

# Total RNA Extraction Kit Mini (Blood / Bacteria / Cultured Cells)



Cat. No. YRB50  
50 ミニプレップ

RBC Lysis Buffer: 120ml  
RB Buffer: 30ml \*\*  
RT Buffer: 15ml  
R-W1 Buffer: 25ml  
R-Wash Buffer (conc.): 25ml \*  
RNase-free Water: 10ml  
RB Column (2ml Collection Tube とセット): 50 本  
Filter Column (2ml Collection Tube とセット): 50 本

Cat. No. YRB100  
100 ミニプレップ

RBC Lysis Buffer: 120ml × 2 本  
RB Buffer: 60ml \*\*  
RT Buffer: 30ml  
R-W1 Buffer: 50ml  
R-Wash Buffer (conc.): 25ml \*  
RNase-free Water: 10ml  
RB Column (2ml Collection Tube とセット): 100 本  
Filter Column (2ml Collection Tube とセット): 100 本

対象サンプル (プロトコール掲載): 全血/パフィーコート、培養動物細胞、グラム陰性菌/グラム陽性菌

サンプル量: 全血 300 μl ~、哺乳類細胞 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>、バクテリア細胞 10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup>

収量: ~30 μg

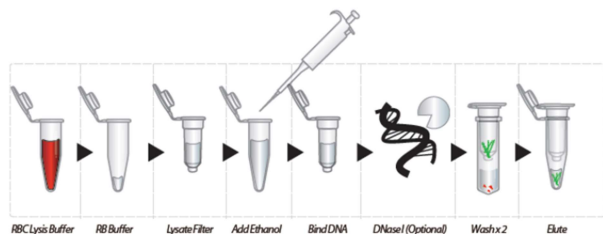
ゲノミック DNA を完全に除去されたい場合は、RNase フリーの DNase I を別途ご用意ください。

\* 初めにご使用になる前に、R-Wash Buffer に 4 倍量のエタノールを加えてください。

\*\* ご使用になる前に、RB Buffer 1ml に対して 10 μl の割合で β-メルカプトエタノール (β-ME) を加えてください。β-ME を加えた RB Buffer は 1 ヶ月まで常温で保存できます。

本製品の付属品は全て RNase フリーです。

1



## 血液・培養細胞用プロトコール

### 赤血球の溶解 (新鮮血の場合)

- 全血サンプルを適当なチューブに入れた後、サンプル量の 3 倍の RBC Lysis Buffer を加え、チューブを反転させて混ぜ合わせてください。**ボルテックスにはかけないでください。**(例えば、新鮮血 500 μl に対し 1.5ml の RBC Lysis Buffer を加えてください。サンプル量は 300 μl 以上を推奨。チューブは本製品の付属品ではありません。)
- 氷の上で 10 分間インキュベートする。インキュベーション中 2~3 回、チューブを反転させて混ぜ合わせる。
- チューブを遠心分離機に 4°C、500xg (2,500rpm) で 3 分間かけた後、上清を捨てる。
- RBC Lysis Buffer 500 μl を加え、短時間ボルテックスにかけて細胞ペレットを再懸濁させる。
- チューブを遠心分離機に 4°C、500xg (2,500rpm) で 3 分間かけた後、上清を捨てる。
- 続けて、「細胞の溶解」の 1 の処理を行う。

### 細胞の回収 (培養動物細胞の場合)

付着細胞を使用する場合は、まずトリプシン処理を施してから、以下の処理を行ってください。

- 細胞 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> を 1.5ml 遠心チューブ (本製品に付属しません) に移し入れ、遠心分離機に 6,000xg (8,000rpm) で 1 分間かけて細胞を集める。
- 上清を捨てる。
- 続けて、細胞の溶解の 1 の処理を行う。

3

## Total RNA Extraction Kit Mini (Blood/Bacteria/Cultured Cells)

### 概要

Total RNA Extraction Kit Mini (Blood / Bacteria / Culture Cells) は、バクテリア、培養細胞、新鮮全血などから、全 RNA を精製するために設計されています。

本製品では、まず、界面活性剤とカオトロピック塩を使用して細胞を溶解させ、RNase を不活性化します。次に、フィルターカラムを使用して細胞溶解物からデブリスを取り除きます。カオトロピック溶液中の RNA は、スピニング中のガラスファイバー充填材に結合されます。不純物を洗い流した後、RNase-free Water を加えることにより、精製された RNA が溶出されます。

本製品を使用して、200bps から数 1000bps の ssRNA および dsRNA を効率よく精製することができます。精製された RNA は RT-PCR、ノーザン・ブロットリング、プライマー伸長、cDNA ライブラリ構築などの用途に使用できます。

### 品質管理

Total RNA Extraction Kit Mini (Blood / Bacteria / Cultured Cells) はロット毎に、新鮮なヒトの全血 300 μl から全 RNA を単離する方法で、品質試験を行っています。精製された全 RNA の収量は 1 μg 以上であることを、分光光度計およびホルムアルデヒドアガロースゲルを用いた分析により確認しています。

