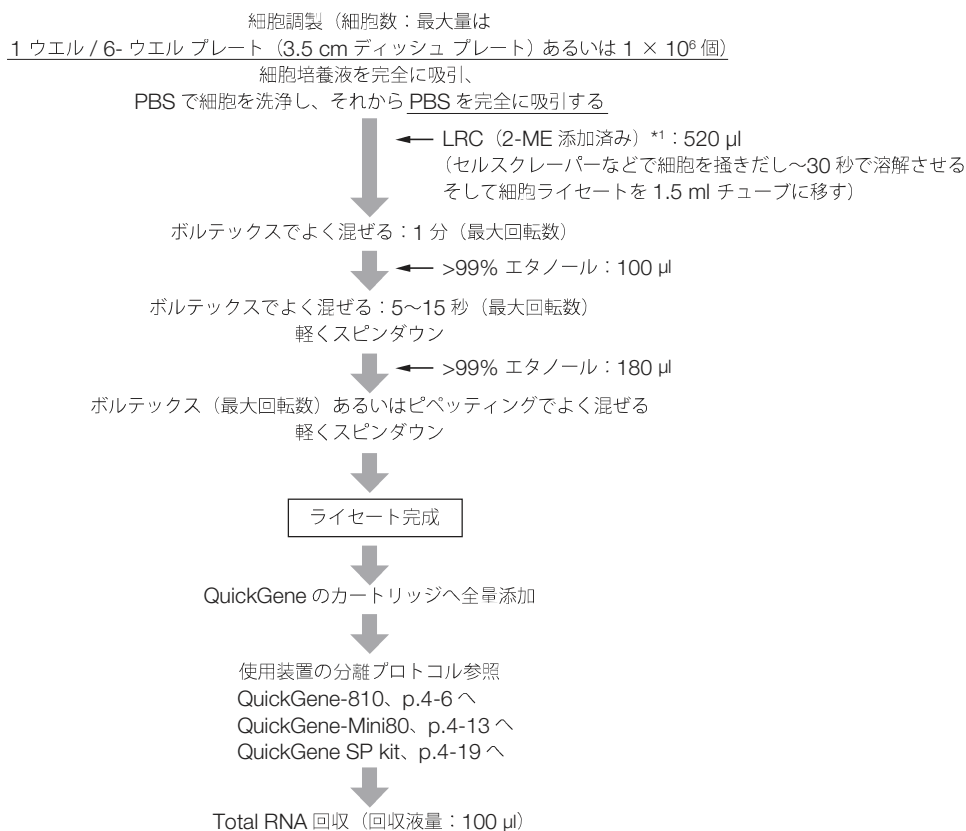
データなし

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 μ 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 (μ g)
約 1×10^5	1.2

