



ハンドブック

RNA 組織キット
QuickGene-AutoS RNA tissue Kit
(AS-RT)

Ver.1.0

Contents

1. はじめに	4
2. キット内容物と保存条件	4
2 - 1. キット内容物	4
2 - 2. 保存条件	4
2 - 3. 試薬ストリップの内容物.....	5
3. キット以外にご準備いただくもの.....	5
4. 取扱上の安全注意事項	7
5. 使用上の注意事項	8
6. 品質管理	10
7. 製品説明	10
8. プロトコール	11
8 - 1. 試薬の準備.....	11
8 - 2. ライセート作製プロトコール.....	12
8 - 3. 試薬ストリップの準備.....	16
8 - 4. QG-Auto12S/24S 分離操作.....	17
9. トラブルシューティング.....	18
10. オーダーリング・インフォメーション	21

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。
診断および臨床用試薬として使用しないでください。

1. はじめに

本キットは、QuickGene-Auto12S(以下 QG-Auto12S)、あるいは QuickGene-Auto24S(以下 QG-Auto24S)の抽出工程で使用する試薬を処理サンプル個別に封入した試薬キットです。

本キットの特徴は以下のとおりです。

- 本キットと QG-Auto12S、あるいは QG-Auto24S をご使用いただくことにより、簡便に動物組織(5~30mg)から total RNA を抽出することができます。
- 抽出時間は以下のとおりです。
 - QG-Auto12S: 約 30 分 *12 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
 - QG-Auto24S: 約 30 分 *24 サンプル同時に抽出操作を行うことができます。
- タンパク質やカオトロピック塩を含まない、高純度の total RNA が得られます。得られた高品質の total RNA は RT-PCR、ノーザンブロットリングなどのアプリケーションに適しています。

2. キット内容物と保存条件

2 - 1. キット内容物

以下の内容物が入っていますので確認してください。

キットには 48 処理分のゲノム DNA 抽出試薬と消耗品が含まれています。

<input type="checkbox"/> Lysis Buffer LRT	42.5 ml
<input type="checkbox"/> Solubilization Buffer SRT	20 ml
<input type="checkbox"/> 試薬ストリップ	48 個
<input type="checkbox"/> 1 ml Long Tips	48 個
<input type="checkbox"/> Waste Tubes	48 個

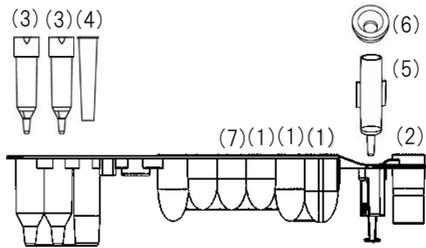
2 - 2. 保存条件

指定の温度(15°C~28°C)で保存してください。有効期限は外箱に表示しています。

2 - 3. 試薬ストリップの内容物

試薬ストリップ 1 本あたり、以下の内容物が入っています。

- | | | | | | |
|--------------------------|------------------|-----|-------------|--------|-------|
| <input type="checkbox"/> | Wash Buffer | WRT | 750 μ l | x 3 箇所 | 下図(1) |
| <input type="checkbox"/> | Elution Buffer | CRT | 250 μ l | | 下図(2) |
| <input type="checkbox"/> | Short Tip | | 2 個 | | 下図(3) |
| <input type="checkbox"/> | Tip pack | | 1 個 | | 下図(4) |
| <input type="checkbox"/> | Cartridge | | 1 個 | | 下図(5) |
| <input type="checkbox"/> | Pressure Adapter | | 1 個 | | 下図(6) |
| <input type="checkbox"/> | DNase solution* | | | | 下図(7) |



3. キット以外にご準備いただくもの

① 試薬

- 2-メルカプトエタノール(2-ME)
LRT に添加して使用
- 特級エタノール(>99%)
ライセート調整に使用

※必要に応じて用意していただく試薬

- DNase
[推奨品]
 - ・RQ1 RNase-Free DNase (Promega: Cat. No. M6101)
 - ・Deoxyribonuclease (RT Grade) (ニッポンジーン: Cat. No. 313-03161)
 - ・DNaseI, RNase-Free (Thermo Fisher Scientific: Cat. No. AM2222)
 - ・RNase-Free DNase Set (QIAGEN: Cat. No. 79254)

