

Product Information

MirPremier™ microRNA Isolation Kit

製品番号 **SNC10、SNC50**
室温で保存してください。

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

手順

small RNA 単離

哺乳類培養細胞.....	3
哺乳類組織.....	5
植物組織.....	6
培養酵母および培養細菌.....	8

全 RNA 分離

哺乳類培養細胞.....	10
哺乳類組織.....	11
植物組織.....	12
培養酵母および培養細菌.....	13

結果.....	14
---------	----

製品概要

micro RNA (miRNA) は約 21 ヌクレオチド (nt) からなる small RNA 分子の一種であり、翻訳抑制、mRNA 切断、および脱アデニル化などの様々な遺伝子発現調節を行います。Sigma 社の MISSION Small RNA Purification Kit は miRNA およびその他種々の生物学的ソース (哺乳類培養細胞、動物組織、植物組織、培養微生物) 由来の small RNA の精製および濃縮のための迅速かつ効率的な方法を提供します。また有害な有機抽出法を用いませぬ。また、メッセジャーRNA (mRNA) やその他の高分子 RNA が関心の対象である場合には、本キットも用いて全 RNA の単離も行うことができます。

small RNA 調製

MISSION Small RNA Purification Kit は簡潔かつ最新の方法で miRNA および他の small RNA を単離するための新規な化学的単離法を利用します。フェノールおよびクロロホルムは用いませぬ。生体サンプルは溶解ミックス中に溶解し、そこで small RNA が放出され、また同時にリボヌクレアーゼおよび植物組織に存在する可能性のある干渉性二次代謝産物が不活性化されます。高分子 RNA およびゲノム DNA は不溶性であり、ライセートから他の細胞残骸と共に 短時間の遠心により除去されます。

次に small RNA はアルコール存在下でシリカ結合カラムに捕捉されます。残存する不純物は洗浄液により除去され、精製 small RNA は RNase フリー水中に溶出され RT-PCR、ノーザンブロットおよび他のアプリケーションに直ちに使用できます。20 µg までの small RNA を 30 分で単離できます。精製される RNA の長さは通常 200 nt 未満です。

全 RNA の調製

全 RNA の単離の際には、生体サンプルを溶解液中に溶解し、そこで全 RNA が放出され、また同時にリボヌクレアーゼおよび植物組織に存在する可能性のある干渉性二次代謝産物が不活性化されます。細胞残骸を除去した後、RNA をシリカ結合カラムに捕捉しますが、その際ゲノム DNA や多糖類の結合を阻害する独自の Binding Solution を用います。残存不純物とほとんどの残存ゲノム DNA は洗浄液により除去され、精製 RNA は RNase フリー水中に溶出され RT-PCR、ノーザンブロットおよび他のアプリケーションに直ちに使用できます。150µg までの全 RNA を 30 分で単離できます。

しかし、全 RNA サンプル中に small RNA は効率的に回収されず、そのため全 RNA 回収手順は small RNA の回収には推奨されませぬ。

すべての DNA を RNA サンプルから除去する必要がある場合には、DNase I による追加の処理が推奨されます。DNase I 切断は全、RNA サンプルで On-Column DNase I Digestion Set (製品番号 DNASE10 および DNASE70) を用いて行うことができますが、その際 RNA は精製過程で Binding Column に結合させるか (付録参照)、または最終 RNA サンプルに Amplification Grade DNase I (製品番号 AMPD1) を用います。ただし、small RNA サンプルに対しカラム上での DNase I 切断は推奨いたしません。最終 small RNA サンプルは Amplification Grade DNase I で処理することもできます。

付属する試薬	製品番号	10 回分	50 回分
Small RNA Lysis Buffer	M1070	10 mL	50 mL
Lysis Solution	L8167	10 mL	50 mL
Binding Solution	L8042	2 x 10 mL	2 x 50 mL
Wash Solution 2 Concentrate	W3261	2.5 mL	15 mL
Elution Solution	E8024	1.5 mL	10 mL
Filtration Columns	C6866	10 個	50 個
Binding Column	C6991	10 個	50 個
Collection Tubes, 2 mL	T5449	4 x 10 個	4 x 50 個

本製品以外にご用意いただく試薬および器具	哺乳類培養細胞	哺乳類組織	植物組織	酵母	細菌
2-メルカプトエタノール、製品番号 M3148	必要	必要	必要	必要	必要
100% エタノール、製品番号 E7023	必要	必要	必要	必要	必要
マイクロ遠心機および 2 mL チューブ	必要	必要	必要	必要	必要
Rotor-stator ホモジナイザー		必要			
乳鉢と乳棒			必要		
液体窒素およびドライアイス			必要		
55 °C ヒートブロックまたはウォーターバス			必要		
Yeast Enzyme Stock Solution、製品番号 Y0378 Yeast Lysis Solution、製品番号 Y0253				必要	
Bacterial Enzyme Stock Solution、製品番号 B7809 Bacterial Lysis Solution、製品番号 B7934					必要
On-Column DNase I Digestion Set、製品番号 DNASE10, DNASE70	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション
DNase I, Amplification Grade、製品番号 AMPD1	オプション	オプション	オプション	オプション	オプション

ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート (MSDS) をご覧ください。

保存安定性

本キットは室温で保存してください。試薬に沈殿が生じている場合は、65 °C で沈殿が溶解するまで加熱し、室温まで冷却してからご使用ください。

RNaseの混入を避けてください。

RNase はどこにも存在する安定な酵素であり、一般に酵素活性に補助因子を要しません。内因性の RNase は溶解ステップで変性しその後 RNA 精製の際に除去されますが、RNA 調製の際に外因性の RNase を取り込まないよう注意が必要です。特に最終洗浄と溶出ステップではご注意

ください。作業領域およびピペットセットには RNase が含まれてはいけません。RNase フリーピペットチップ、好ましくはエアロゾルバリア付きのものを用いてください。常に手袋を着用し頻りに交換してください。ビンやチューブは使用時以外はフタをしてください。RNase 混入防止および RNA 取り扱いに関する詳細は、本使用説明書の末尾に一覧を示しました参考文献中に記載されています。

使用前の準備

1. エタノール希釈 Wash Solution 2 以下の表に従って適量の 100% エタノール (200 proof) を Wash Solution 2 Concentrate のボトルに加えます。手早く混合し、エタノールの揮発を避けるためきつくフタをしたエタノール希釈 Wash Solution 2 を保存します。

容量	加えるエタノールの量
10 回分	10 mL
50 回分	60 mL

2. **カラムと Collection Tube の組み立て** Filtration Column (青の固定リング) を 2 mL の Collection Tube (付属品) に挿入しフタを閉めます。同様に Binding Column (赤の固定リング) を 2 mL の Collection Tube (付属品) に挿入しフタを閉めます。哺乳類培養細胞では Filtration Column は不要であることに注意してください。

手順

I. small RNA単離—哺乳類培養細胞

1. **溶解ミックスの調製。**以下の表 1 に従い、Small RNA Lysis Buffer および Binding Solution を新しいチューブに加え、手早く混合します。溶液 1 mL につき 10 μ L の 2-メルカプトエタノールを添加します。表 2 から、調製当日に用いる溶解ミックスの全量を決めてください。溶解ミックスは精製開始直前に調製することが望まれます。使用前に溶解ミックスを室温に置いてください。