タンパク質の混入 : A260/280

歯根膜細胞数	A260/280
約 1×10^5	1.9

カオトロピック塩の混入 : A260/230

歯根膜細胞数	A260/230
約 1×10^5	1.2

その他

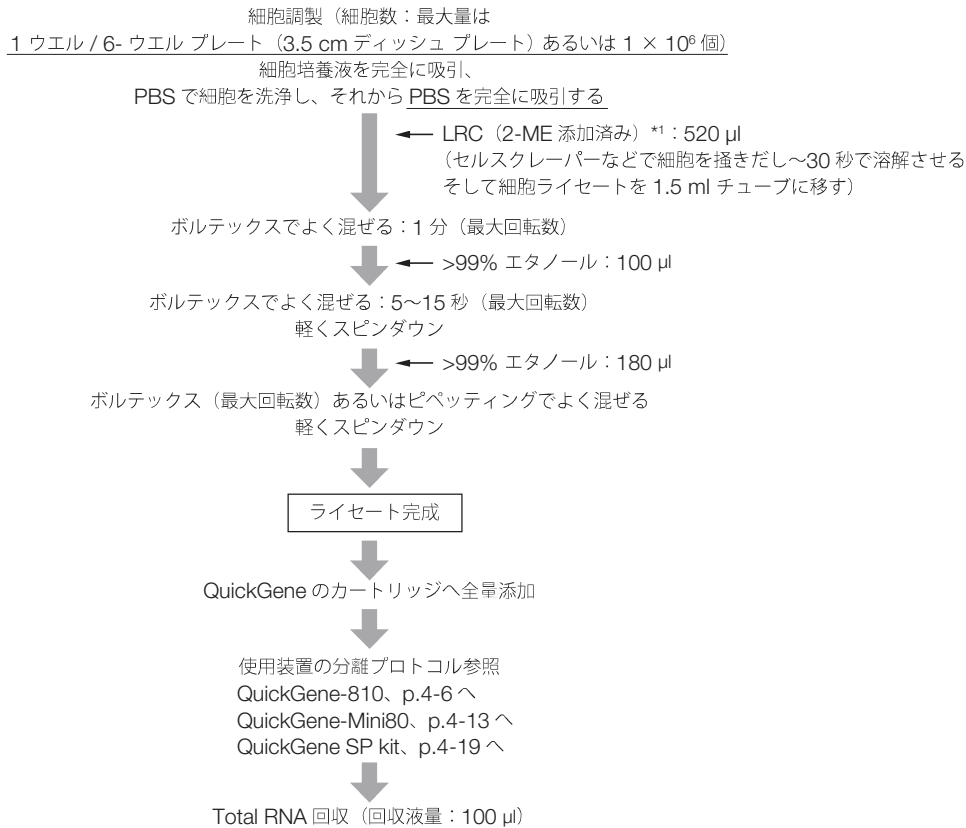
データなし

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 μ 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 (μ 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

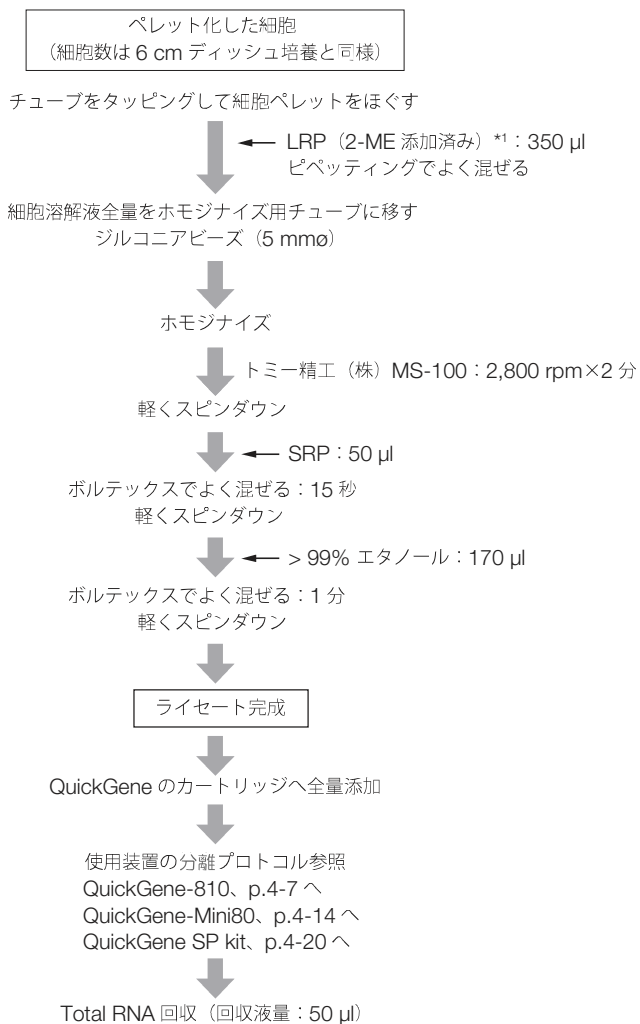
データなし

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 (μg)	
		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

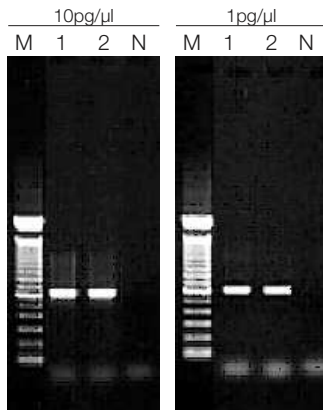
データなし

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 ($10\text{pg}/\mu\text{l}$ or $1\text{pg}/\mu\text{l}$) 中の β -actin mRNA をテンプレートにして RT-PCR を行った。

HL60 (5×10^6 個の細胞)