② 器具・機材

- QuickGene-Auto12S/QuickGene-Auto24S
- マイクロピペット

-
- マイクロピペット用チップ
 - 2 ml マイクロチューブ(サンプル用)
推奨品: BM 機器 Cat. 4020、SARSTEDT Cat.72.695.700、Cat.72.695.500S
推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にストリップ及び装置ヒーター部分との適合性を確認してください。
 - 1.5 ml or 2 ml マイクロチューブ(RNA 回収用に使用)
推奨品: BM 機器 Cat.BM4015、Cat.BM4020、SARSTEDT Cat.72.706.700
推奨品以外のチューブを使用する場合は、事前にコレクションホルダーとの適合性を確認してください。
 - チューブスタンド
 - ホモジナイザー: 下記 3 種類のホモジナイザーが使用可能です。
 - a. ボールミル型ホモジナイザー
(KURABO:PS-2000、トミー精工製 Micro Smash MS-100、またはキアゲン製 TissueLyser)
 - b. Rotor-Stator ホモジナイザー
(KINEMATICA AG 製: Polytron PT3100 など)
 - c. マイクロチューブ用ペッスルホモジナイザー^{*1}
(KIMBLE KONTES 製 PELLET PESTLE with tube 1.5ml Cat.No. 749520-0090、PELLET PESTLE Cordless Motor Cat.No.749540-0000 など)
 - ホモジナイザーに対応したチューブ
 - a. ボールミル型ホモジナイザーの場合
トミー精工製 Micro Smash MS-100 用: トミーメディコ 2ml チューブ(Cat. No.TM-625)^{*2}
キアゲン製 TissueLyser 用: Treff Lab 製 2.0ml クリックキャップ(Cat. No.96.9329.9.01)
 - b. Rotor-Stator ホモジナイザーの場合
2ml チューブなど
 - c. マイクロチューブ用ペッスルホモジナイザーの場合
ペッスル添付の 1.5ml チューブなど
 - ボール(ジルコニア 5mm φ): ボールミル型ホモジナイザーの場合
 - マイクロ遠心機(17,000×g(15,000rpm)程度の遠心が可能なもの)
^{*1} 専用モーターを使用してください。
^{*2} 滅菌済チューブは強度が弱いので避けてください。

4. 取扱上の安全注意事項

◆ SRT (Solubilization Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ WRT (Wash Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ LRT (Lysis Buffer)

薬品の特性：● 飲むと有害の可能性があります。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

● この薬品を扱う場合は適切な保護手袋および保護めがねを着用してください。

◆ WRT (Wash Buffer)

薬品の特性：● 引火性の液体を含むので、火気に十分注意してください。

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 火気に注意するとともに、吸入、皮膚への接触に十分注意してください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ CRT (Elution Buffer)

取扱上のご注意：● 目に入れたり、飲んだりしないでください。

● 目、皮膚および衣服についたときには、水で十分に洗ってください。

◆ 試薬ストリップは、指定の温度(15℃～28℃)以外での使用、保存は避けてください。

◆ LRT は、温度の高い場所での使用、保存は避けてください。

◆ LRT を含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用する場合

感染性のおそれのあるサンプルを扱う場合は、適切な保護具を着用してください。

◆ 感染性のおそれのあるサンプルを使用し、廃棄する場合

感染性産業廃棄物に該当しますので、関連する法に従い、焼却、溶解、滅菌、消毒などの処理をしてください。なお、処分業者に委託する場合は、特別管理産業廃棄物処分の許可を受けた業者へ、特別管理産業廃棄物管理票(マニフェスト)を添えて処理を委託してください。

◆ 参考情報

各試薬の性状および取り扱いに関する詳細情報は、SDS(安全データシート)をお読みください。SDS は弊

5. 使用上の注意事項

◆サンプルに関する注意事項

- 本キットは、基本的に動物組織(5~30mg)からの total RNA 分離に対応しています。

表1 ホモジナイザー種によるマウス正常組織 処理可能最大組織量
Balb/c マウス(メス、7 週齢) 正常組織での例です。

組織	ボールミル	Rotor-Stator	ペッスル
肝臓	30mg	15mg	15mg
脳	40mg	40mg	20mg
肺	30mg	15mg	15mg
腎臓	30mg	5mg	×
脾臓	30mg	20mg	10mg
胸腺	30mg	5mg	5mg
心臓	30mg	5mg	×

×：適応できません

※胸腺・心臓の場合は、他の組織と比べてホモジナイズ条件を強くする必要があります。例えばトミー精工製 Micro Smash MS-100 の場合は、ホモジナイズ時間を長くしないと、最悪の場合目詰まりのおそれがあります(表 5 p.16 参照)。

