



アールエヌエー プレミアム キット

FastGene™ RNA Premium Kit

用途：培養細胞および組織等からのトータルRNAの精製とゲノムDNA除去

FG-81006 (6 preps)

FG-81050 (50 preps)

FG-81250 (250 preps)

保管条件：室温 (20-25°C) で保管してください。

製品到着後、FastGene™ mini-elute columnは2-8°Cで保存してください。

DNase I (凍結乾燥) は、輸送時には凍結乾燥の状態です。凍結乾燥状態では、常温で保管してください。

また、DNase I 再溶解液 (DNase I reconstitution solution) で溶解した DNase I は、-20°Cまたは4°Cで保存してください。












詳しくは「キットの保管および安定性」(4ページ) をよくご確認ください。

FastGene™ RNA Premium Kit は、研究目的での使用に限られます。

目次

クイックガイド.....	3
コンポーネント.....	4
キットの保管及び安定性.....	4
安全にご使用いただくために.....	5
キットの仕様.....	6
FastGene™ RNA Basic Kit / FastGene™ RNA Premium Kitの原理.....	6
精製したRNAの定量、品質チェック、保存.....	7
事前の注意事項・重要事項.....	8
試薬の事前調製と準備.....	9
プロトコル.....	10
DNase I 処理：プロトコル選択ガイド.....	13
オプション：オンカラムDNase I 処理.....	14
トラブルシューティング.....	17
ご注文情報.....	19
お問い合わせ.....	19

クイックガイド

ステップ	スタンダードプロトコル	ラーズインプットプロトコル
サンプルの準備と量の確認	< 5×10 ⁶ 培養細胞 < 10 mg 組織	< 1×10 ⁷ 培養細胞 < 20 mg 組織
細胞の溶解とホモジナイズ	 350μL バッファー RL* ¹ 添加後十分にホモジナイズ S	 600μL バッファー RL* ¹ 添加後十分にホモジナイズ S
ライセートの清澄化	  FastGene™ RNA filter column にライセート添加 ≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min FastGene™ RNA filter column 廃棄後 ろ液を回収	 600μL バッファー RL* ¹ 添加後十分にホモジナイズ S
カラム結合条件の調整	 350μL 70% エタノール ピペティングで混合	 600μL 70% エタノール ピペティングで混合
カラム結合	  FastGene™ RNA binding column に 最大 700μL までのサンプル溶液を添加 ≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min ろ液廃棄後 カラムを元のコレクションチューブ (2.0mL) に戻す	サンプル溶液がなくなるまで繰り返す
メンブレン洗浄 1 (タンパク除去)	 600μL バッファー RW1 ≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 30 s カラムを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移す	
メンブレン洗浄 2 (塩類の除去)	 700μL バッファー RW2* ¹ ≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 30 s カラムを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移す	
メンブレン乾燥	 フルスピードで遠心 (室温: 20 ~ 25°C) 1min カラムを新しいコレクションチューブ (1.5mL) に移す	
溶出	 50μL バッファー RE (注: メンブレンの中央に添加) ≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min FastGene™ RNA binding column 廃棄後 溶出液を回収 S	
DNase I 反応条件の調整	 5μL 10x DNase I reaction buffer	
DNase I 反応 (DNAの分解)	 1μL DNase I* ¹ ピペティングで混合 (ピペットを50μLにセット) インキュベート (室温: 20 ~ 25°C) 10 min	
カラム結合条件の再調整	 250μL バッファー RBD* ¹ ピペティングで混合	
カラム結合	  FastGene™ RNA mini-elute column にサンプル溶液を添加 ≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min ろ液廃棄後 カラムを元のコレクションチューブ (2.0mL) に戻す	
メンブレン洗浄 3 (塩類と分解DNAの除去)	 700μL バッファー RW2* ¹ ≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 30 s カラムを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移す	
メンブレン乾燥	 フルスピードで遠心 (室温: 20 ~ 25°C) 1 min カラムを新しいコレクションチューブ (1.5mL) に移す	
溶出	 適量* ² の バッファー RE (注: メンブレンの中央に添加) ≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min FastGene™ RNA mini-elute column 廃棄後 溶出液を回収	

*1: これらの試薬は事前調製が必要です。 *2: スタンダードプロトコル 20μL (10 ~ 50μL)、ラーズインプットプロトコル 50μL (20 ~ 50μL)