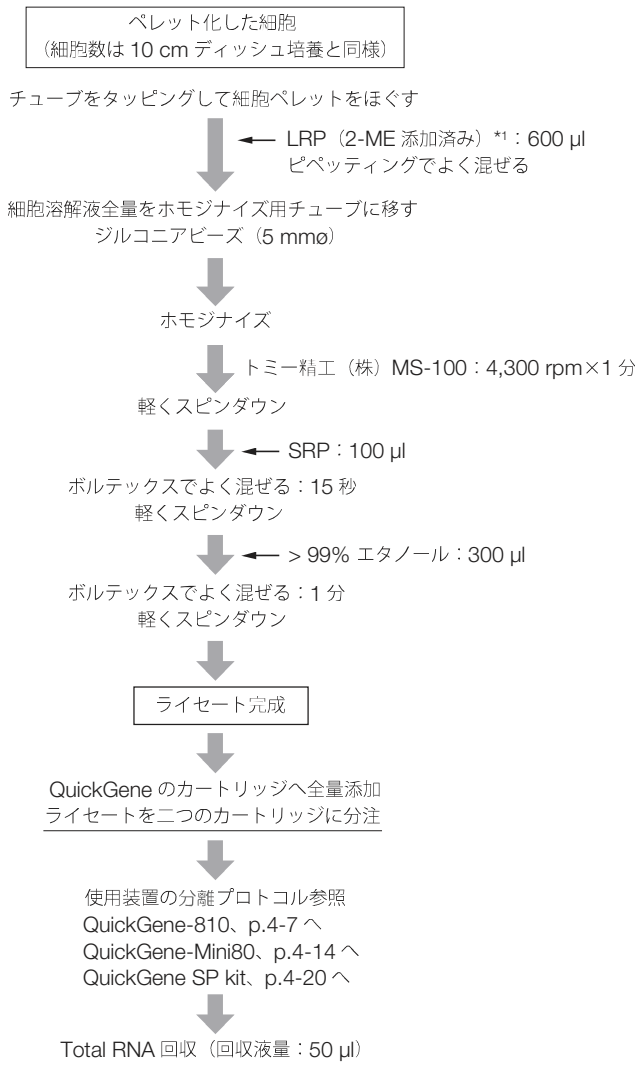
M：マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)
1：QuickGene
2：スピнкаラム法 (A 社)
N：ネガティブコントロール

Total RNA ($1\text{pg}/\mu\text{l}$) 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 (μg)			
		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。

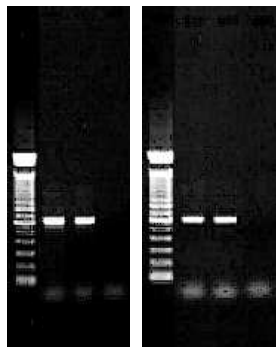
その他

• 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/ 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。

HL60 (15×10^6 個の細胞)