- 本キットで初めて分離されるサンプルの場合は、組織量 10 mg から分離をスタートし、予備実験を行ってください。
- 組織サンプルをホモジナイズする前に、表 1 を参考に、サンプル処理量を必ず確認してください。
- 表 1 に示した処理可能量を超えた組織量をオーバーロードしてしまうと、性能が顕著に低下し、最悪の場合カートリッジ(CA)が目詰まりを起こす可能性があります。
- 処理可能組織量は、組織の状態、部位、ホモジナイズ条件などにより変動します。組織状態、部位、ホモジナイズ条件によっては処理可能組織量が 30 mg 未満となることもあります。
- 動物から採取した新鮮な組織、または凍結保存組織(-80℃)を使用します。組織を凍結保存する際は、液体窒素で急速に凍結させ、直ちに-80℃にて保管してください。

-
- 凍結組織を使用する場合は、組織が融けないうちに速やかに所定量をはかりとってください。
 - 凍結組織を室温に放置したり、一度融解したものは使用しないでください。

◆ 試薬に関する注意事項

- LRT は保存中に析出物を生じることがあります。析出物が生じた場合は、37°Cで溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆ 操作に関する注意事項

- 全ての操作は室温(15~28°C)で行ってください。低温または高温でご使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。
- 分離途中では時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- 本キットは 100 µl の CRT で total RNA を溶出することを前提にしています。CRT 量は変更可能ですが、溶出効率が変化する可能性があります。
- 運転開始前に、以下の点を確認してください。
 - コレクションホルダーに Waste Tube、1.5 ml or 2 ml マイクロチューブ(回収用容器)がセットされていること
 - 試薬ストリップに 1 ml Long Tip、2 ml マイクロチューブ(ライセート入り)がセットされていること
 - 試薬ホルダーに試薬ストリップが正常にセットされていること
 - 試薬ホルダーのフタが完全に閉まっていること
 - 試薬ホルダー、コレクションホルダーがホルダーガイドに正しくセットされていること
- すべての操作は室温(15~28°C)で行ってください。低温または高温での使用の場合、キットの性能が発揮されないことがあります。詳しい作業環境情報については、QG-Auto12 S/24S 本体取扱説明書をお読みください。
- やむを得ない場合を除き、運転の途中で装置の電源を切らないでください。同じ工程からの運転再開はできません。
- 詳しくは、QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<RNase のコンタミネーション防止について>

- RNase のコンタミネーションを防ぐため、RNA や分離用試薬を取扱うときは、適切な手袋を着用してください。
- RNase フリーまたは滅菌したプラスチック製品のご使用をお勧めします。
- ガラスや金属製品を使う場合は 200°Cにて 16 時間以上乾熱滅菌した後、使用してください。

6. 品質管理

- 品質管理基準を設け、全てのロットで品質に問題のないことを確認しています。
- Total RNA の収量や品質は 260 nm の吸光度、260 nm/280 nm の吸光度比によって確認しています。

7. 製品説明

マウス正常組織より本キットを用いて分離した際の total RNA 収量、純度例は表 2 のとおりです。

表 2 total RNA 収量・純度例

組織	組織量	収量(μg)	A260/280
肝臓	7 mg	30.7	2.33

8. プロトコール

〔Overview Flow Chart〕



8-1. 試薬の準備

◆LRT

使用前に十分に混和してください。

析出物が生じた場合は、37°Cで溶解後、室温に戻してから使用してください。

使用前に必要な量(1 サンプルあたり 500 μ l 使用します)分注し、LRT 1 ml あたり 10 μ l の 2-メルカプトエタノール(2-ME)を添加してください。その際は適切な保護具を着用し、ドラフト内で調整してください。

◆SRT

使用前に十分に混和してください。

析出物が生じた場合は、37°Cで溶解後、室温に戻してから使用してください。

◆DNase 溶液(DNase 処理をする場合)

以下の表に従い、DNase 溶液を調整してください。

調整後は試薬ストリップの指定の箇所(p.5 試薬ストリップ内容物を参照)に添加してください。

◇各社推奨 DNase 溶液調整

製品名	メーカー名	Cat.No.	調整方法	終濃度
RQ1 RNase-Free DNase	Promega	M6101	1	20U/40 μ l
DNase I, Amplification Grade	Thermo Fisher Scientific	18068-015		
DNase I, Amplification Grade	Sigma-Aldrich	AMP-D1		
Deoxyribonuclease(RT Grade)	ニッポンジーン	313-03161		