S Safety Stopping Point. この操作後、-70°C 以下での保存も可能です。

コンポーネント

FastGene™ RNA Premium Kit	FG-81006 6 preps/kit	FG-81050 50 preps/kit	FG-81250 250 preps/kit
溶解バッファー (RL)	4 mL	25 mL	125 mL
洗浄バッファー 1 (RW1)	4 mL	35 mL	170 mL
洗浄バッファー 2 (RW2)	2 mL	20 mL	2×50 mL
RNA 再結合バッファー (RBD)	1 mL	8 mL	36 mL
溶出バッファー (RE : RNase free water)	1.5 mL	30 mL	200 mL
DNaseI 再溶解液 (DNaseI reconstitution solution)	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
10x DNaseI 反応バッファー (10x DNaseI reaction buffer)	50 μL	500 μL	2×1 mL
DNaseI (凍結乾燥)	110 Kunitz units	110 Kunitz units	560 Kunitz units
FastGene™ RNA filter column (イエロー)	6 本	50 本	250 本
FastGene™ RNA binding column (グリーン)	6 本	50 本	250 本
FastGene™ RNA mini-elute column (ホワイト)	6 本	50 本	250 本
コレクションチューブ (1.5mL)	12 本	100 本	500 本
コレクションチューブ (2.0mL)	18 本	150 本	750 本

キットに含まれないアイテム

試薬：次のいずれかの還元剤

- ・ DTT (ジチオスレイトール)
- ・ TCEP-HCl (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩)
- ・ 2-ME (2-メルカプトエタノール)

70% エタノール

96-100% エタノール

消耗品：1.5mL 遠心チューブ、滅菌済みディスポーザブルピペットチップ

防護用品 (白衣、グローブ、ゴーグル、マスク)

装置：マニュアルピペット、遠心チューブ遠心機、ヒートブロック、ボルテックスミキサー、ホモジナイザー

キットの保管および安定性

FastGene™ Premium Kit は室温 (15 ~ 25℃) で保管してください。

ただし、FastGene™ mini-elute column は、お受け取り後、直ちに2 ~ 8℃で保存してください。
(FastGene™ mini-elute columnを室温で保管しますと、性能が低下いたします。)

DNaseI (凍結乾燥) は、輸送時には凍結乾燥の状態です。凍結乾燥状態では、常温で保管してください。また、DNaseI再溶解液 (DNaseI reconstitution solution) で溶解した DNaseIは、-20℃または4℃で保存してください。

溶解したDNase Iを-20℃で保存する場合、保存期限は溶解後9か月です。ただし、凍結融解を繰り返さないために、適量ずつ分注して保存してください。

溶解したDNase Iを4℃で保存する場合、保存期限は溶解後6週間です。ただし、コンタミネーションを防ぐために、適量ずつ分注して保存してください。

この条件でキットを保管した場合、キットの性能は製造後15か月間保証されます。

安全にご使用いただくために

I) 取扱い上の注意

- 本製品は研究用です。診断用・治療用にはご使用にならないでください。
- 本キットの使用に際しては、実験に適した白衣、使い捨てグローブ、保護ゴーグルを着用してください。
- 使用期限の過ぎたキットは使わないでください。
- バッファーやカラムなど、複数のロットを組み合わせ使用しないでください。
- 本キットのバッファーが皮膚、眼、粘膜に付着しないようご注意ください。万一付着した場合には、すぐに大量の水で洗い流して医療機関で適切な処置を受けてください。また、試薬をこぼした場合には、水で薄めてから拭き取ってください。

溶解バッファー RL

グアニジンチオシアン酸塩を含みます：刺激物

洗浄バッファー RW1

グアニジン塩酸塩、エタノールを含みます：刺激物、引火物

RNA再結合バッファー RBD

グアニジンチオシアン酸塩を含みます：刺激物

II) 実験室での操作方法

- すべてのサンプル及び廃棄物は感染性のあるものとして、研究室の安全対策に沿って取り扱ってください。
取り扱う方は溶解バッファー処理により病原性の不活性化を最大限に行い、各自治体が定める安全規制に従い適切な措置をとってください。日本ジェネティクス株式会社は、溶解バッファーで処理されたサンプルが完全に不活性及び非感染性であることを保証致しません。感染性の疑いのあるサンプルを取り扱った場合は、サンプルの処理が完了後、使い捨てプラスチック器具をすべてオートクレーブ滅菌して廃棄してください。
- 実験室の作業区域での飲食や喫煙は避けてください。
- サンプルや試薬を扱う際は、使い捨ての保護手袋、白衣、ゴーグルを着用してください。
- バクテリア、ウイルス、リボヌクレアーゼを試薬に混入させないでください。
試薬ボトルから試薬を分注する際は、DNase/RNaseフリー、パイロジェン/エンドトキシンフリーの使い捨てピペットとチップを使用してください。
- サンプルや試薬の使用後は、手を十分洗ってください。