10pg/ μl				1pg/ μl			
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

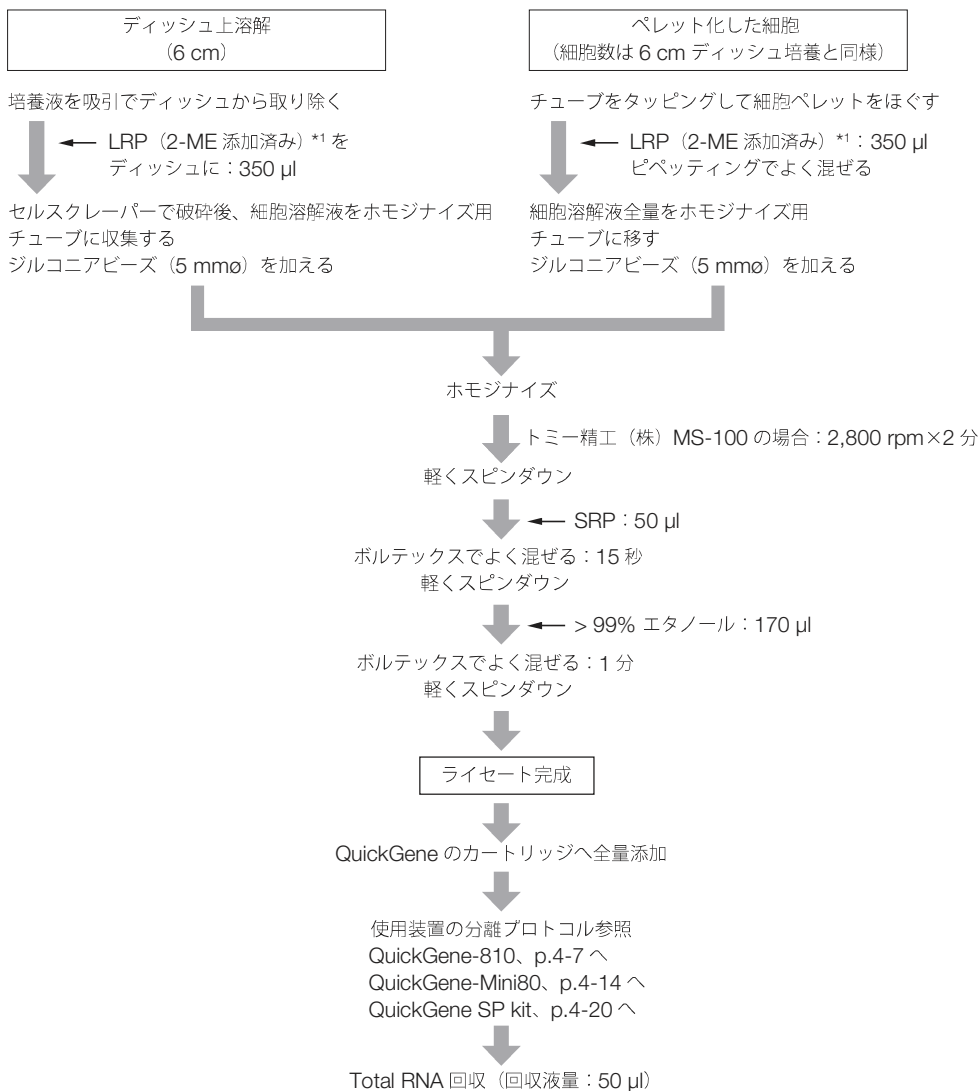
Total RNA (1pg/ μl) で行った RT-PCR に対して、増幅産物のバンドに似たバンドが両方のキットで検出された。

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 (μg)	
		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