DNase I, RNase-Free	Thermo Fisher Scientific	AM2222	2	40U/40 µl
RNase-Free DNase Set ^{※1}	QIAGEN	79254	3	3.4Kunitz units/4 µl

※1: 1,500Kunitz units の入ったボトルに添付の RNase フリー水を 550 µl 添加後、DNase ストック溶液を調整してください(DNase 添付の取扱説明書も参照してください)。

調整方法 1)

1U / µl DNase I	20 µl
10× Reaction Buffer	4 µl
ヌクレアーゼフリー水	16 µl

調整方法 2)

2U / µl DNase I	20 µl
10× Reaction Buffer	4 µl
ヌクレアーゼフリー水	16 µl

調整方法 3)

2.7Kunitz units / µl DNase I ^{※2}	1.25 µl
Buffer RDD	35 µl
ヌクレアーゼフリー水	3.75 µl

※2: QIAGEN 社プロトコールどおりに DNase 溶液を調整すると、DNase 活性が過剰となる可能性があります。上記条件での DNase 溶液調整をお勧めします。

8-2. ライセート作製プロトコール

本キットは、基本的に動物組織 5~30 mg からの RNA 分離に対応しています。

【分離を始める前の重要事項】

- 試薬類は室温に戻してから使用してください。
- 試薬の液量はライセート作製フロー(p.13、15)に記載された液量を厳守してください。
- クロスコンタミネーションを防ぐために毎回ピペットチップを交換することをお勧めします。
- すべての操作は室温(15~28°C)で行ってください。
- 分離の途中で時間をおかず、操作は素早く行ってください。
- LRT を含む溶液や廃液は、絶対に漂白剤と混合しないでください。
- 感染性のあるサンプルを使用し、使用後廃棄する場合は、感染性産業廃棄物に該当しますので、適切な処理を行ってください。

【分離を始める前の確認事項】

使用する組織量によってライセート作製プロトコルが異なりますので、組織量をご確認の上適切なプロトコルを選んでください。

15～30mg : p.13

5～15mg : p.15

組織量 15～30 mg: ライセート作製フロー



ご注意

<1>から<5>の工程の順序は必ずお守りください。

順序を変えた場合、目的の収量が得られない可能性があります。

- 薬品による負傷、感染リスクを抑えるため、適切な保護具を着用してください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はスクレーパーの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<1>動物から切除した新鮮もしくは凍結組織を準備してください。

使用する動物組織重量を決めてください。

表 1 を参考に、使用する組織量を決めてください。組織量が多すぎた場合、目詰まり、顕著な収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、組織量を減らして検討してください。表 1 に載っていない組織種の場合は、使用組織量を 10 mg とし、組織量 5～15 mg のライセート作製プロトコル(p.15)に従って処理を行ってください。

<2>組織をハサミ、ハンマーなどで 1.5 ～ 2 mm 角の小ブロックにし、動物組織重量を測定し、各ホモジナイザーに対応したチューブに入れてください(3-② p.5)。ボールミル型ホモジナイザーを用いる場合は、対応したチューブにあらかじめ 5 mm φ ジルコニアボールを入れておき、組織をはかりとってください。

組織重量測定は速やかに行ってください。凍結組織重量測定時には RNA の分解を避けるため、できるだけ凍結状態を保ったまま秤量してください。ドライアイスや液体窒素中に凍結サンプルが入ったチューブを立てるなどして、LRT(2-ME 添加済み)を添加するまで凍結状態を保ってください。

<3>LRT(2-ME 添加済み)を 500 μl 添加し、LRT 中で組織をホモジナイズしてください。ペッスルをご使用の場合は、最初に 200 μl を添加し、後から 300 μl 追加します(<3c>参照)。組織の破砕およびホモジナイズには、下記<3a> ～ <3c>の方法があります。ホモジナイザーによって上限処理量が異なりますので、表 1(p.8)を参照して、実験を開始してください。それぞれの装置の取扱説明書をよくお読みになり、ホモジナイズしてください。

凍結したチューブに LRT を添加する際、チューブの中身が吹き出したりチューブが割れないように注意してください。

<3a>ボールミル型ホモジナイザーの場合

5 mm φ ジルコニアボールをあらかじめ入れたホモジナイザー用チューブ(3-②p.5)に重量を測定した組織サンプルを入れます。500 μl の LRT を加え、装置添付の説

明書に従って、サンプルが均一になるまでホモジナイズしてください。

回転数や処理時間は、組織種類や状態によって変動します。ホモジナイズ条件例は下記のとおりです。3-②(p.5)を参照して、必ず指定されたチューブを使用してください。

