

Protocol

試料の前処理と細胞壁溶解 *Sample Preparation & Cell Lysis*

新鮮組織試料

Fresh Tissue Sample

動物組織または植物組織

- 20~50mgの新鮮組織試料をマイクロ遠心管に採取
- 300 μ Lの *Lysis buffer* (2-ME 含有) を添加
- ベレット・ベッスルか電動グラインダーにてホモジナイズ
- 200 μ Lの *Lysis buffer* (2-ME 含有) をホモジナイズされた試料に加え、15~20秒間ボルテックス
(* 試料の量が *Lysis buffer* の10%を越えないこと)
- 12000Gにて10分間の遠心操作
- 上清をマイクロ遠心管へ移し替え
- **オプション操作**
上清に組織破片が残留する場合には500 μ Lのクロロフォルムを加え、15~30秒間ボルテックス。12000Gで10分間の遠心操作。上清をマイクロ遠心管へ移し替え。

血液

Blood

非凝固血液

- 100 μ Lの非凝固血液をマイクロ遠心管へ移し替え
- 500 μ Lの *Lysis buffer* (2-ME 含有) を添加
- 12000Gにて10秒間の遠心操作

鼻・咽喉粘膜からの綿棒採取細胞

Cells from Nasal or Throat Swabs

綿棒採取細胞

- 500 μ Lの *Lysis buffer* (2-ME 含有) をマイクロ遠心管に充填
- 滅菌綿棒にて鼻・咽喉粘膜を擦過し細胞を採取
- 綿棒先端部を切り取り、マイクロ遠心管に封入
- ボルテックス操作後、室温で5分間インキュベート

単層培養細胞

Cells grown in Monolayer

単層培養細胞

- 細胞培養液を除去
- 500 μ Lの *Lysis buffer* (2-ME 含有) を添加
($1 \sim 5 \times 10^6$ cellsあたり)
- ピペッティング操作で細胞壁を溶解、ホモジナイズ

浮遊培養細胞

Cells grown in Suspension

浮遊培養細胞

- $1 \sim 5 \times 10^6$ の動物・植物・イースト細胞、 1×10^7 のバクテリア細胞をペレット化
- 上清を除去し500 μ Lの *Lysis buffer* (2-ME 含有) を添加
- ピペッティング操作で細胞壁を溶解
(またはボルテックス10秒間)

Spin Columnへのローディング *Spin Column Loading*

- 1) 300 μ L(またはセル・ライセート量の60%)のIsopropanolをセル・ライセートに加え、ボルテックス
- 2) Spin Columnを2mLのコレクション・チューブに嵌め込む
- 3) 工程(1)の混合物をSpin Columnにローディング
- 4) 12000Gで30秒間の遠心操作
- 5) 通過画分の除去と廃棄

●オプション

残存ゲノムDNAを除去するためにRNase-free DNaseを加え、on-column DNase Digestionを行う

1次カラム洗浄 *Primary Column Washing*

- 1) 700 μ LのPrimary Washing buffer(エタノール含有)をSpin Columnにアプライ
- 2) 12000Gで30秒間の遠心操作
- 3) 通過画分の除去と廃棄

2次カラム洗浄 *Secondary Column Washing*

- 1) 700 μ LのSecondary Washing buffer(エタノール含有)をSpin Columnにアプライ
- 2) 12000Gで30秒間の遠心操作
- 3) 通過画分の除去と廃棄
- 4) 残留エタノールを除去するために12000Gで再度2分間の遠心操作

RNA溶出 *Elution of RNA*

- 1) Spin ColumnをRNase-freeマイクロ遠心管(グライナー616201など)に嵌め込む
- 2) 40~50 μ LのElution bufferをカラム・メンブランの中央に滴下
- 3) 室温で1分間、インキュベート
- 4) RNAを溶出させるための12000Gで1分間の遠心操作
- 5) RNAは-20°Cまたは-80°Cで保存

Kit 内容

コメント

Lysis buffer	2-Mercaptoethanol(2-ME)を1反応あたり6 μ L加える
Primary Washing buffer	96~99% Ethanolを1反応あたり160 μ L加える
Secondary Washing buffer	96~99% Ethanolを1反応あたり640 μ L加える
Elution buffer	40~50 μ LのElution bufferをSpin Columnメンブラン中央に滴下。インキュベート。
Spin Column	12000Gで遠心操作
2mL Collection tube	

Kitに含まれないもの

コメント

2-Mercaptoethanol	Lysis bufferに1反応あたり6 μ Lを加える
96~99% Ethanol	1反応あたりPrimary洗浄bufferに160 μ L、Secondary洗浄bufferに640 μ Lを加える
2-Propanol(Isopropanol)	Spin Column loading時に細胞ライセートへ300 μ L(またはライセート60%相当)加える
RNase-free 1.5mL tube	Greiner 616201 マイクロ遠心反応チューブを推奨

(株)グライナー・ジャパン

Greiner Bio-One Co., Ltd.

東京都港区赤坂2-17-44

<http://www.greiner-bio-one.co.jp>

東京本社

電話03-3505-8875(代表) FAX 8945(器材・機器) 8879(受託・試薬)

新大阪オフィス 学術本部

電話06-4805-7115(代表) FAX 7171(学術)