キットの仕様

		スタンダード	ラージインプット
推奨サンプル量	培養細胞	< 5×10 ⁶	< 1×10 ⁷
	組織*	< 10 mg	< 20 mg
溶出量		20μL (10~50μL)	50μL (20~50μL)
所要時間 (6 prepsあたり)		約60分間	約60分間
フォーマット		シリカメンブレン法	

*組織によって最適な前処理をお選び下さい、サンプルや部位によって得られる収量は異なります。

一般的な収量

- ・ 培養細胞 (1×10⁶ HeLa 細胞) の場合 : 10-20 μg
- ・ 組織 (20mg マウス肝臓組織) の場合 : 50-100 μg

FastGene™ RNA Basic Kit/ FastGene™ RNA Premium Kit の原理

FastGene™ RNA Basic Kit および FastGene™ RNA Premium Kit は、培養細胞および組織等からトータルRNAサンプルを精製します。精製したRNAは、RT-PCR、qPCR、cDNA合成、ノーザンブロット、次世代シーケンスなど、さまざまなダウンストリームアプリケーションに使用できます。RNAの分解を防ぐため、サンプルは最初にRNaseを阻害する溶解バッファー RLで処理します。この処理により、分解を受けていない、より完全なRNAを精製できます。この溶解液にエタノールを添加し、FastGene™ 結合カラムのシリカメンブレンに最適なRNA結合条件に調整します。次に、添付の洗浄バッファー RW1およびRW2を用いて夾雑物をカラムから効率的に洗い流します。最後に、高品質RNAを溶出バッファー RE (DEPC水) で溶出します。精製したRNAは、そのままダウンストリームで使用するか、あるいは-70℃以下のフリーザーで保存できます。

FastGene™ RNA Basic Kit および FastGene™ RNA Premium KitのRNA選択的な結合シリカメンブレンは、通常、DNase I処理せずにDNAのほとんどを効率的に除去しますが、溶出したRNA溶液からgDNAを完全に除去することはできません。一部の極めてDNA感受性が高いダウンストリームアプリケーションでは、さらにDNA除去が必要になる可能性があります。この場合、FastGene™ RNA Premium Kitをご使用ください。最適化したDNase I処理ステップとFastGene™ mini-elute columnのテクノロジーを併用することで、高純度で高品質なRNA精製を保証します。他の市販キットとは異なり、DNase I処理はメンブレン上 (オンカラム) ではなく溶出後の溶液で行います。これによりDNA分解の効率が極めて向上します (*)。処理後の溶液をRNA結合能の高いFastGene™ mini-elute columnのメンブレンに結合させて回収します。このカラムはメンブレンの直径が小さいため、溶出液量を10μLまで低減でき、結果として高濃度のRNAを得ることも可能です。

*オプションとしてFastGene™ RNA Basic Kitでは簡易ゲノムDNA除去、FastGene™ RNA Premium Kitでは短時間操作を目的とした、オンカラムDNase I処理のサポートプロトコルもご利用いただけます。

精製した RNA の定量、品質チェック、保存

あらゆるダウンストリームアプリケーションで最適な条件を確実に決定するため、本キットで精製した RNA の量および品質の測定をお勧めします。精製した RNA の濃度および純度は、260nm と 280nm の吸光度で最も容易に測定できます。260nm での測定値 1 O.D. は、RNA 40 μ g/mL に相当します。分光吸光度測定の際、溶出バッファー RE は DEPC 処理水のため弱酸性となり、吸光度値を低下させることがあります。吸光度測定時には、事前に TE バッファー等の緩衝液で希釈することをお奨めします。高純度の核酸の A_{260}/A_{280} 比は 2.0、高純度のタンパク質の同比は 0.6 を示すため、タンパク質の混入があれば、 A_{260}/A_{280} 比の値を低下させます。精製した RNA の A_{260}/A_{280} 比が 1.8 ~ 2.0 であれば、90 ~ 100% の高い純度であることを示します。

RNA の品質は、変性アガロースゲル電気泳動で評価することも可能です。最適条件下で精製された RNA では、ゲル上に 2 本の明瞭なバンド、すなわち、真核生物では 28S および 18S リボソーム RNA のバンド（バクテリアでは 23S および 16S）が確認されます。RNA 抽出操作中や抽出後の RNA の取扱い操作中、保存中に RNA の分解が生じている場合、低分子量側へ RNA のスミアが発生します。

本キットで精製した RNA は、-70 $^{\circ}$ C 以下で 1 年以上、4 $^{\circ}$ C で 24 時間、室温では数時間保存できます。

事前の注意事項・重要事項

注意! 操作プロトコルを見易くするため、注意事項、重要事項は以下にまとめて記載しました。
 まずはこの項を十分にご確認いただいたうえで、実際の操作の準備を進めてください。