表 3: 組織量 15~30 mg の場合のボールミル型ホモジナイズ条件例

	KURABO PS-2000	トミー精工製 Micro Smash MS-100	キアゲン製 TissueLyser
肝臓・脳・ 肺・ 腎臓・脾臓	3,800 rpm 60 秒 × 2 回	3,800 rpm 300 秒	30Hz 5 分 × 2 回
心臓	3,800 rpm 60 秒 × 2 回	3,800 rpm 300 秒 × 3 回	

<3b>Rotor-Stator ホモジナイザーの場合

重量を測定した組織サンプルを、適切なサイズのホモジナイザー用チューブに入れます。7 mm φ のプローブを用いる場合は、2 ml マイクロチューブなどを使用してください。500 μl の LRT を加え、速やかに Rotor-Stator ホモジナイザーを用いて 20,000 rpm にて 30 秒間 × 2 回ホモジナイズしてください。

10 mm φ 以上のプローブの場合はさらに大きなサイズのチューブが必要です。回転数や処理時間は、組織種類や状態によって変動します。組織破片が見られる場合は、処理時間を延長してください。また泡がチューブからあふれないように注意してください。プローブをチューブの壁につけてホモジナイズすると、幾分泡が立ちにくくなります。

<3c>マイクロチューブ用ベッスルホモジナイザーの場合

ベッスルホモジナイザーでは処理できない組織もあります(表 1 p.8 参照)。

重量を測定した組織サンプルを 1.5 ml チューブに入れます。200 μl の LRT を加え、専用モーターにベッスルを取り付け、速やかに 1 分間以上ホモジナイズしてください。ベッスルをチューブの底に押し付けてはやや浮かす、を繰り返してください。ホモジナイズ完了後、300 μl の LRT を添加し、ボルテックスを 15 秒行ってください。

十分にホモジナイズできていない場合、表 1(p.8) 提示の処理量以下でも目詰まりする可能性があります。

<4>組織破片を分離除去するため、 $\geq 17,000 \times g$ ($\geq 15,000\text{rpm}$) で 3 分、室温にて遠心します。底に沈んだ組織破片などを吸い込まないように注意して、ホモジネート上清 385 μl を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移します。

組織破片を持ち込むと、目詰まりの可能性があります。組織破片がうまく分離できないときや、泡が気になる場合は、遠心の回転数および遠心時間を増やしてください。やむを得ず放置される場合、1 時間までは収量に影響を与えません。<5>以降は途中で止めずに最後まで続けて操作を行うようにしてください。

<5>SRT を 175 μl 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します。

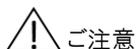
<3>~<4>にてホモジネートをロスした場合は、SRT 液量および<6>のエタノール液量比を「ホモジネート:SRT:エタノール=11:5:4」に調節してください。

<6>特級エタノール(>99%)を 140 μl 添加し、最大回転数で 1 分間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します(ライセート完成)。

このステップでボルテックスを充分行わないと、収量が低下することがあります。

ライセート完成後は、速やかに QuickGene-Auto12S にて分離操作を行ってください。

組織量 5 ~ 15 mg:ライセート作製フロー



ご注意

<1>から<5>の工程の順序は必ずお守りください。

順序を変えた場合、目的の収量が得られない可能性があります。

- 薬品による負傷、感染リスクを抑えるため、適切な保護具を着用してください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

<1>動物から切除した新鮮もしくは凍結組織を準備してください。

使用する動物組織重量を決めてください。

表 1 を参考に、使用する組織量を決めてください。組織量が多すぎた場合、目詰まり、顕著な収量減少、精度低下の可能性があります。目詰まりした場合は、組織量を減らして検討してください。表 1 に載っていない組織種の場合は、使用組織量を 10 mg としてください。

<2>組織をハサミ、ハンマーなどで 1.5 ~ 2 mm 角の小ブロックにし、動物組織重量を測定し、各ホモジナイザーに対応したチューブに入れてください(3-② p.5)。ボールミル型ホモジナイザーを用いる場合は、対応したチューブにあらかじめ 5 mmφ ジルコニアボールを入れておき、組織をはかりとってください。

組織重量測定は速やかに行ってください。凍結組織重量測定時には RNA の分解を避けるため、できるだけ凍結状態を保ったまま秤量してください。ドライアイスや液体窒素中に凍結サンプルが入ったチューブを立てるなどして、LRT(2-ME 添加済み)を添加するまで凍結状態を保ってください。