表 1. 哺乳類培養細胞用の溶解ミックス

成分	量/mL 溶解ミックス
Small RNA Lysis Buffer (M1070)	700 μ L
Binding Solution (L8042)	300 μ L

注意: 0.5 倍量の溶解ミックスと 0.5 倍量の Binding Solution を混ぜて Small RNA Lysis Buffer とした場合も、多くの培養(特に接着細胞培養)に使用でき、収量が 10~15%向上することがあります。

2. **細胞サンプルの調製。**
- a. **培養細胞の懸濁** 細胞懸濁液または遊離細胞を 300 x g 以上で 5 分間かけてペレットとします。培養液を除去します。細胞サンプルを再度遠心し、ピペットチップを用いて液滴をすべて除去します。培養液の除去が不十分な場合、結果に悪影響する可能性があります。
- b. **接着培養細胞** 培養液を除去し Hank's Balanced Salt Solution で洗浄します。洗浄液を除去します。容器を一方に傾けピペットチップを用いて液滴をすべて除去します。培養液の除去が不十分な場合、結果に悪影響する可能性があります。
3. **細胞を溶解します。**
- a. **細胞ペレット** 表 2 から、その細胞サンプルに必要な溶解ミックスの量を決めてください。細胞ペレットを 1~2 秒ボルテックスし細胞塊を緩めます。溶解ミックスを細胞ペレットに加え、ただちに穏やかかつ手短に (2~3 秒) ボルテックスし細胞ペレットを壊します。サンプルを 5 分以上置き、その間に 2~3 回穏やかにゆするかたたくなどして混合します。細胞溶解後は粗ライセートを

ボルテックスしないでください。細胞株によっては粗ライセート中に細胞残骸が存在する可能性があります。粗ライセートを 2 mL のマイクロ遠心チューブ (付属しません) に移します。

注意: 粗ライセートを過度にボルテックスした場合、ゲノム DNA がせん断され結果に悪影響を与えます。細胞ペレットを -70 $^{\circ}$ C で保存していた場合は、室温ではなく 55 $^{\circ}$ C にて 5 分間で溶解してください。

- b. **接着細胞** 表 2 から、その細胞サンプルに必要な溶解ミックスの量を決めてください。溶解ミックスを培養に加え、培養容器を回すかゆするなどして、溶解ミックスで表面を覆うようにしてください。サンプルを 5 分以上置き、その間に容器を穏やかに回すかゆするなどして 2~3 回混合します。容器を一方に傾け、粗ライセートを 2 mL のマイクロ遠心チューブ (付属しません) に移します。粗ライセート中または容器表面に細胞残骸が存在する可能性があります。特に問題はありません。

表 2. 溶解ミックスの推奨量

サンプル	細胞数または培養容器数	必要な溶解ミックスの量
細胞ペレット	10~50 万	50~100 μ L
	60 万~100 万	200 μ L
	200 万	250 μ L
	300 万	300 μ L
	400 万	400 μ L
	500 万	500 μ L
	600 万	600 μ L
接着細胞	700 万	700 μ L
	24 ウェルプレート	150 μ L/ウェル
	12 ウェルプレート	200 μ L/ウェル
	6 ウェルプレート	300 μ L/ウェル
	25 cm ² フラスコ <50% コンフルエント	500 μ L/フラスコ
	25 cm ² フラスコ 50~70% コンフルエント	600 μ L/フラスコ
25 cm ² フラスコ 80~100% コンフルエント	700 μ L/フラスコ	

4. **細胞残骸をペレットにします。**サンプルを標準的なマイクロ遠心機で 5 分間最大速度 (14,000~16,000 x g) で遠心し、細胞残骸、ゲノム DNA、高分子 RNA を除去します。上清を新しい 2 mL Collection Tube (付属品) に移し替えてください。ペレットを壊さないでください。

注意: ペレットが過度にゆるい場合は、サンプルを再度 3~5 分間遠心するか、または Filtration Column (青の固定リング) を用いて上清をろ過します。開始時の培養が少量の場合は、ペレットが見えにくい場合があります。ペレットを避けるために、遠心前にチューブにマークしてください。

5. **RNA 結合用にエタノールを加えます。** ピペットでろ過したライセートの体積を測ります。1.1 倍量の 100% エタノールをろ過したライセートに加え (例、550 μ L の 100% エタノールを 500 μ L のろ過したライセートに加えます)、ボルテックスまたは転倒混和して、ただちにかつ完全に混合します。HeLa 培養細胞の場合はエタノールを 1.5 倍量まで増やします。**チューブを遠心しないでください。**
注意: HEK293、293T、CHO、K562、Junkat、A549、D17 のようなほとんどの細胞株について、ろ過したライセートに加える 100% エタノールの最適量は 1.1 倍量です。しかし、HeLa のような特定の細胞株については、エタノールの最適量は 1.5 倍量となります。これらの 2 通りのエタノール量のどちらがご使用の細胞株に最適であるかを比較することが望まれるかもしれません。
6. **RNA をカラムへ結合させます。** 700 μ L の混合液を Binding Column (赤の固定リング) にピペットで取り、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液をデカントします。残りの混合液に対し結合ステップを繰り返します。
7. **1 回目の洗浄を行います。** 700 μ L の 100% エタノールをカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。
8. **2 回目の洗浄を行います。** Binding Column を Collection Tube (付属品) に移し換えてください。500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。

9. **3 回目の洗浄を行います。** さらに 500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムに加え、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
10. **カラムを乾燥させます。** カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して乾燥させます。残留しているフロースルー液が乾燥カラムにはねないように、遠心機からカラムチューブアセンブリーを注意して外します。
11. **RNA を溶出させます。** カラムを新しい 2 mL Collection Tube (付属品) に移し替えてください。50 μ L の Elution Solution を直接カラム内側のフィルターの中央に加えてください。開始時の培養が少量であるかまたは濃縮度の高い RNA サンプルを用いたい場合は、Elution Solution の量を 20~30 μ L まで減らします。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して溶出させます。溶出液をピペットチップに回収し、その溶液を直接カラム内側のフィルター中央へ再添加することにより溶出ステップを繰り返します。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度で 1 分間遠心して溶出させます。このとき精製された RNA は溶出液中に存在し、ただちに使用できます。あるいは -20 $^{\circ}$ C (短期間) または -70 $^{\circ}$ C (長期間) で保存できます。

II. small RNA単離 - 哺乳類組織

1. **溶解ミックスの調製。**以下の表 3 に従い、Small RNA Lysis Buffer および Binding Solution を新しいチューブに加え手短かに混合し、その後 100% エタノールを加え手短かに混合します。溶液 1 mL につき 10 μ L の 2-メルカプトエタノールを添加します。調整当日に使用する量の溶解ミックスを調製します。各標準サンプルに 700 μ L の溶解ミックスが必要です。溶解ミックスは精製開始直前に調製することが望まれます。使用前に溶解ミックスを室温に置いてください。