	プロトコルの関連 ステップ番号
初発サンプル量が多過ぎるとRNAの収量と純度が著しく低下する恐れがあります。 サンプル量が過剰にならないよう正確なサンプル量の確認を行ってください。	1
初発サンプルで細胞を用いる場合、遠心(例 300 ~ 400×g)して細胞ペレットを準備します。 このとき、培地が残らないよう完全に取り除いてください。 培地が残留すると、溶解が不十分になったり、メンブレンへのRNAの結合効率が低下したりすることで、RNAの収量や純度が低下する恐れがあります。 また、溶解バッファー RL を添加する直前に、タッピングで細胞ペレットを軽くほぐしておくこと、効率的に溶解できます。	1
溶解バッファー RL、洗浄バッファー RW2、DNase I 酵素溶液、RNA 再結合バッファー RBD は事前調製が必要です。 本取扱説明書「試薬の事前調製と準備」の項をご確認ください。	2,8,13, 14,16
溶解バッファー RL は使用分のみ事前調製して下さい。	2
溶解バッファー RL に沈殿が生じていないか、事前にご確認ください。 沈殿が生じていた場合、加温(56℃)により沈殿が消えたことを確認後、室温(20 ~ 25℃)に戻してからご使用ください。	2
最初の溶解バッファー RL で処理されるまでにRNAの分解が進まないよう、十分な注意を払って初発サンプルをご準備ください。	2
初発サンプルに溶解バッファー RL を添加後、直ちにホモジナイズを実施してください。 (このとき、冷却しながら実施しないでください。冷却すると溶解バッファー RL に沈殿が生じ、RNAの収量や純度の低下、品質の劣化の恐れがあります。) また、できるだけ固まりが残らないよう均質になるようホモジナイズしてください。 ホモジナイズが不完全になると、RNAの収量や純度の低下、カラムの目詰まりを引き起こす恐れがあります。	2
溶解バッファー RL を添加してホモジナイズしたライセートは-70℃以下で数カ月間保存できます。	2
凍結したライセートを使用する場合、凍結したライセートは完全に解凍してください。 また凍結によりバッファーの塩類が析出している可能性があるため、37℃でインキュベートし、塩類を溶解させてください。 一方で、長時間のインキュベートはRNAが分解する可能性があるため、ご注意ください。 もしも不溶性物質が確認される場合、3000 ~ 5000 x g で5分間、室温(20 ~ 25℃)で遠心し、室温(20 ~ 25℃)で遠心し、上清をFastGene™ RNA filter columnに移してください。	2
全ての遠心操作は室温(20 ~ 25℃)で実施してください。 20℃以下、あるいは冷却した場合、サンプル溶液に沈殿が発生し、RNAの収量や純度が低下する恐れがあります。 同様に、全ての操作は室温(20 ~ 25℃)で実施してください。	3,5,7, 8,11,15, 16,17,19

試薬の事前調製と準備

溶解バッファー RL

精製ごとにサンプル数に合わせて、**使用分のみ**次のいずれかの還元剤を添加ください。

終濃度 40mM DTT

または 終濃度 20mM TCEP-HCl

または 終濃度 1%(v/v) 2-ME

〈添加比率の具体例〉

還元剤	還元剤の量	Buffer RLの量	終濃度
2M DTTの場合	20 μ L	1 mL	40 mM
1M TCEPの場合	20 μ L	1 mL	20 mM
2-ME*の場合	10 μ L	1 mL	1%*

* 一般的に販売されている 2-ME は通常 14.3M です。終濃度 1% はモル濃度で 143mM となります。

洗浄バッファー RW2

6 preps	50 preps	250 preps
2 mL (1ボトルあたり) に対して 8 mL のエタノール (96-100%) を添加、混合します	20 mL (1ボトルあたり) に対して 80 mL のエタノール (96-100%) を添加、混合します	50 mL (1ボトルあたり) に対して 200 mL のエタノール (96-100%) を添加、混合します

DNase I (凍結乾燥)

6 preps	50 preps	250 preps
55 μ L の DNase I 再溶解液* を DNase I (凍結乾燥) のチューブに 添加、混合します	55 μ L の DNase I 再溶解液* を DNase I (凍結乾燥) のチューブに 添加、混合します	280 μ L の DNase I 再溶解液* を DNase I (凍結乾燥) のチューブに 添加、混合します

*DNase I 再溶解液のラベルには「DNase I reconstitution solution」と表記されています。お間違えのないようご注意ください。

(ご注意)