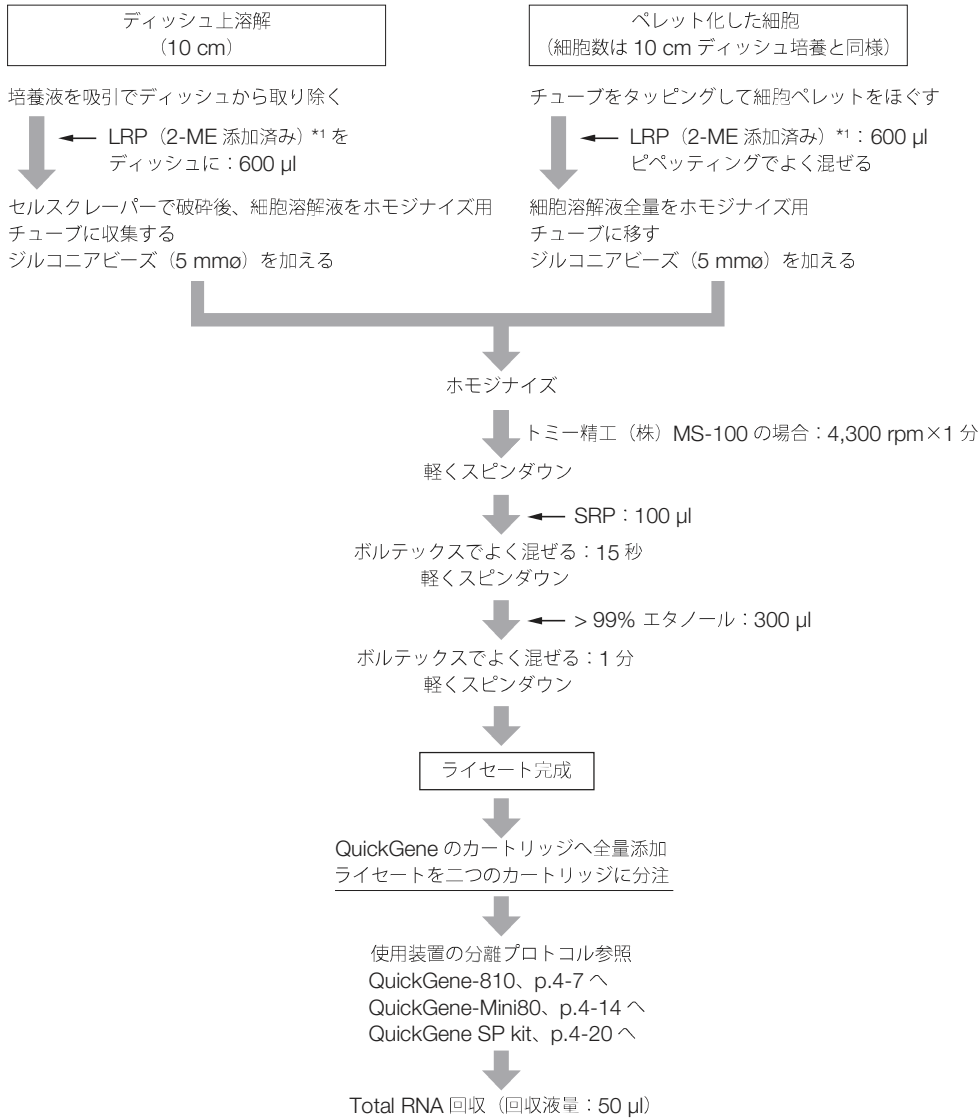
■ その他

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 (μg)			
		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