表 3 哺乳類組織用の溶解ミックス

成分	量/mL 溶解ミックス
Small RNA Lysis Buffer (M1070)	630 μ L
Binding Solution (L8042)	320 μ L
100% エタノール	50 μ L

2. **組織サンプルを溶解します。**700 μ L (組織 20~40 mg のとき) または 350 μ L (< 20 mg 組織のとき) の溶解ミックスを組織サンプルに加え、rotor-stator ホモジナイザーで組織を 45~50 秒間中程度の速度でホモジナイズします。サンプルを室温で 3~5 分間置きます。粗ライセートをボルテックスしないでください。
注意: 60 秒間を超えてホモジナイズしないでください。DNA の過度のせん断は最終サンプル中への DNA の混入を生ずる可能性があります。
3. **細胞残骸をペレットにします。**サンプルを標準的なマイクロ遠心機で 5 分間最大速度 (14,000~16,000 x g) で遠心し、細胞残骸、ゲノム DNA、高分子 RNA を除去します。
4. **ライセートを濾過します。**ライセート上清を Filtration Column (青の固定リング) にピペットで移します。ペレットは避けてください。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。ろ過したフロースルーライセートを保存します。
5. **RNA 結合用にエタノールを加えます。**ピペットでろ過したライセートの体積を測ります。1.1 倍量の 100% エタノールをろ過したライセートに加えます (例えば、748 μ L の 100% エタノールを 680 μ L のろ過したライセートに加えます)。ボルテックスまたは転倒混和により、ただちにかつ完全に混合します。**チューブを遠心しないでください。**
注意: 肝組織または高濃度のグリコーゲンを含む可能性のあるその他の組織を処理する場合には、100% エタノールの量を 1.5 倍量まで増やしてください。
6. **RNA をカラムへ結合させます。**700 μ L の混合液を Binding Column (赤の固定リング) へピペットで移します。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心し

ます。フロースルー液をデカントします。残りの混合液に対し結合ステップを繰り返します。

注意: 肝組織はグリコーゲンに富み、少量のグリコーゲンが各結合ステップの後に赤の固定部の遠心側の最上部に残ることがあります。このようになった場合は、グリコーゲンを除去できるように次の洗浄ステップでチューブの向きを変えてください。

7. **1 回目の洗浄を行います。**700 μ L の 100% エタノールをカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
8. **2 回目の洗浄を行います。**500 μ L の Binding Solution をカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。
注意: 脾臓組織またはリボスクレアーゼに富むその他の組織を処理する場合は、Binding Solution による正常ステップを繰り返してください。
9. **3 回目の洗浄を行います。**Binding Column を付属の Collection Tube に移し換えてください。500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
10. **4 回目の洗浄を行います。**さらに 500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムに加え、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
11. **カラムを乾燥させます。**カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して乾燥させます。残留しているフロースルー液が乾燥カラムにはねないように、遠心機からカラムチューブアセンブリーを注意して外します。
12. **RNA を溶出させます。**カラムを新しい 2 mL Collection Tube (付属品) に移し替えてください。50 μ L の Elution Solution を直接カラム内側のフィルターの中央に加えてください。開始時の培養が少量であるかまたは濃縮度の高い RNA サンプルを用いたい場合は、Elution Solution の量を 20~30 μ L まで減らします。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して溶出させます。ピペットチップに溶出液を回収し、その溶液を直接カラム内側のフィルター中央へ再添加することにより溶出ステップを繰り返します。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度で 1 分間遠心して溶出させます。このとき精製された RNA はフロースルー溶出液中に存在し、ただちに使用できます。または -20 $^{\circ}$ C (短期間) または -70 $^{\circ}$ C (長期間) で保存できます。

III. small RNA 単離 - 植物組織

1. **植物組織サンプルを調整します。**植物組織を摘出し、できるだけ速やかに液体窒素に浸し RNA の変性を避けます。適当な乳鉢と乳棒を使用して、液体窒素中で組織を粉末にしてください。組織の粉末化が不十分な場合は、RNA 収量が減る可能性があることに注意してください。最も良い方法は、乳鉢をドライアイス上に置き常に植物サンプルを凍結させておくことです。凍結組織粉末から液体窒素が揮発した後に、速やかに組織粉末を約 100 mg (90~110 mg) 秤量し、2 mL のマイクロ遠心チューブ (付属しません) に移し、ドライアイスまたは液体窒素で前冷却します。RNA 精製前は、秤量サンプルをドライアイス上に保つか、または -70 °C で保存します。チューブ 1 本あたりの組織量は 110 mg を超えないようにしてください。松葉のような処理の難しい組織の場合に特に注意してください。
注意: 油性物質や粘性物質を含む可能性のある柑橘類の葉や、ベニカエデのような、著しく処理の難しい植物組織の場合は、チューブ 1 本あたりの量を 50~70 mg から始めてください。
2. **溶解ミックスの調製。**以下の表 4 に従い、Small RNA Lysis Buffer および Binding Solution を新しいチューブに加え手短かに混合し、その後 100% エタノールを加え手短かに混合します。溶液 1 mL につき 10 µL の 2-メルカプトエタノールを添加します。調整当日使用する量の溶解ミックスを調製します。各標準サンプルに 750 µL の溶解ミックスが必要です。溶解ミックスは精製開始直前に調製することが望まれます。使用前に溶解ミックスを室温に置いてください。

表 4 植物組織用の溶解ミックス

成分	量/mL 溶解ミックス
Small RNA Lysis Buffer (M1070)	650 µL
Binding Solution (L8042)	300 µL
100% エタノール	50 µL

注意: Small RNA Lysis Buffer を 0.7 倍量まで増やすことにより、溶解ミックスへのエタノール添加を行わなくても良い場合があります。これにより small RNA の総収量が向上する場合があります。しかし、植物種によっては、エタノールを溶解ミックスに加えない場合に最終サンプル中の DNA 残留も増える場合があります。

3. **組織サンプルを溶解します。**750 µL (組織 50~100 mg のとき) または 380 µL (< 50 mg 組織のとき) の溶解ミックスを組織粉末に加え、ただちにかつ完全に 30 秒間回転させます。ライセートを 55 °C で 5 分間インキュベートします。加熱インキュベーション中またはその後はサンプルをボルテックスしないでください。
注意: 大量の水分を吸収する可能性のあるデンプン貯蔵組織を処理する場合には、溶解ミックスの量をサンプル 100 mg につき 1 mL だけ増やし、サンプルを 55 °C ではなく室温でインキュベートします。
4. **細胞残骸をペレットにします。**サンプルを標準的なマイクロ遠心機で 5 分間最大速度 (14,000~16,000 x g) で遠心し、細胞残骸、ゲノム DNA、高分子 RNA を除去します。
5. **ライセートを濾過します。**ライセート上清を Filtration Column (青の固定リング) にピペットで移し、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心し、残骸残留物を除去します。ろ過したフロースルーライセートを保存します。
注意: 浮遊物質の層がみられる場合は、上清をピペットに取る前にピペットチップを浮遊層の下かつペレットを避けた部分に置きます。Filtration Column への粒子のキャリーオーバーは特に問題ありませんが、ペレットは避けてください。1 分間遠心してもすべての液体が Filtration Column を通過しない場合は、カラムを 2~3 分間再度遠心してください。
6. **RNA 結合用にエタノールを加えます。**ピペットでろ過したライセートの体積を測ります。1.1 倍量の 100% エタノールをろ過したライセートに加えます (例、715 µL の 100% エタノールを 650 µL のろ過したライセートに加えます)。ボルテックスまたは転倒混和により、ただちにかつ完全に混合します。チューブを遠心しないでください。
注意: 標準的なサンプルにおけるろ過したライセートの量は組織の種類により 600~700 µL の範囲で大きく変化する可能性があります。過剰量のエタノール (>1.2 倍量) をろ過したライセートに加えると、small RNA の収量が低下する可能性があります。
7. **RNA をカラムへ結合させます。**700 µL の混合液を Binding Column (赤の固定リング) にピペットで移します。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液をデカントします。残りの混合液に対し結合ステップを繰り返します。
注意: 各結合ステップ後にフィルター表面に色素が集積する可能性があります。特に問題はありませんが、色素は次の洗浄ステップで洗浄されます。
8. **1 回目の洗浄を行います。**700 µL の 100% エタノールをカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x