- 凍結乾燥された DNase I は粉末が見え難いことがあります。開栓前に遠心機でスピンドウし、粉末をチューブ底に集めた状態にしてから DNase I 再溶解液を添加してください。
- ゆっくりと混合して、完全に溶解してください。DNase I は絶対にボルテックスにかけないでください。
- DNase I (凍結乾燥) は、輸送時には凍結乾燥の状態です。凍結乾燥状態では、常温で保管してください。また、DNase I 再溶解液 (DNase I reconstitution solution) で溶解した DNase I は、-20 $^{\circ}$ C または 4 $^{\circ}$ C で保存してください。詳しくは「キットの保管および安定性」(4 ページ) をよくご確認のうえ、操作してください。

RNA 再結合バッファー RBD

6 preps	50 preps	250 preps
1 mL (1ボトルあたり) に対して 1 mL のエタノール (96-100%) を添加、混合します	8 mL (1ボトルあたり) に対して 7 mL のエタノール (96-100%) を添加、混合します	36 mL (1ボトルあたり) に対して 34 mL のエタノール (96-100%) を添加、混合します

プロトコル

精製を開始する前に、溶解バッファー RL に還元剤が添加されていることを確認してください。またRNA再結合バッファー RBD及び洗浄バッファー RW2に、「試薬の事前調整と準備」(9ページ) 記載のエタノールがそれぞれ正しく添加されていることを確認してください。そして、DNase Iが「試薬の事前調整と準備」(9ページ) の手順に従って用意されていることを確認してください。

サンプルの準備と量の確認										
1. 適切なチューブに初発サンプルを準備します。可能な限り迅速に次のステップに進みます。❶										
	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>スタンダード</td> <td>ラージインプット</td> </tr> <tr> <td>細胞：</td> <td>～5×10⁶個</td> <td>～1×10⁷個</td> </tr> <tr> <td>組織：</td> <td>～10mg</td> <td>～20mg</td> </tr> </table>		スタンダード	ラージインプット	細胞：	～5×10 ⁶ 個	～1×10 ⁷ 個	組織：	～10mg	～20mg
	スタンダード	ラージインプット								
細胞：	～5×10 ⁶ 個	～1×10 ⁷ 個								
組織：	～10mg	～20mg								
細胞の溶解とホモジナイズ										
2. 溶解バッファー RL*を添加します。軽くボルテックスし、直ちにホモジナイズします。❶										
	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>スタンダード</td> <td>ラージインプット</td> </tr> <tr> <td></td> <td>350μL</td> <td>600μL</td> </tr> </table>		スタンダード	ラージインプット		350μL	600μL			
	スタンダード	ラージインプット								
	350μL	600μL								
	ホモジナイズしたライセートは-70℃以下で数カ月間保存できます。❶									
	*事前に還元剤を添加ください。詳細は「試薬の事前調整と準備」(9ページ) をご確認ください。									
ライセートの清澄化										
3. ライセートの粘性を下げ、清澄化するため、FastGene™ RNA filter columnにロードし、≥10,000xgで1分間、室温(20～25℃)で遠心します。❶										
	FastGene™ RNA filter columnを廃棄し、ろ液を回収します。									
カラム結合条件の調整										
4. 清澄化したライセートに70%(v/v) エタノールを添加し、ピペティングで十分に混合します。										
	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>スタンダード</td> <td>ラージインプット</td> </tr> <tr> <td></td> <td>350μL</td> <td>600μL</td> </tr> </table>		スタンダード	ラージインプット		350μL	600μL			
	スタンダード	ラージインプット								
	350μL	600μL								
*以降のステップ5～17まで、「スタンダード」、「ラージインプット」ともに同じ操作になります。										
カラム結合										
5. 1回に最大700μLまでのサンプル溶液をFastGene™ RNA binding columnにロードし、≥10,000xgで1分間、室温(20～25℃)で遠心します。❶										
6. カラムを通過したろ液をコレクションチューブ(2.0mL)から廃棄し、FastGene™ RNA binding columnを元のコレクションチューブ(2.0mL)に戻します。サンプル溶液がなくなるまで、5-6のステップを繰り返します。										
メンブレン洗浄1(タンパク除去)										
7. 600μLの洗浄バッファー RW1をFastGene™ RNA binding columnに加え、≥10,000xgで30秒間、室温(20～25℃)で遠心します。❶										
	FastGene™ RNA binding columnを新しいコレクションチューブ(2.0mL)に移してセットし、カラムを通過したろ液と元のコレクションチューブ(2.0mL)を廃棄します。									