<3>LRT(2-ME 添加済み)を 500 μl 添加し、LRT 中で組織をホモジナイズしてください。ペッスルをご使用の場合は、最初に 200 μl を添加し、後から 300 μl 追加します(<3c>参照)。組織の破碎およびホモジナイズには、下記<3a> ~ <3c>の方法があります。ホモジナイザーによって上限処理量が異なりますので、表 1(p.8)を参照して、実験を開始してください。それぞれの装置の取扱説明書をよくお読みになり、ホモジナイズしてください。

凍結したチューブに LRT を添加する際、チューブの中身が吹き出したりチューブが割れないように注意してください。

<3a>ボールミル型ホモジナイザーの場合

5 mmφ ジルコニアボールをあらかじめ入れたホモジナイザー用チューブ(3-②p.5)に重量を測定した組織サンプルを入れます。500 μl の LRT を加え、装置添付の説明書に従って、サンプルが均一になるまでホモジナイズしてください。

回転数や処理時間は、組織種類や状態によって変動します。ホモジナイズ条件例は下記のとおりです。3-②(p.5)を参照して、必ず指定されたチューブを使用してください。

表 5: 組織量 15~30 mg の場合のボールミル型ホモジナイズ条件例

	KURABO PS-2000	トミー精工製 Micro Smash MS-100	キアゲン製 TissueLyser
肝臓・脳・	3,800 rpm 60 秒 × 2 回	3,800 rpm 120 秒	30Hz 5 分

肺・ 腎臓・脾臓			×2回
心臓	3,800 rpm 60 秒 × 2 回	3,800 rpm 300 秒	

<3b>Rotor-Stator ホモジナイザーの場合

重量を測定した組織サンプルを、適切なサイズのホモジナイザー用チューブに入れます。7 mm φ のプローブを用いる場合は、2 ml マイクロチューブなどを使用してください。500 μl の LRT を加え、速やかに Rotor-Stator ホモジナイザーを用いて 20,000 rpm にて 30 秒間×2 回ホモジナイズしてください。

10 mm φ 以上のプローブの場合はさらに大きなサイズのチューブが必要です。回転数や処理時間は、組織種類や状態によって変動します。組織破片が見られる場合は、処理時間を延長してください。また泡がチューブからあふれないように注意してください。プローブをチューブの壁につけてホモジナイズすると、幾分泡が立ちにくくなります。

<3c>マイクロチューブ用ベッスルホモジナイザーの場合

ベッスルホモジナイザーでは処理できない組織もあります(表 1 p.8 参照)。

重量を測定した組織サンプルを 1.5 ml チューブに入れます。200 μl の LRT を加え、専用モーターにベッスルを取り付け、速やかに 1 分間以上ホモジナイズしてください。ベッスルをチューブの底に押し付けてはやや浮かす、を繰り返してください。

ホモジナイズ完了後、300 μl の LRT を添加し、ボルテックスを 15 秒行ってください。十分にホモジナイズできていない場合、表 1(p.8) 提示の処理量以下でも目詰まりする可能性があります。

<4> 組織破片を分離除去するため、 $\geq 17,000 \times g$ ($\geq 15,000$ rpm) で 3 分、室温にて遠心します。底に沈んだ組織破片などを吸い込まないように注意して、ホモジネート上清 350 μl を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移します。

組織破片を持ち込むと、目詰まりの可能性があります。組織破片がうまく分離できないときや、泡が気になる場合は、遠心の回転数および遠心時間を増やしてください。やむを得ず放置される場合、1 時間までは収量に影響を与えません。<5>以降は途中で止めずに最後まで続けて操作を行うようにしてください。

<5> SRT を 175 μl 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します。

<3>~<4>にてホモジネートをロスした場合は、SRT 液量および<6>のエタノール液量比を「ホモジネート:SRT:エタノール=2:1:1」に調節してください。

<6> 特級エタノール(>99%)を 175 μl 添加し、最大回転数で 1 分間ボルテックスします。数秒間スピンドアウンして、マイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集します(ライセート完成)。

このステップでボルテックスを充分行わないと、収量が低下することがあります。

ライセート完成後は、速やかに QG-Auto12S/24S にて分離操作を行ってください。

8-3. 試薬ストリップの準備

- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。
- 詳しくは QG-Auto12S/24S の本体取扱説明書をお読みください。

-
- <1>作業台にコレクションホルダーと試薬ホルダーを準備します。
- <2>コレクションホルダーにウェストチューブと、1.5 ml あるいは 2.0 ml マイクロチューブをセットします。
- <3>試薬ストリップを箱から取り出して試薬ホルダーにセットし、ライセートの入った 2 ml マイクロチューブと 1 ml Long Tip を所定の位置(p.5 (4))に挿します。試薬ストリップの内容物が正しい位置にセットされていることを確認してください。