- g) で 30 秒間遠心します。フロースロー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
9. **2 回目の洗浄を行います。** 500 μL の Binding Solution をカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心します。
 10. **3 回目の洗浄を行います。** Binding Column を Collection Tube (付属品) に移し換えてください。500 μL のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースロー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
 11. **4 回目の洗浄を行います。** さらに 500 μL のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムに加え、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースロー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
 12. **カラムを乾燥させます。** カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して乾燥させます。残っているフロースロー液が乾燥カラムにはねないように、遠心機からカラムチューブアセンブリーを注意して外します。
 13. **RNA を溶出させます。** カラムを新しい 2 mL Collection Tube (付属品) に移し替えてください。50 μL の Elution Solution を直接カラム内側のフィルター中央に加えてください。開始時の培養が少量であるかまたは濃縮度の高い RNA サンプルを用いたい場合は、Elution Solution の量を 20~30 μL まで減らします。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して溶出させます。ピペットチップ中の溶出液を回収し、その溶液を直接カラム内側のフィルター中央へ再添加することにより溶出ステップを繰り返します。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度で 1 分間遠心して溶出させます。このとき精製された RNA は溶出液中に存在し、ただちに使用できます。または $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (短期間) または $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (長期間) で保存できます。

IV. small RNA単離—培養酵母および培養細菌

1. 酵素消化溶液を調製します。

- a. **酵母用酵素消化溶液** 100 μ L の酵母用酵素消化溶液につき、90 μ L の酵母用溶解液(製品番号 Y0253)、10 μ L の酵母用酵素ストック溶液(製品番号 Y0378) および 0.1 μ L の 2-メルカプトエタノールを混合します。各サンプルにつき、25 μ L (small RNA 単離時)または 50 μ L (全 RNA 単離時) の酵素消化溶液が必要です。
- b. **細菌用酵素消化溶液** 各 100 μ L の細菌用酵素消化溶液につき 90 μ L の細菌用溶解液(製品番号 B7934) および 10 μ L の細菌用酵素ストック溶液(製品番号 B7809)を混合します。各サンプルにつき、25 μ L (small RNA 単離時)または 50 μ L (全 RNA 単離時) の酵素消化溶液が必要です。

注意: *Staphylococcus* 属については、細菌用酵素消化溶液に 20 単位(units)の Lysostaphin、製品番号 L7386 を 100 μ L の酵素消化溶液ごとに添加します。*Staphylococcus* 属については、細菌用酵素消化溶液に 25 units の Mutanolysin、製品番号 M9901 を 100 μ L の酵素消化溶液ごとに添加します。

2. **溶解ミックスの調製。**以下の表 5 に従い、Small RNA Lysis Buffer および Binding Solution を新しいチューブに加え、手早く混合します。溶液 1 mL につき 10 μ L の 2-メルカプトエタノールを添加します。調整当日に使用する量の溶解ミックスを調製します。各標準サンプルに 700 μ L の溶解ミックスが必要です。溶解ミックスは精製開始直前に調製することが望まれます。使用前に溶解ミックスを室温に置いてください。

表 5 培養酵母および培養細菌用の溶解ミックス

成分	量/mL 溶解ミックス
Small RNA Lysis Buffer (M1070)	800 μ L
Binding Solution (L8042)	200 μ L

3. 細胞を回収します。

- a. **培養酵母** 5×10^7 個の細胞を 2 mL マイクロ遠心チューブで 5,000 x g 以上で 5 分間遠心してペレットにします。培地を除去しサンプルを 30 秒間遠心します。ピペットチップで培地を完全に除去します。

- b. **培養細菌** 1×10^9 個の細胞を 2 mL マイクロ遠心チューブで 5,000 x g 以上で 5 分間遠心してペレットにします。培地を除去しサンプルを 30 秒間遠心します。ピペットチップで培地を完全に除去します。

4. 細胞壁を消化します。

- a. **培養酵母** 細胞ペレットに 25 μ L の酵母用酵素消化溶液を加え、ボルテックスしてペレットを再懸濁します。サンプルを 10 分間置きます。
- b. **培養細菌** 細胞ペレットに 25 μ L の細菌用酵素消化溶液を加え、ボルテックスしてペレットを再懸濁します。サンプルを 10 分間置きます。

注意: グラム陰性菌 (*E. coli* など) の場合は、酵素切断ステップを省略し細胞ペレットを直接溶解ミックスに溶解することができます。

5. **細胞を溶解します。**消化したサンプルに 700 μ L の溶解ミックスを加え、ただちにかつ穏やかに転倒混和して混合します。サンプルを 5 分間以上置き、その間に穏やかに 2~3 回混合します。粗溶解液をボルテックスしないでください。
6. **細胞残骸を除去します。**サンプルを 5 分間最大速度 (14,000~16,000 x g) で遠心し、細胞残骸、ゲノム DNA、高分子 RNA を除去します。
7. **ライセートを濾過します。**ライセート上清を Filtration Colum (青の固定リング) にピペットで移します。ペレットを避けてください。最大速度で 30 分間遠心してください。ろ過したフロースルーライセートを保存します。
8. **RNA 結合用にエタノールを加えます。**ピペットでろ過したライセートの体積を測ります。1.1 倍量の 100% エタノールをライセートに加えます (例、770 μ L の 100% エタノールを 700 μ L のろ過したライセートに加えます)。ボルテックスまたは転倒混和して完全に混合してください。チューブを遠心しないでください。
9. **RNA をカラムへ結合させます。**750 μ L の混合液を Binding Column (赤の固定リング) へピペットで移します。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液をデカントします。残りの混合液に対し結合ステップを繰り返します。
10. **1 回目の洗浄を行います。**700 μ L の 100% エタノールをカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
11. **2 回目の洗浄を行います。**500 μ L の Binding Solution をカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。