❶ 必ず「事前の注意事項・重要事項」(8ページ)をよくご確認ください。

<p>メンブレン洗浄 2 (塩類の除去)</p> <p>8. 700μLの洗浄バッファー RW2* をFastGene™ RNA binding columnに加え、$\geq 10,000$xgで30秒間、室温(20 ~ 25$^{\circ}$C)で遠心します。❶ FastGene™ RNA binding columnを新しいコレクションチューブ(2.0mL)に移してセットし、カラムを通過したろ液と元のコレクションチューブ(2.0mL)を廃棄します。 *事前にエタノールを添加ください。詳細は「試薬と事前調製と準備」(9ページ)をご確認ください。</p>
<p>メンブレン乾燥</p> <p>9. メンブレンを乾燥させるために、フルスピードで1分間、室温(20 ~ 25$^{\circ}$C)で遠心します。 FastGene™ RNA binding columnを新しいコレクションチューブ(1.5mL)に移してセットし、カラムを通過したろ液と元のコレクションチューブ(2.0mL)を廃棄します。</p>
<p>溶出</p> <p>10. 50μLの溶出バッファー RE をFastGene™ RNA binding columnのメンブレンの中央に添加します。 11. $\geq 10,000$xgで1分間、室温(20 ~ 25$^{\circ}$C)で遠心し、精製したRNAを溶出します。❶ FastGene™ RNA binding columnを廃棄し、溶出液を回収します。 このステップで溶出したRNAは-70$^{\circ}$C以下で一年以上保存できます。</p>
<p>DNase I 反応条件の調製</p> <p>12. 5μLの10\timesDNase I 反応バッファー(10\timesDNase I reaction buffer)を50μLの溶出サンプルに添加します。</p>
<p>DNase I 反応 (DNA の分解)</p> <p>13. 1μLのDNase I 酵素溶液*を添加し、50μLにセットしたピペットに新しいチップをつけて、ピペッティングで十分に混合します。フタを閉め室温(20 ~ 25$^{\circ}$C)で10分間インキュベートします。 *事前に調製してください。詳細は「試薬と事前調製と準備」(9ページ)をご確認ください。</p>
<p>カラム結合条件の再調製</p> <p>14. 250μLのRNA再結合バッファー RBD*を添加し、ピペッティングで十分に混合します。 *事前にエタノールを添加ください。詳細は「試薬と事前調製と準備」(9ページ)をご確認ください。</p>
<p>カラム結合</p> <p>15. 全てのサンプル溶液をFastGene™ mini-elute columnにロードし、$\geq 10,000$xgで1分間、室温(20 ~ 25$^{\circ}$C)で遠心します。❶ カラムを通過したろ液をコレクションチューブ(2.0mL)から廃棄し、FastGene™ mini-elute columnを元のコレクションチューブ(2.0mL)に戻します。</p>
<p>メンブレン洗浄 3 (塩類と分解 DNA の除去)</p> <p>16. 700μLの洗浄バッファー RW2* をFastGene™ mini-elute columnに加え、$\geq 10,000$xgで30秒間、室温(20 ~ 25$^{\circ}$C)で遠心します。❶ FastGene™ mini-elute columnを新しいコレクションチューブ(2.0mL)に移してセットし、カラムを通過したろ液と元のコレクションチューブ(2.0mL)を廃棄します。</p>

❶ 必ず「事前の注意事項・重要事項」(8ページ)をよくご確認のうえ、操作してください。

メンブレン乾燥

17. メンブレンを乾燥させるために、フルスピードで1分間、室温 (20 ~ 25℃) で遠心します。❶
FastGene™ mini-elute columnを新しいコレクションチューブ (1.5mL) に移してセットし、カラムを通過したろ液と元のコレクションチューブ (2.0mL) を廃棄します。

溶出

18. 溶出バッファー RE をFastGene™ mini-elute columnのメンブレンの中央に添加します。

	スタンダード	ラージインプット
推奨溶出量	20μL	50μL
溶出可能範囲	10-50μL	20-50μL

※RNA の溶出は概ね 3μg/μL が濃度の上限になります。

また高濃縮することは、回収率の低下を招く場合があります。適切な溶出バッファー量でご使用下さい。

19. $\geq 10,000xg$ で1分間、室温 (20 ~ 25℃) で遠心し、精製したRNAを溶出します。❶
FastGene™ mini-elute columnを廃棄し、溶出液を回収します。

❶ 必ず「事前の注意事項・重要事項」(8ページ) をよくご確認のうえ、操作してください。

DNase I 処理：プロトコル選択ガイド

DNA 除去へのこだわり

一般的に RNA 精製では DNase I 処理が必須ではありません。

しかし DNA 感受性が高いダウンストリームアプリケーションの場合、次の DNase I 処理方法を選択することができます。

- 溶出後に DNase I 処理 (FastGene™ RNA Premium Kit)
- オンカラム DNase I 処理 (オプション)