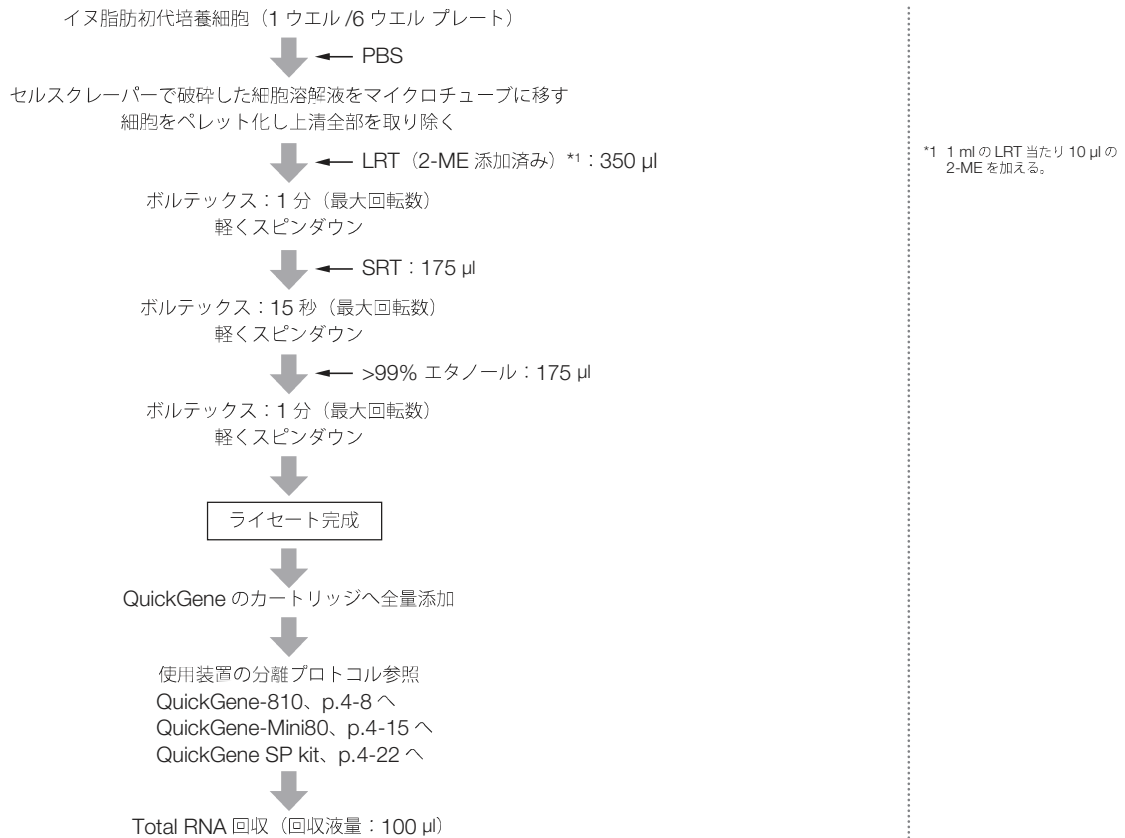
共通プロトコルサンプル

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

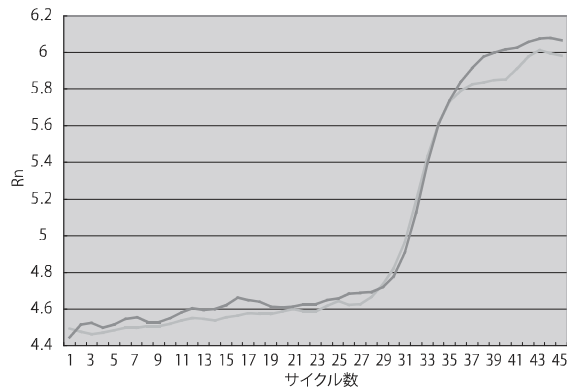
カオトロピック塩の混入 : A260/230

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。



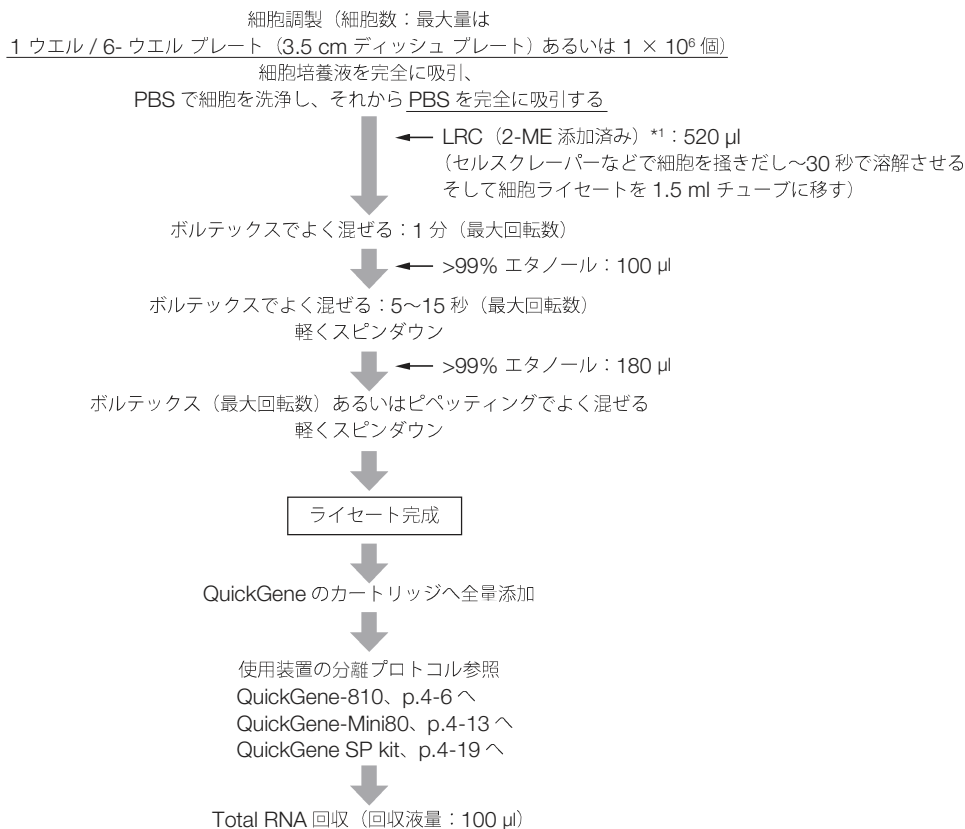
* 両方とも、QuickGene システムで分離した total RNA に対するデータである。