12. **3 回目の洗浄を行います。** Binding Column を付属の Collection Tube に移し換えてください。500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
13. **4 回目の洗浄を行います。** さらに 500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムに加え、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
14. **カラムを乾燥させます。** カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して乾燥させます。残留しているフロースルー液が乾燥カラムにはねないように、遠心機からカラムチューブアセンブリーを注意して外します。
15. **RNA を溶出させます。** カラムを新しい 2 mL Collection Tube (付属品) に移し替えてください。50 μ L の Elution Solution を直接カラム内側のフィルターの中央に加えてください。高度に濃縮した RNA サンプルが必要な場合は、Elution Solution の量を 20~30 μ L まで減らしてください。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して溶出させます。ピペットチップ中の溶出液を回収し、その溶液を直接カラム内側のフィルター中央へ再添加することにより溶出ステップを繰り返します。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度で 1 分間遠心して溶出させます。このとき精製された RNA は溶出液中に存在し、ただちに使用できます。または -20 $^{\circ}$ C (短期間) または -70 $^{\circ}$ C (長期間) で保存できます。

V. 全RNA単離—哺乳類培養細胞

- Lysis Solution/2-ME 混合液を調製します。** Lysis Solution を新しいチューブに移し Lysis Solution 1 mL あたり 10 μ L の 2-メルカプトエタノール (2-ME) を加え手短に混合します。調整当日使用する量の Lysis Solution/2-ME 混合液を調製します。

表 6 Lysis Solution/2-ME 混合液の推奨量

サンプル	細胞数または培養容器	Lysis Solution/2-ME 混合液量
細胞ペレット	1 x 10 ⁶	100 μ L
	1-3 x 10 ⁶	250 μ L
	4-7 x 10 ⁶	500 μ L
接着細胞	12 ウェルプレート	150 μ L/ウェル
	6 ウェルプレート	250 μ L/ウェル
	25cm ² フラスコ	500 μ L/フラスコ

- 細胞サンプルの調製。** 哺乳類培養細胞からの small RNA 単離のステップ 2 をご参照ください。
- 細胞を溶解します。**
 - 細胞ペレット** 細胞ペレットを 1~2 秒ボルテックスし細胞塊を緩めます。表 6 に従い、Lysis Solution/2-ME 混合液を細胞ペレットに加え、すべての塊が消失するまで完全にボルテックスまたはピペティングしてください。サンプルを 5 分間以上置き、その間に穏やかに 2~3 回ボルテックスします。粗溶解物を 2 mL のマイクロ遠心チューブ (付属しません) に移します。
注意: 細胞ペレットを -70 °C で保存されていた場合は、室温ではなく 55 °C にて 5 分間で溶解してください。
 - 接着細胞** Lysis Solution/2-ME 混合液を表 6 に従い培養に加え、Lysis Solution/2-ME 混合液で表面を覆うように、培養容器をゆすると同時に数秒間側面をたたいてください。サンプルを 5 分以上置き、その間に 2~3 回ゆするかたたくなどして混合します。容器を一方に傾け、ライセートを 2 mL のマイクロ遠心チューブに回収します。
- 細胞残骸をペレットにします。** サンプルを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 3 分間遠心し細胞残骸を除去します。
- ライセートを濾過します。** ライセート上清を Filtration Column (青の固定リング) にピペットで移します。ペレットを避けてください。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心します。ろ過したフロースルーライセートを保存します。
- Binding Solution を添加します。** サンプル溶解に用いた Lysis Solution/2-ME 混合液の量に基づき、1.5 倍量の Binding Solution をろ過したライセートに加えます (例、ライセート調製に 500 μ L の Lysis

Solution/2-ME 混合液を用いた場合は、750 μ L の Binding Solution をろ過したライセートに加えます)。ボルテックスまたは転倒混和により完全に混合してください。遠心はしないでください。

- RNA をカラムへ結合させます。** 700 μ L の混合液を Binding Column (赤の固定リング) へピペットで移します。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液をデカントします。残りの混合液に対し結合ステップを繰り返します。
- 1 回目の洗浄を行います。** 100% エタノールを 700 μ L だけカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
- 2 回目の洗浄を行います。** 500 μ L の Binding Solution をカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心します。
オプション: カラム上で DNase I 切断を行う場合は、付録に記載した手順を続けて行ってください。
- 3 回目の洗浄を行います。** Binding Column を Collection Tube (付属品) に移し換えてください。500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
- 4 回目の洗浄を行います。** さらに 500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムに加え、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
- カラムを乾燥させます。** カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して乾燥させます。残留しているフロースルー液が乾燥カラムにはねないように、遠心機からカラムチューブアセンブリーを注意して外します。
- RNA を溶出させます。** カラムを新しい 2 mL Collection Tube (付属品) に移し替えてください。50~100 μ L の Elution Solution を直接カラム内側のフィルターの中央に加えてください。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して溶出させます。ピペットチップ中の溶出液を回収し、その溶液を直接カラム内側のフィルター中央へ再添加することにより溶出ステップを繰り返します。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度で 1 分間遠心して溶出させます。このとき精製された RNA は溶出液中に存在し、ただちに使用できます。または -20 °C (短期間) または -70 °C (長期間) 保存できます。

VI. 全RNA単離 - 哺乳類組織

1. **Lysis Solution/2-ME 混合液を調製します。** Lysis Solution を新しいチューブに移し、Lysis Solution 1 mL あたり 10 μ L の 2-メルカプトエタノール (2-ME) を加え手短に混合します。調整当日使用する量の Lysis Solution/2-ME 混合液を調製します。
2. **組織サンプルを溶解します。** 500 μ L (組織 10~40 mg のとき) または 250 μ L (<10 mg 組織のとき) の Lysis Solution/2-ME 混合液を組織サンプルに混合し rotor-stator ホモジナイザーで 50~60 秒または視認可能なサンプル片がなくなるまでホモジナイズします。サンプルを 5 分間以上置きます。
注意: 脾臓、胸腺、肝臓、または DNA 含量の高い組織を処理する場合は、Lysis Solution/2-ME 混合液 500 μ L につき組織量が 20 mg を超えないようにしてください。
3. **細胞残骸をペレットにします。** サンプルを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 3 分間遠心し細胞残骸を除去します。
4. **ライセートを濾過します。** ライセート上清を Filtration Column (青の固定リング) にピペットで移します。ペレットを避けてください。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心します。ろ過したライセートを保存します。
5. **Binding Solution を添加します。** ピペットでろ過したフロースルーライセートの体積を測ります。1.5 倍量の Binding Solution をろ過したライセートに加えます (例、675 μ L の Binding Solution を 450 μ L のろ過したライセートに加えます)。ボルテックスまたは転倒混和により完全に混合してください。**遠心はしないでください。**
注意: 肝臓組織またはグリコーゲンに富む組織を処理する場合は、Binding Solution の量を 1 倍量まで減らし、カラムが詰まることを避けてください。
6. **RNA をカラムへ結合させます。** 700 μ L の混合液を Binding Column (赤の固定リング) へピペットで移します。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液をデカントします。残りの混合液に対し結合ステップを繰り返します。
注意: 1 分間遠心してもすべての液体がカラムを通過しない場合は、カラムを 1~2 分間再度遠心してください。
7. **1 回目の洗浄を行います。** 700 μ L の 100% エタノールをカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
8. **2 回目の洗浄を行います。** 500 μ L の Binding Solution をカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心します。
注意: 開始材料が脾臓組織またはリボヌクレアーゼに富む組織の場合は、さらに 500 μ L の Binding Solution でカラム洗浄を繰り返してください。カラム上で DNase I 切断を行う場合は、付録に記載した手順を続けて行ってください。
9. **3 回目の洗浄を行います。** Binding Column を Collection Tube (付属品) に移し換えてください。500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
10. **4 回目の洗浄を行います。** さらに 500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムに加え、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
11. **カラムを乾燥させます。** カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して乾燥させます。残留しているフロースルー液が乾燥カラムにはねないように、遠心機からカラムチューブアセンブリーを注意して外します。
12. **RNA を溶出させます。** カラムを新しい 2 mL Collection Tube (付属品) に移し替えてください。50~100 μ L の Elution Solution を直接カラム内側のフィルター中央に加えてください。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して溶出させます。ピペットチップ中の溶出液を回収し、その溶液を直接カラム内側のフィルター中央へ再添加することにより溶出ステップを繰り返します。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度で 1 分間遠心して溶出させます。このとき精製された RNA は溶出液中に存在し、ただちに使用できます。または -20 °C (短期間) または -70 °C (長期間) で保存できます。