<溶出後に DNase I 処理>

本方法の場合、溶出した高純度 RNA 溶液中で DNase I 処理を行います。

RNA をカラムに結合した後、通常の操作どおりにカラムの洗浄を行っているため、塩類などの不純物は除去されます。

このように DNase I 酵素反応に最も適した条件下で処理を行うため、安定して高い DNA 除去効率が期待できます。

<オンカラム DNase I 処理>

操作の簡便性から実施されることが多い方法で、具体的には、RNA をカラムに結合後、カラム上で DNase I 処理を行います。

カラムによる RNA 精製では、RNA は塩濃度の高いバッファーを使用することにより、シリカメンブレンに結合させます。

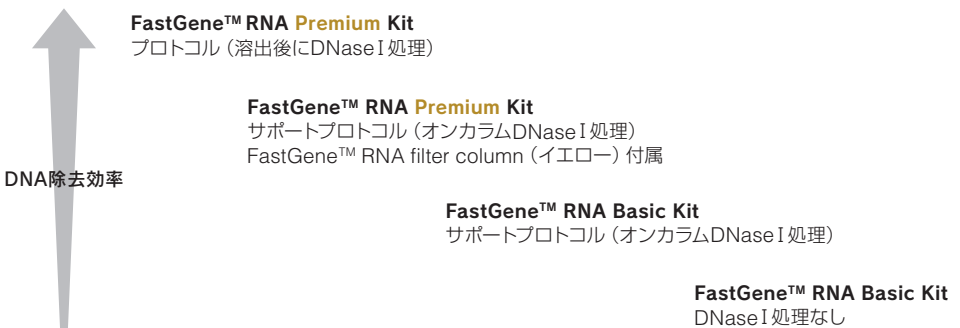
しかし、この高塩濃度のバッファーは、DNase I 処理においては、酵素活性に悪影響を与えます。

このため、オンカラムで DNase I 処理をする際には、塩類の除去のために、いったんシリカメンブレンを洗浄バッファーで洗浄する必要があります。

塩類の除去が不十分な場合、DNase I 活性が影響を受け、DNA の除去効率が下がります。

一方で、塩濃度が低いバッファーでは、RNA の結合が弱くなってしまうため、RNA の収量に影響が出るリスクがあります。

通常、DNA 除去効率は次の通りに期待されます。



高純度で高品質な RNA 精製は FastGene™ RNA Premium Kit のプロトコル (溶出後に DNase I 処理) をご使用ください。

オプション：オンカラム DNase I 処理

事前の注意事項・重要事項

注意！ 操作プロトコルを見易くするため、注意事項、重要事項は以下にまとめて記載しました。
 まずはこの項を十分にご確認いただいたうえで、実際の操作の準備を進めてください。

	プロトコルの 関連ステップ番号
全ての遠心操作は室温 (20 ~ 25°C) で実施してください。 20°C以下、あるいは冷却した場合、サンプル溶液に沈殿が発生し、RNA の収量や純度が低下する恐れがあります。 同様に、全ての操作は室温 (20 ~ 25°C) で実施してください。	S1, S3, S4
DNase I 酵素溶液、DNase I 反応溶液、洗浄バッファー RW2は事前調製が必要です。 下記の「試薬の事前調製と準備」の項をご確認ください。	S2, S3
オンカラムDNase I 処理の場合、DNase I 反応バッファーはそのまま使用せず、 下記の「試薬の事前調製と準備」の通り調製のうえ、使用してください。	S2

試薬の事前調製と準備

DNase I (凍結乾燥)

6 preps	50 preps	250 preps
55 μ L の DNase I 再溶解液*を DNase I (凍結乾燥) のチューブに 添加、混合します	55 μ L の DNase I 再溶解液*を DNase I (凍結乾燥) のチューブに 添加、混合します	280 μ L の DNase I 再溶解液*を DNase I (凍結乾燥) のチューブに 添加、混合します

*DNase I 再溶解液のラベルには "DNase I reconstitution solution" と表記されています。お間違えのないようご注意ください。

(ご注意)

- 凍結乾燥された DNase I は粉末が見え難いことがあります。開栓前に遠心機でスピンドウンし、粉末をチューブ底に集めた状態にしてから DNase I 再溶解液を添加してください。
- ゆっくりと混合して、完全に溶解してください。DNase I は絶対にボルテックスにかけないでください。
- DNase I (凍結乾燥) は、輸送時には凍結乾燥の状態です。凍結乾燥状態では、常温で保管してください。また、DNase I 再溶解液 (DNase I reconstitution solution) で溶解した DNase I は、-20 °C または 4 °C で保存してください。詳しくは「キットの保管および安定性」(4 ページ) をよくご確認のうえ、操作してください。