### 改良点

最新の Total RNA Extraction Kit Mini (Blood / Bacteria / Culture Cells) には、完全に細胞を溶解させるための Lysate Filter Column が標準添付されました。

### 留意点 (混入したゲノミック DNA の除去について)

本製品は選択的 RNA 結合のために最適化されていますが、RNA 抽出のプロセスにおいてゲノミック DNA の混入を完全に防ぐことは極めて困難です。混入したゲノミック DNA を完全に除去されたい場合は、プロトコールに従い DNase I (RNase フリー) を RB Column に加えてください。このとき DNase は必ず高純度のものをご使用ください。DNase に微量の RNase が含まれている場合、RNA 分解の原因となります。精製された RNA を高感度の用途に利用される場合は DNase のご使用をお勧めしますが、用途によっては、ゲノミック DNA の混入は無視できる程度であるため、必ずしも DNase をお使いいただく必要はありません。

参考文献 (1) Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615.

注意事項 (1) RB Buffer は刺激性があり有害なカオトロピック塩を含有しています。

(2) 滅菌済みで RNase フリーのピペットチップや遠心チューブを使用してください。また、RNase のコンタミを防ぐため、白衣や使い捨ての手袋を着用してください。

2

## Total RNA Extraction Kit Mini (Blood/Bacteria/Cultured Cells)

### 細胞の溶解

- RB Buffer 400 μl を白色のペレットに加え、ボルテックスで混ぜ合わせる。
- 室温で 5 分間インキュベートする。
- Filter Column を設置し、サンプル溶液をカラムに加える。
- 遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 2 分間かける。
- Filter Column を捨て、透明なる液を新しい 1.5ml 遠心チューブ (本製品に付属しません) に移し入れる。

### RNA の吸着

- RB Column を設置する。
- サンプル溶液に 70%エタノール 400 μl を加え、すぐに、ピペッティングにより混合する。
- エタノールを加えた混合溶液 500 μl を RB Column に加える。
- 遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 2 分間かける。
- 排液を捨て、残りの混合溶液を RB Column に加える。
- 遠心分離機にフルスピード (10,000xg, 13,000rpm) で 2 分間かける。
- 排液を捨て、RB Column を Collection Tube 内に戻す。

### 付加処理:

カラム上で DNase による DNA 消化を行う場合は、「推奨ステップ: 残留 DNA の分解」手順 A に従ってください。

### 洗浄

- RB Column に R-W1 Buffer 400 μl を加える。フルスピードで 1 分間、遠心。
- 排液を捨て、RB Column を Collection Tube 内に戻す。
- RB Column に (エタノールを加えた) R-Wash Buffer 600 μl を加える。
- フルスピードで 1 分間、遠心。
- 排液を捨て、RB Column を Collection Tube 内に戻す。
- 再度、遠心分離機にフルスピードで 3 分間かけて、カラム充填材を乾かす。

### RNA 溶出

- 乾いた RB Column を新しい 1.5ml 遠心チューブ (RNase フリー、本製品に付属しません) に移し入れる。
- カラム充填材の中央に、RNase-free Water 50 μl を加える。
- RNase-free Water が充填材に吸収されるまで 3 分間、チューブを立てて置く。
- 遠心分離機にフルスピードで 1 分間かけて、精製された RNA を溶出させる。

4

## バクテリア用プロトコール

ご準備いただくもの：

グラム陰性菌の場合：RT Buffer

グラム陽性菌の場合：リゾチーム溶液（下記。本製品に付属しません）

### グラム陰性の場合

1. バクテリア培養液（10<sup>9</sup>まで）を1.5ml 遠心チューブ（本製品に付属しません）に入れる。
2. 遠心分離機にフルスピード（10,000xg, 13,000rpm）で1分間かけた後、上澄み液を捨てる。細胞ペレットをボルテックスに30秒間かける。
3. RT Buffer 200  $\mu$ l を加え、ボルテックスかピペティングで、細胞ペレットを再懸濁させる。
4. 室温で5分間インキュベートする。
5. 続けて、細胞の溶解の1の処理を行う。

### グラム陽性の場合

リゾチーム溶液：

（リゾチーム 20mg/ml；20mM Tris-HCl；2mM EDTA；1% Triton X-100；pH 8.0）  
ご使用の直前にリゾチーム溶液を調製してください。

1. バクテリア培養液（10<sup>9</sup>まで）を1.5ml 遠心チューブ（本製品に付属しません）に入れる。遠心分離機にフルスピード（10,000xg, 13,000rpm）で1分間かけた後、上清を捨てる。
2. リゾチーム溶液を200  $\mu$ l 加え、ボルテックスかピペティングで、細胞ペレットを再懸濁させる。
3. 室温で10分間インキュベートする。インキュベーション中2~3分毎に、1.5ml 遠心チューブを反転させて混合する。続けて、細胞の溶解の1の処理を行う。