■ 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 μ l の
2-ME を加える。

結果

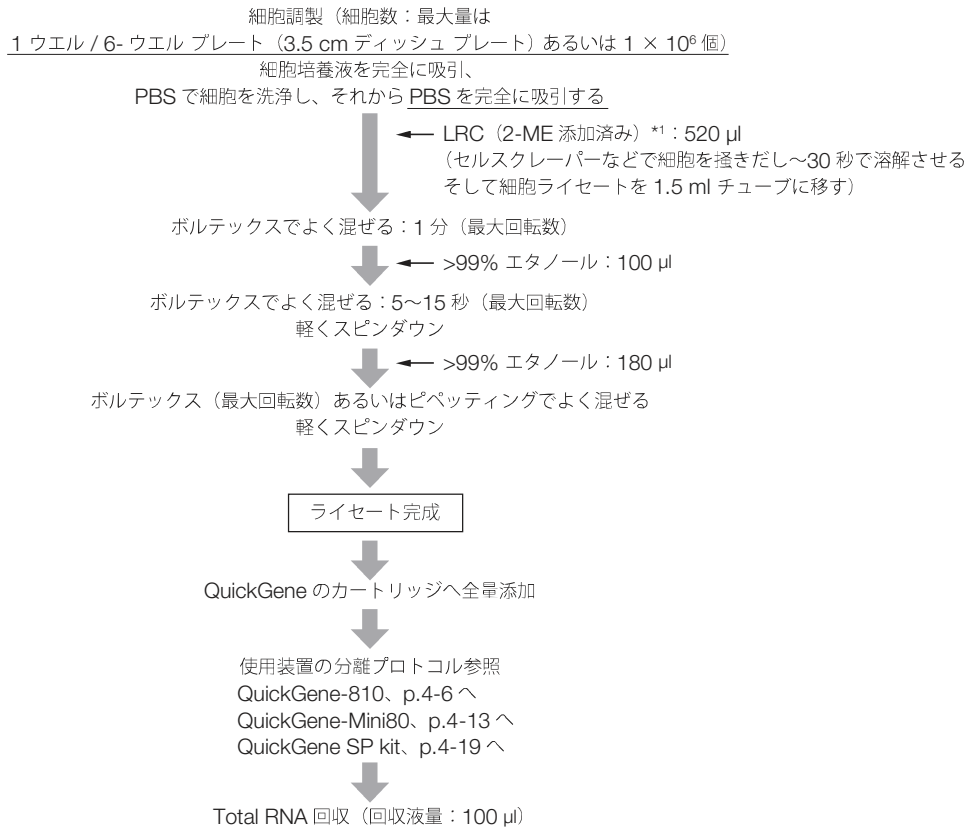
- 電気泳動図
データなし
- Total RNA の収量
データなし
- タンパク質の混入: A260/280
データなし
- カオトロピック塩の混入: A260/230
データなし
- その他
 - PCR
PCR 成功

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 μ 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 (μ g)
1×10^6	9.7

タンパク質の混入: A260/280

MCF-7 細胞数	A260/280
1×10^6	2.06

カオトロピック塩の混入: A260/230

MCF-7 細胞数	A260/230
1×10^6	2.10

その他

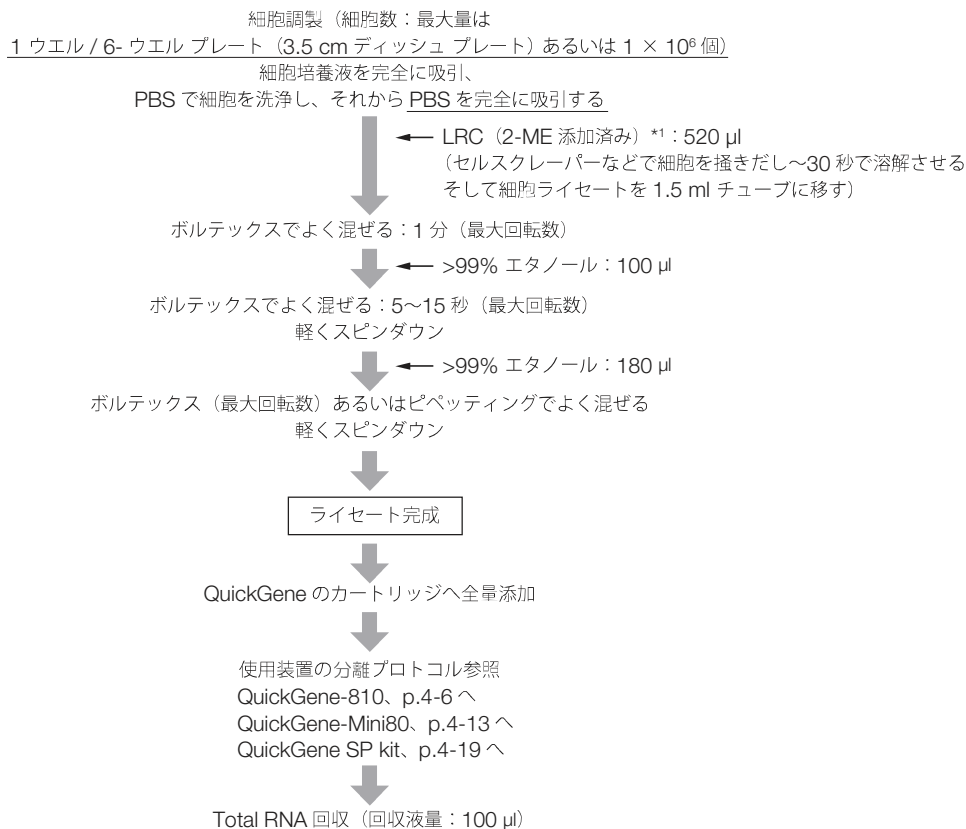
データなし

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 μ 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 (μ g)
1×10^6	約 20.0