VII. 全RNA単離 - 植物組織

1. **植物組織サンプルを調整します。**植物組織からの small RNA 単離のステップ 1 をご参照ください。
2. **Lysis Solution/2-ME 混合液を調製します。**Lysis Solution を新しいチューブに移し、Lysis Solution 1 mL あたり 10 μ L の 2-メルカプトエタノール (2-ME) を加え手短かに混合します。調整当日使用する量の Lysis Solution/2-ME 混合液を調製します。
3. **組織サンプルを溶解します。**500 μ L (組織 50~100 mg のとき) または 250 μ L (< 50 mg 組織のとき) の Lysis Solution/2-ME 混合液を組織粉末に加え、ただちにかつ完全に 30 秒間ボルテックスします。サンプルを 55 °C で 5 分間インキュベートします。加熱インキュベーション中またはその後はサンプルをボルテックスしないでください。
注意: 大量の水分を吸収するデンプン貯蔵組織を処理する場合には、Lysis Solution/2-ME 混合液の量をサンプル 100 mg につき 750 μ L だけ増やし、サンプルを 55 °C ではなく室温でインキュベートします。
4. **細胞残骸をペレットにします。**サンプルを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 3 分間遠心し細胞残骸をペレットにします。
注意: 脂肪貯蔵組織ではライセートが粘性をもつ可能性があり、細胞残骸をペレットにするには遠心時間を延ばす必要がある可能性があります。
5. **ライセートを濾過します。**ライセート上清を Filtration Column (青の固定リング) にピペットで移し、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心し、残骸残留物を除去します。ろ過したフロースルーライセートを保存します。
注意: 浮遊物質の層がみられる場合は、上清をピペットに取る前にピペットチップを浮遊層の下かつペレットを避けた部分に置きます。Filtration Column への浮遊粒子のキャリーオーバーは特に問題ありませんが、ペレットは避けてください。1 分間遠心してもすべての液体が Filtration Column を通過しない場合は、カラムを 2~3 分間再度遠心してください。
6. **Binding Solution を添加します。**ろ過したライセートの体積をピペットで測り 1.5 倍量の Binding Solution をろ過したライセートに加えます (例、675 μ L の Binding Solution を 450 μ L のろ過したライセートに加えます)。ボルテックスまたは転倒混和により完全に混合してください。**遠心はしないでください。**
注意: ろ過したライセートの量は組織によって大きく異なる場合があります。開始材料がデンプンに富む場合やろ過したライセートに粘性がある場合は、Binding Solution の量を 1 倍量まで減らしてください。
7. **RNA をカラムへ結合させます。**700 μ L の混合液を Binding Column (赤の固定リング) へピペットで移します。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液をデカントします。残りの混合液に対し結合ステップを繰り返します。
注意: 30 秒間遠心してもすべての液体が Filtration Column を通過しない場合は、カラムを 1~2 分間再度遠心してください。
8. **1 回目の洗浄を行います。**100% エタノールを 700 μ L だけカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
9. **2 回目の洗浄を行います。**500 μ L の Binding Solution をカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心します。
オプション: カラム上で DNase I 切断を行う場合は、付録に記載した手順を続けて行ってください。
10. **3 回目の洗浄を行います。**Binding Column を付属の Collection Tube に移し換えてください。500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
11. **4 回目の洗浄を行います。**さらに 500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムに加え、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
12. **カラムを乾燥させます。**カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して乾燥させます。残留しているフロースルー液が乾燥カラムにはねないように、遠心機からカラムチューブアセンブリーを注意して外します。
13. **RNA を溶出させます。**カラムを新しい 2 mL Collection Tube (付属品) に移し替えてください。50~100 μ L の Elution Solution を直接カラム内側のフィルターの中央に加えてください。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して溶出させます。ピペットチップ中の溶出液を回収し、その溶液を直接カラム内側のフィルター中央へ再添加することにより溶出ステップを繰り返します。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度で 1 分間遠心して溶出させます。このとき精製された RNA は溶出液中に存在し、ただちに使用できます。または -20 °C (短期間) または -70 °C (長期間) で保存できます。

VIII. 全RNA単離—培養酵母および培養細菌

1. **Lysis Solution/2-ME 混合液を調製します。** Lysis Solution を新しいチューブに移し、Lysis Solution 1 mL あたり 10 μ L の 2-メルカプトエタノール (2-ME) を加え手短かに混合します。調整当日使用する量の Lysis Solution/2-ME 混合液を調製します。
2. **酵素用消化溶液を調製します。** 培養酵母および培養細菌からの small RNA 単離のステップ 1 をご参照ください。
3. **細胞を回収します。** 培養酵母および培養細菌からの small RNA 単離のステップ 3 をご参照ください。
4. **細胞壁を消化します。**
 - a. **培養酵母** 50 μ L の酵母用酵素切断溶液を細胞ペレットに加え、ボルテックスによりペレットを再懸濁します。サンプルを 10 分間置きます。
 - b. **培養細菌** 50 μ L の細菌用酵素消化溶液を細胞ペレットに加え、ボルテックスによりペレットを再懸濁します。サンプルを 10 分間置きます。
5. **細胞を溶解します。** 500 μ L の Lysis Solution/2-ME 混合液を切断サンプルに加えボルテックスまたは転倒混和により完全に混合します。サンプルを 5 分間以上置きます。
6. **細胞残骸をペレットにします。** サンプルを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 3 分間遠心し細胞残骸を除去します。
7. **ライセートを濾過します。** ライセート上清を Filtration Column (青の固定リング) にピペットで移します。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。ろ過したフロースルーライセートを保存します。
8. **Binding Solution を添加します。** 750 μ L (ろ過したライセートの約 1.5 倍量) の Binding Solution をろ過したライセートに加えます。ボルテックスまたは転倒混和により完全に混合してください。**遠心はしないでください。**
9. **RNA をカラムへ結合させます。** 700 μ L の混合液を Binding Column (赤の固定リング) へピペットで移します。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液をデカントします。残りの混合液に対し結合ステップを繰り返します。
10. **1 回目の洗浄を行います。** 700 μ L の 100% エタノールをカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
11. **2 回目の洗浄を行います。** 500 μ L の Binding Solution をカラムに加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心します。**オプション:** カラム上で DNase I 切断を行う場合は、付録に記載した手順を続けて行ってください。
12. **3 回目の洗浄を行います。** Binding Column を Collection Tube (付属品) に移し換えてください。500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムへ加えます。最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
13. **4 回目の洗浄を行います。** さらに 500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 をカラムに加え、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
14. **カラムを乾燥させます。** カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して乾燥させます。残留しているフロースルー液が乾燥カラムにはねないように、遠心機からカラムチューブアセンブリーを注意して外します。
15. **RNA を溶出させます。** カラムを新しい 2 mL Collection Tube (付属品) に移し替えてください。50~100 μ L の Elution Solution を直接カラム内側のフィルターの中央に加えてください。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度 (14,000~16,000 x g) で 1 分間遠心して溶出させます。ピペットチップ中の溶出液を回収し、その溶液を直接カラム内側のフィルター中央へ再添加することにより溶出ステップを繰り返します。フタを閉め、チューブを 1 分間置きます。カラムを最大速度で 1 分間遠心して溶出させます。このとき精製された RNA は溶出液中に存在し、ただちに使用できます。または -20 $^{\circ}$ C (短期間) または -70 $^{\circ}$ C (長期間) で保存できます。