### 細胞の溶解

1. RB Buffer 400  $\mu$ l を細胞溶解液に加え、ボルテックスで混合する。
2. 室温で5分間インキュベートする。
3. Filter Column を設置し、サンプル溶液をカラムに加える。
4. フルスPEED（10,000xg, 13,000rpm）で2分間、遠心する。
5. Filter Column を捨て、透明なる液を新しい1.5ml 遠心チューブ（本製品に付属しません）に移す。

### RNAの吸着

6. RB Column を設置する。
7. サンプル溶液に70%エタノール400  $\mu$ l を加え、すぐに、ピペティングにより混合する。
8. エタノールを加えた混合溶液500  $\mu$ l をRB Column に加える。
9. 遠心分離機にフルスピード（10,000xg, 13,000rpm）で2分間かける。
10. 排液を捨て、残りの混合溶液をRB Column に加える。
11. 遠心分離機にフルスピード（10,000xg, 13,000rpm）で2分間かける。
12. 排液を捨て、RB Column を Collection Tube 内に戻す。

### 付加処理：

カラム上でDNaseによるDNA消化を行う場合は、「推奨ステップ：残留DNAの分解」手順Aに従ってください。

### 洗浄

13. RB Column に R-W1 Buffer 400  $\mu$ l を加える。遠心分離機にフルスピード（10,000xg, 13,000rpm）で1分間かける。
14. 排液を捨て、RB Column を Collection Tube 内に戻す。
15. RB Column に（エタノールを加えた）R-Wash Buffer 600  $\mu$ l を加える。フルスピードで1分間、遠心。
16. 排液を捨て、RB Column を Collection Tube 内に戻す。
17. 再度、遠心分離機にフルスピードで3分間かけて、カラム充填材を乾かす。

### RNA溶出

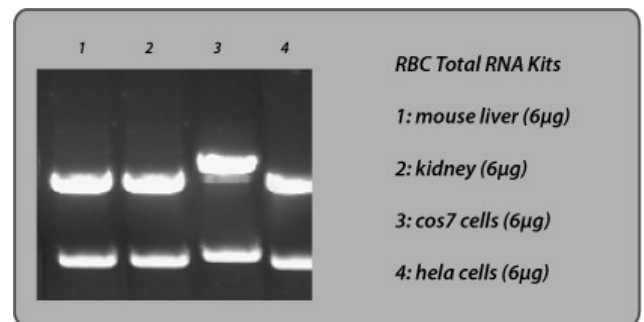
18. 乾いたRB Column を新しい1.5ml 遠心チューブ（RNaseフリー、本製品に付属しません）に移し入れる。
19. カラム充填材の中央に、RNase-free Water 50  $\mu$ l を加える。
20. RNase-free Water が充填材に吸収されるまで3分間、チューブを立てて置く。
21. 遠心分離機にフルスピードで1分間かけて、精製されたRNAを溶出させる。

5

6

### 推奨ステップ：残留DNAの分解 手順A（ミニ・カラム）

1. RB column に200  $\mu$ l の R-W1 Buffer を加える。静かに蓋を閉め、スピニング・カラム・メンブレンを洗うため、フルスピード（10,000xg, 13,000rpm）で15秒間、遠心する。排液を捨てる。
2. 続けて2a または2bの処理を行う。
  - 2a. 10  $\mu$ l の DNase I (RBC Cat No. DN050) 保存溶液（DN050のマニュアル参照）を RDD バッファー70  $\mu$ l に加える。RDD バッファーは、RNase-free DNase Set I (DN050) に添付されています。  
注意：DNase I は、物理的な変性に特別弱い酵素です。混合はボルテックスではなく、チューブの反転により行ってください。
  - 2b. 20 Unit の DNase I 保存溶液を80  $\mu$ l の DNase 反応バッファー（1M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM MnCl<sub>2</sub>, pH7.0 at 25°C）に加えてください。
3. DNase I 混合溶液（80  $\mu$ l）を直接、RB column メンブレンに加え、20-30°C で15分間インキュベートする。  
注意：DNase I 混合溶液が、直接、RB column メンブレンにアプライされるように注意してください。溶液がチューブの壁やスピニング・カラムのオリングに残っていると、DNase の消化が不完全になる可能性があります。
4. RB column に200  $\mu$ l の R-W1 Buffer を加える。静かに蓋を閉め、スピニング・カラム・メンブレンを洗うため、フルスピード（10,000xg, 13,000rpm）で15秒間、遠心する。排液を捨てる。R-Wash Buffer による洗浄ステップに進む。



製品の取扱い方法についてのお問合せは、以下の弊社窓口までご相談ください。

RBC Bioscience 社製品 日本総代理店  
有限会社 サイトローブ

〒113-0031 東京都文京区根津 2-4-2-1 階  
Tel : 03-5842-1749 Fax : 03-5842-1926  
E-mail : rbc@scitrove.co.jp

7

8