8-4. QG-Auto12S/24S 分離操作

- 運転開始前に QG-Auto12S/24S の取扱説明書をよくお読みください。
- 試薬ストリップ、各チューブを使用する際はヌクレアーゼの混入を避けるため、手袋を着用してください。

- <1> コレクションホルダーと試薬ホルダーを装置にセットします。
- <2> 装置本体の電源を入れます。
初期チェックと初期動作を行った後、ホームポジションに停止します。
- <3> ホーム画面で「RNA TISSUE」を選択します。
- <4> 「Elution Volume」欄でご希望の溶出液量を選択します。
- <5> 「Check List」欄に記載のある消耗品が、試薬ホルダーとコレクションホルダー、あるいは試薬カートリッジに装填されていることを確認します。装填されていればチェックボックスをタッチしてチェックマークを入れます。
- <6> 「Next」ボタンをタッチします。
- <7> 「Protocol Information」の記載内容を確認して「Start」ボタンをタッチすると運転が開始されます。
- 抽出操作が始まると操作パネルに抽出工程が表示されます。
 - 運転状況は工程名(LYSIS, BINDING, WASH, ELUTE, FINISH)の点滅によって確認できます。
 - 運転中は本体のフロントドアを開けないでください。万一フロントドアを開けた場合は、QG-Auto12S/24S の取扱説明書をお読みになって動作を再開してください。
 - 一時停止をする場合は、操作パネルの「Pause」ボタンをタッチしてください。終了の確認画面が表示されますので、「Yes」を押して終了してください。
- <8> 運転が終了するとピープ音が鳴り、工程名が「FINISH」と表示され点滅します。
装置が完全に停止していることを確認した後、フロントドアを開け、試薬ホルダーとコレクションホルダーを取り出し、回収チューブを取り出します。
- すぐに total RNA を使用しない場合は、チューブの蓋をしっかりと閉め、-20°C または -80°C で保存してください。

9. トラブルシューティング

トラブルが生じた場合には、以下の対策を参照してください。

(1) ホモジナイズチューブが破損した(ボールミル型ホモジナイザーの場合)

原因	対策
指定回転数以上で使用した	指定回転数以上で使用した指定された回転数で使用してください。
ホモジナイズ時の液量が足りない	所定量の LRT (500 µl) を添加してください。
指定のボール以外のボールを使った	指定のボール(ジルコニア 5 mm φ)を 1 個使用してください。
指定のホモジナイズ用マイクロチューブ以外のチューブを使った	ホモジナイザーに対応したマイクロチューブを使用してください。

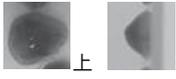
(2) RNA の収量が低い、RNA が得られない

原因	対策
組織の保存状態が悪い	組織の種類、大きさ、量、保管期間、保存条件で RNA 収量は変わります。組織をすぐに用いない場合は、液体窒素で急速に凍結後、-80℃にて保存してください。一度融けたものは使わないでください。
処理組織量が不適切	表 1 (p.8) を参照して適切な組織量範囲で分離してください。
LRT (2-ME 添加済み) 添加後のホモジナイズが不十分	8-2 <3> (p.13、15) に従い、充分ホモジナイズしてください。ボールミル型ホモジナイザーの場合は、ホモジナイザーの設定値、ボール(ジルコニア 5 mm φ)が入っていることを確認してホモジナイズしてください。
組織量に対応したプロトコルを使っていない	組織量に応じて、15 ~ 30 mg 用プロトコル (p.13) または 5 ~ 15 mg 用プロトコル (p.15) を選択してください。
LRT に 2-ME が添加されていない	LRT を使用前に必要な量分注し、LRT1 ml あたり 10 µl の 2-メルカプトエタノール (2-ME) を添加してください。
ライセート作製時、SRT または特級エタノールを所定量添加していない	SRT または特級エタノール (>99%) を所定量添加してください。ホモジナイズ工程などでロスした場合は、ホモジネート液量に合わせて SRT、特級エタノール液量を調節してください。
試薬の添加順序が不適切	ホモジネートに SRT を添加してボルテックス後、特級エタノール (>99%) を添加してください。