タンパク質の混入 : A260/280

PC12 細胞数	A260/280
1×10^6	1.75

カオトロピック塩の混入 : A260/230

データなし

その他

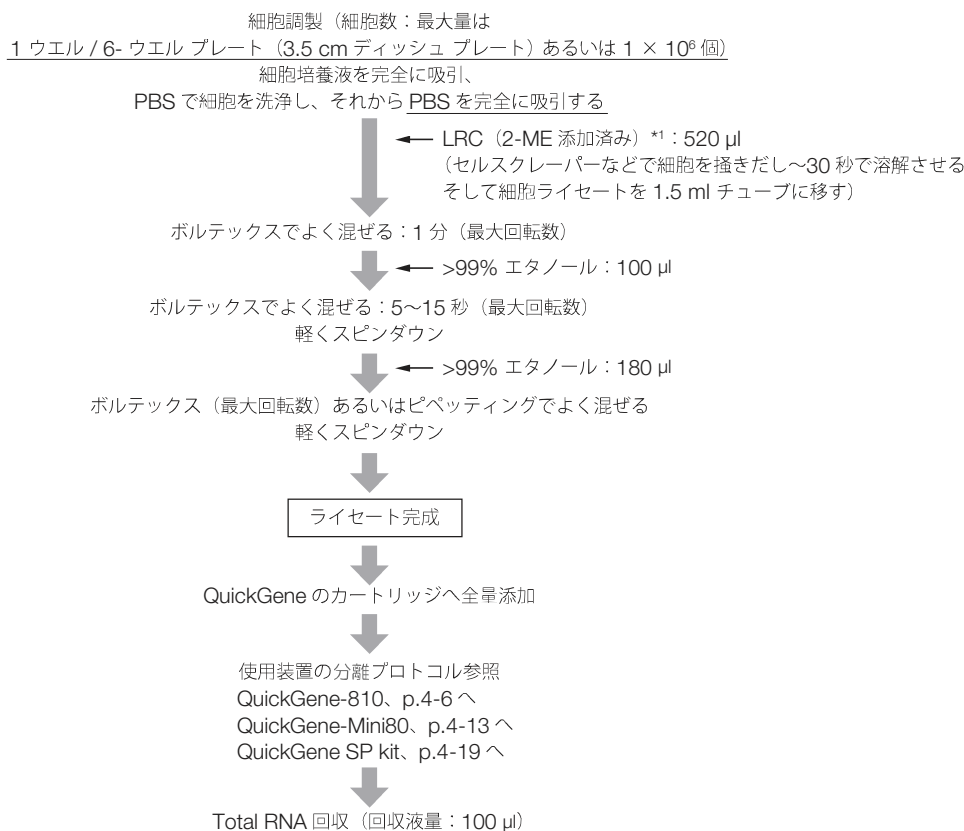
データなし

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 μ 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
(1×10^6 個以上の細胞は使用しないでください)



← PBS : 20 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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



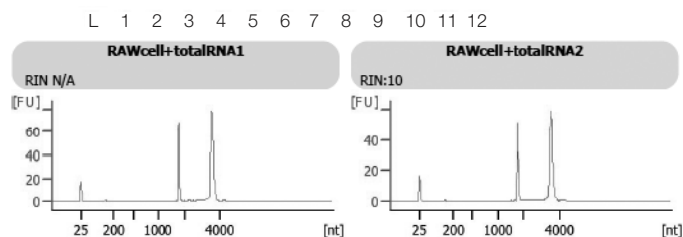
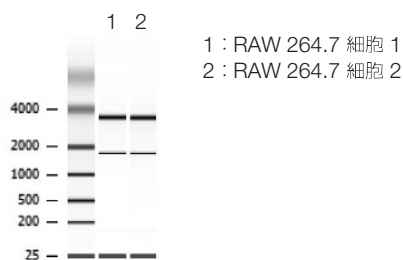
total RNA 回収 (溶出液量 : 50 μ l)

*1 1 ml の LRT に対し、10 μ 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。