結果

RNAの解析

調製した RNA の濃度および品質は分光分析およびアガロースゲル電気泳動により決定できます。極めてわずかな量 (1~2 μL) の RNA サンプルでも NanoDrop 装置で直接測定できます。通常の分光光度計用には、RNA サンプルを TE 緩衝液 (10 mM トリス HCl, 1 mM EDTA, pH 7-8) で希釈し 260、280、320 nm の吸光度を測定します。最良の結果を得るためには、0.1~1.0 吸光度単位の間とする必要があります (または分光光度計がリニアな範囲)。260 nm での吸光度 1.0 は 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の RNA に相当します。280 nm の吸光度に対する 260 nm の吸光度の比 ($(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$) として算出されます) は通常は 1.8~2.2 です。

RNA の品質はゲル電気泳動、Agilent Bioanalyzer の解析、またはキャピラリー電気泳動により評価できます。small RNA の調製においては、4% アガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲル上で tRNA ならびに 5S および 5.8S rRNA は離れたバンドあるいはピークとして現れるはずですが。全 RNA 調製においては、23~28S (生物種によりま) リボソーム RNA 大サブユニットおよび 16~18S (生物種によりま) リボソーム RNA 小サブユニットは離れたバンドあるいはピークとして現れるはずですが。また、葉緑体およびミトコンドリアリボソーム RNA の小さなバンドあるいはピークが存在する場合があります。

予測される収量

RNA 収量は組織のタイプ、生育条件、および成長段階により異なります。一般に、若く生育のより速い細胞または組織は RNA 含量が多くなります。植物の根、およびデンプン貯蔵器官は一般に RNA 含量が少なくなります。100 万の哺乳類培養細胞につき約 1~2 μg の small RNA および 10~25 μg の全 RNA が Small RNA Isolation Kit により得られています。

組織 10 mg につき 3~5 μg の small RNA および 30~50 μg の全 RNA が得られています (マウス肝臓)。組織 100 mg につき 5~15 μg の small RNA および 40~100 μg の全 RNA が得られています (松葉、ブドウの葉、およびトマトの葉)。6~8 μg の small RNA および 50~70 μg の全 RNA が 5×10^7 の酵母細胞から得られています。5~6 μg の small RNA および 30~35 μg の全 RNA が 1×10^9 *E. coli* 細胞から得られています。

付録

カラム上での DNase I 切断

全 RNA 調製の際は、以下に記された On-Column DNase I Digestion Set (製品番号 DNASE10 および DNASE70) を用いた切断により残存 DNA 量を極めて低いレベルにすることができます。残存 DNA を最も厳密に除去するには、RNA サンプルを DNase I, Amplification Grade (製品番号 AMPD1 で処理することを推奨します。small RNA 調製の際にはカラム上での DNase I 切断は推奨しません。その理由は、切断に用いる条件ではかなり多くの small RNA がフィルターから放出されてしまうためです。しかし必要に応じ、small RNA サンプルを Amplification Grade DNase I で処理し残存 DNA を除去することもできます。

1. 手順に示されたとおりに結合カラムを Binding Solution で洗浄した後結合カラムを新しい Collection Tube に移し入れてください。
2. 各サンプルについて、10 μL の DNase I (製品番号 D2816) を 70 μL の DNase I Digestion Buffer (製品番号 D1566) と混合し、ピペティングにより穏やかに混合します。DNase I バイアルおよび DNase I と DNase I digestion buffer の混合液はボルテックスしないでください。DNase I は物理的な変性にセンシティブです。
3. 80 μL の DNase I/Digest Buffer mixture 混合液を直接結合カラム内のフィルター中央部に添加します。フタを閉めサンプルを室温で 15 分間インキュベートします。
4. 500 μL の Binding Solution をカラムに添加し、最大速度 (14,000~16,000 x g) で 30 秒間遠心します。フロースルー液を捨て、カラムを Collection Tube へ戻します。
注意: 結合カラムが Binding Solution で 2 回洗浄されている場合は、RNase に富む組織で推奨されているように、DNase I 切断の前に、このステップでのカラム洗浄に用いる Binding Solution の量を 250 μL に減らし他のステップのために試薬を保存してください。
5. 手順に示されたとおりにエタノール希釈 Wash Solution 2 による洗浄ステップを繰り返してください。

トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
Filtration Column が詰まっています。	細胞残骸ペレットが Filtration Column に持ち込まれている。	細胞残骸ペレットを Filtration Column ヘピペットで移さないようにしてください。ペレットが緩すぎる場合は、3～5 分間遠心を繰り返します。最初の遠心後にすべての液体が Filtration Column を通過しない場合は、カラムを 3～5 分間再度遠心してください。
	植物サンプルが溶解中に 55 °C に加熱されていない。	植物材料の溶解を 55 °C、5 分間で行ってください。加熱インキュベーション中またはその後はサンプルをボルテックスしないでください。
	デンプンに富む植物サンプルが 55 °C に加熱されている。	デンプンに富む植物サンプルは 55 °C ではなく室温で溶解してください。溶解ミックス (small RNA 単離の場合) または Lysis Solution/2-ME 混合液 (全 RNA 単離の場合) の量を増やしてサンプルを溶解してください。
	植物材料に高濃度の脂質が含まれている。	遠心時間を 5～10 分に延長して細胞残骸をペレットにし、脂肪物質の浮遊層を Filtration Column に移さないようにしてください。溶解ミックス (small RNA 単離の場合) または Lysis Solution/2-ME 混合液 (全 RNA 単離の場合) の量を増やしてサンプルを溶解してください。
カラムが詰まった。	エタノールをろ過したライセートに加えた後に、多糖類または植物繊維が凝集物を形成している。	凝集物を結合カラムに移し入れないでください。混合液を結合カラムへ移す前に、凝集物をピペットチップで除去してください。
	結合混合液の粘性が高すぎる。	肝臓組織またはデンプンに富む植物組織から全 RNA を単離する場合は、Binding Solution をろ過したライセートと同量にまで減らしてください。その後の調製においては、開始材料の量を減らしてください。現在のサンプルを救済するためには、カラムを 2～3 分間遠心してください。閉塞が解消しない場合は、洗浄ステップに進む前に、ピペットチップを用いて詰まった液体を除去してください。RNA 収量は減少しやすくなります。
収量が低い、または RNA が分解した。	ろ過したライセートに加えた 100% エタノールの量が最適ではない。	ほとんどの開始材料について、ろ過したライセートに加える 100% エタノールの最適量は 1.1 倍量です。エタノールが多すぎる場合 RNA 収量が減る場合があります。しかし肝臓組織および HeLa 培養細胞のように開始材料によってはエタノールの最適量は 1.5 倍量となります。これら 2 通りのエタノール量を、同じ開始材料について比較してご使用の細胞株にはどちらが最適か決めてください。
	はじめの細胞または組織に少量の RNA が含まれていた。	細胞または組織のタイプによって収量は大きく異なります。老化した根、茎、および塊茎には少量の全 RNA が含まれています。
	組織または培養物が古すぎた。	培養物は最大密度になる前に、または完全に融合する前に使用し、組織はできるだけ速やかに摘出してください。
	開始材料が多すぎた。	1 本のチューブにつき植物組織粉末は 110 mg を超えないようにしてください。柑橘類の葉や古いベニカエデの葉などの著しく処理困難な組織については、1 本のチューブにつき植物組織粉末は 50～70 mg にして開始してください。標準的な単離法で、110 mg を超える処理困難な植物材料、または 50～70 mg を超える著しく処理困難な植物材料を用いた場合、RNA 収量が大きく低下するかまたは RNA が回収されなくなります。
	細胞または組織の破碎が不適切だった。	small RNA 単離の際は、溶解ミックスと細胞ペレットを完全かつ穏やかに混合し、細胞ペレットが -70 °C で保存されていた場合は 55 °C でサンプルを溶解してください。全 RNA 単離の際は、Lysis Solution/2-ME 混合液を細胞ペレットとボルテックスにより細胞塊がなくなるまで完全に混合し、細胞ペレットが -70 °C で保存されていた場合は 55 °C でサンプルを溶解し、視認可能なサンプル片がなくなるまで組織をホモジナイズしてください。植物組織は液体窒素中で細かい粉状につぶしてください。RNA 収量は、RNA 単離前にいかに十分に組織がすりつぶされていたかに大きく左右されます。
開始材料が少なすぎた。	開始材料の量に基づいて、溶解ミックス (small RNA 単離の場合) または Lysis Solution/2-ME 混合液 (全 RNA 単離の場合) の量を調整してください。	
溶出液のカラムへの添加が不適切だった。	溶出液をピペットで直接結合カラム内のフィルター面の中央部へ移してください。遠心前に溶液を 1～2 分間フィルターに吸着させてください。溶出液をカラムに再添加することにより溶出ステップを繰り返してください。	

トラブルシューティングガイド (続き)

問題	原因	対策
収量が低い、または RNA が分解した。 (続き)	組織に RNase が多く含まれていた。	RNase に富む組織は溶解液中で 2-メルカプトエタノール存在下で迅速かつ完全に破壊する必要があります。Binding Column を 2 回、それぞれ 500 μ L の Binding Solution で洗浄してください。
	保存が不適切だった。	組織は液体窒素で急速冷凍し-70 $^{\circ}$ C で保存してください。組織は溶解液中で 2-メルカプトエタノール存在下で破壊する前に解凍させないでください。
精製した RNA 中の残存 DNA の濃度高すぎる。	DNase I の処理条件が最適ではなかった。	On-Column DNase I Digestion Set を用いてカラム上での最適な DNase I 切断を施してください。付録をご参照ください。溶出した RNA を Amplification Grade DNase I で処理する方法もあります。
	Binding Column に過剰にローディングされている。	次の調製時には、細胞数を減らすか、またはより小さい組織サンプルを用いてください。開始材料の量に比例させて溶解ミックス (small RNA 単離の場合) または Lysis Solution/2-ME 混合液の量を増やしてください。
	small RNA サンプル中で DNA が過度にせん断されている。	溶解ミックス中で細胞ペレットを過度にボルテックスしないでください。組織のホモジナイズ時間を 40~50 秒に制限し、中程度のスピードにしてください。細胞溶解後は粗ライセートをボルテックスしないでください。
	使用している溶解用試薬が誤っている。	small RNA 調製には Small RNA Lysis Buffer (M1070) を用いてください。全 RNA 調製には Lysis Solution (L8167) を用いてください。違う溶液を使わないでください。
精製したサンプルを使用した反応が上手くいかない。	溶出液中にエタノールが残っている。	カラム乾燥ステップの後には、残留しているフロースルー液がカラムにはねないように、遠心機からカラムチューブアセンブリーを注意して外します。残留しているフロースルー液が偶発的に乾燥カラムに接触した場合は、溶出ステップに進む前にカラムを 30 秒間再遠心してください。
	溶出液中に塩が残っている。	グアニジン塩は酵素を阻害します。エタノール希釈 Wash Solution 2 で洗浄する前に、結合カラムを付属の新しい Collection Tube に移してください。必ずカラムを 2 回、500 μ L のエタノール希釈 Wash Solution 2 で洗浄してください。

参考文献

1. Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, sections 4.1-4.10 (1995).
2. Farrell, Robert E., Jr. RNA Methodologies, 2nd Edition, Academic Press, NY, pp. 37-53 (1998).
3. Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, pp. 7.3-7.5 (1989).

PerfectHyb Plus™ Hybridization Buffer, 製品番号 H7033

Precast Agarose Gels, 1.25%, 8 well, 製品番号 P6222
RNA Sample Loading Buffers, 製品番号 R1386, R4268
RNaseZAP®, 製品番号 R2020
Taq DNA Polymerase, 製品番号 D1806
Transcript RNA Markers, 0.2-10 kb, 製品番号 R7020
Trypsin-EDTA solution (1x), 製品番号 T3924
YPD Broth, 製品番号 Y1375

関連製品

Deoxynucleotide (dNTP) Mix, 製品番号 D7295
Enhanced Avian Reverse Transcriptase, 製品番号 A4464
Ethidium bromide solution, 10 mg/mL, 製品番号 E1510
Luria Broth, 製品番号 L3522
MOPS-EDTA-Sodium Acetate Buffer, 製品番号 M5755

MISSIONはSigma-Aldrich™ Biotechnology LPの登録商標です。
PerfectHyb PlusはSigma-Aldrich Biotechnology LPの登録商標です。
RnaseZAPはAmbion, Inc.社の登録商標です。

JD,LT,PHC 03-07-1

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。
Sigma-Aldrich, Inc. は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。
お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。場合により、他の条項も適用されます。
納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。