(3) RNA の純度が悪い

原因	対策
組織の保存状態が悪い	組織サンプルの種類、大きさ、量、保管期間、保存条件で RNA 収量は変わります。一度融解したものは使わないでください。
LRT(2-ME 添加済み)添加後のホモジナイズが不十分	8-2 <3>(p.13, 15)に従い、充分ホモジナイズしてください。ボールミル型ホモジナイザーの場合は、ホモジナイザーの設定値、ボール(ジルコニア 5 mm φ)が入っていることを確認してホモジナイズしてください。
ライセート作製時、SRT または特級エタノールを所定量添加していない	SRT または特級エタノール(>99%)を所定量添加してください。ホモジナイズ工程などでロスした場合は、ホモジネート液量に合わせて SRT、特級エタノール液量を調節してください。

(4) カートリッジが詰まった

原因	対策
組織量に対応したプロトコールを使っていない	組織量に応じて、15 ~ 30 mg 用プロトコール(p.13)または 5 ~ 15 mg 用プロトコール(p.15)を選択してください。本キットで初めて分離する組織の場合は、10 mg から試してください。
処理組織量が多すぎる	表 1(p.8)を参照して、処理組織量を下げてください。 例)肝臓 30 mg のサイズ 
LRT(2-ME 添加済み)添加後のホモジナイズが不十分	8-2 <3>(p.13, 15)に従い、充分ホモジナイズしてください。または、ホモジナイズ時間を延長してください。ボールミル型ホモジナイザーの場合、ホモジナイザーの設定値、ボール(ジルコニア 5 mm φ)が入っていることを確認してホモジナイズしてください。 例)肝臓ホモジナイズ後の状態例 
ホモジナイズ後遠心を行い、上清を分取する際に、上清と一緒に残渣をとってしまった	遠心操作を繰り返すか、遠心時間を延長して、残渣を確実に取り除いてください。
ライセート作製時、SRT または特級エタノールを所定量添加していない	SRT または特級エタノール(>99%)を所定量添加してください。ホモジナイズ工程などでロスした場合は、ホモジネート液量に合わせて SRT、特級エタノール液量を調節してください。

(5) RNA が分解した

原因	対策
組織の保存方法が不適切	組織をすぐに用いない場合は、液体窒素で急速に凍結後、 -80°C にて保存してください。一度融けた組織は使わないでください。
LRT に 2-ME が添加されていない	LRT を使用前に必要な量分注し、LRT1 ml あたり 10 μl の 2-メルカプトエタノール(2-ME)を添加してください。
RNase のコンタミネーション	すべての試薬、カートリッジ(CA)が RNase フリーであることは確認済みですが、操作中・保存中に RNase が混入する可能性があります。RNase の混入がないように注意してください。
DNase への RNase の混入 (DNase 処理を行う場合)	推奨している RNase-Free DNase を使用してください。DNase についての詳細は各メーカーに問い合わせてください。
組織に LRT(2-ME 添加済み)添加後、室温に放置した	LRT 添加後は速やかにホモジナイズ工程へ進めてください。
RNA が加温された	RNA は加温すると分解することがあります。RNA 使用中もできるだけ氷上で取扱ってください。

(6) RT-PCR など、続けて行う実験がうまくいかない

原因	対策
使用した RNA 量が不適切	260 nm 吸光度から濃度を確認してください。
ゲノム DNA の混入	DNase 処理を行ってください。DNA の分解が不完全の場合は、(7)を参照してください。
RNA の分解	(5)「RNA が分解した」参照

(7) DNA の分解が不完全(DNase 処理ありの場合)

原因	対策
推奨ではない DNase を使用した	3-①(p.5)を参照して、推奨の DNase を使用してください。
DNase 活性量が不十分	推奨の DNase 活性量を使用してください。

10. オーダーリング・インフォメーション

製 品	内 容	Cat #
QuickGene-AutoS DNA Blood Kit	48 回入	AS-DB
QuickGene-AutoS DNA Tissue Kit	48 回入	AS-DT
QuickGene-AutoS Plasmid Kit	48 回入	AS-PL
QuickGene-AutoS RNA Blood Kit	48 回入	AS-RB
QuickGene-AutoS RNA Tissue Kit	48 回入	AS-RT
QuickGene-AutoS RNA Cultured Cell Kit	48 回入	AS-RC

＊トレードマークと免責事項

本取扱説明書に記載されている登録名などは、特に表示がない場合でも法律によってその権利が保証されています。



●製造元

倉敷紡績株式会社

環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

〒572-0823 大阪府寝屋川市下木田町14-30

TEL (072) 820-3079 FAX (072) 820-3095

URL; <http://www.kurabo.co.jp/bio/>