DNase I 反応溶液 (オンカラム DNase I 処理用)

精製ごとに prep 数に合わせて、**使用分のみ**調製してください。

試薬	1 prepあたり
DNase I 酵素溶液	1 μ L
10x DNase I 反応バッファー	7 μ L
溶出バッファー RE	62 μ L

洗浄バッファー RW2

6 preps	50 preps	250 preps
2 mL (1ボトルあたり) に対して 8 mL のエタノール (96-100%) を添加、混合します	20 mL (1ボトルあたり) に対して 80 mL のエタノール (96-100%) を添加、混合します	50 mL (1ボトルあたり) に対して 200 mL のエタノール (96-100%) を添加、混合します

オプション：オンカラム DNase I 処理

サポートプロトコル




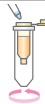




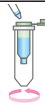
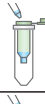
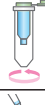



下記の操作を開始する前に、DNase I が「オプション：オンカラム DNase I 処理」の「試薬の事前調製と準備」(14ページ)の手順に従って用意されていることを確認してください。また洗浄バッファ RW2に、「オプション：オンカラム DNase I 処理」の「試薬の事前調製と準備」(14ページ)記載のエタノールがそれぞれ正しく添加されていることを確認してください。

サンプル準備～カラム結合
*プロトコルのステップ6までの操作を行います。
メンブレン洗浄 1 (タンパク除去と反応条件の調製)
<p>S1. 300 μL*の洗浄バッファ RW1をFastGene™ RNA binding column に加え、$\geq 10,000$xgで30秒間、室温 (20 ~ 25°C) で遠心します。❶</p> <p>FastGene™ RNA binding columnを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移してセットし、カラムを通過したろ液と元のコレクションチューブ (2.0mL) を廃棄します。遠心後カラムを移す際に、DNase I 処理の効率に影響するため、カラムに洗浄バッファが付かないように注意してください。</p> <p>*量が通常のプロトコルと異なりますので、ご注意ください。</p>
DNase I 反応 (DNA の分解)
<p>S2. 70 μLのDNase I 反応溶液*をFastGene™ RNA binding columnのメンブレンの中央に添加し、フタを閉め室温 (20 ~ 25°C) で10分間インキュベートします。❶</p> <p>*事前に調製してください。 詳細は「オプション：オンカラム DNase I 処理」の「試薬の事前調製と準備」(14ページ)をご確認ください。</p>
メンブレン洗浄 2 (分解 DNA と酵素の除去)
<p>S3. 300 μL*の洗浄バッファ RW1をFastGene™ RNA binding column に加え、$\geq 10,000$xgで30秒間、室温 (20 ~ 25°C) で遠心します。❶</p> <p>FastGene™ RNA binding columnを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移してセットし、カラムを通過したろ液と元のコレクションチューブ (2.0mL) を廃棄します。</p> <p>*量が通常のプロトコルと異なりますので、ご注意ください。</p>
メンブレン洗浄 3 (塩類の除去)
<p>S4. 700 μLの洗浄バッファ RW2をFastGene™ RNA binding columnに加え、$\geq 10,000$xgで30秒間、室温 (20 ~ 25°C) で遠心します。❶</p> <p>FastGene™ RNA binding columnを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移してセットし、カラムを通過したろ液と元のコレクションチューブ (2.0mL) を廃棄します。</p>
メンブレン乾燥～溶出
*以降のステップはプロトコルのステップ17～19と同じ操作になります。

❶ 必ず「オプション：オンカラム DNase I 処理」の「事前の注意事項・重要事項」(14ページ)をよくご確認ください。うえ、操作してください。

オプション：オンカラム DNase I 処理

サポートプロトコル（クイックガイド）

ステップ	スタンダードプロトコル	ラージインプットプロトコル
サンプルの準備と量の確認	< 5×10 ⁶ 培養細胞 < 10 mg 組織	< 1×10 ⁷ 培養細胞 < 20 mg 組織
細胞の溶解とホモジナイズ	 350 μL バッファー RL* ¹ 添加後 十分にホモジナイズ S	 600 μL バッファー RL* ¹ 添加後 十分にホモジナイズ S
ライセートの清澄化	  FastGene™ RNA filter column にライセート添加 ≥ 10,000 x g (室温：20 ~ 25℃) 1 min FastGene™ RNA binding column 廃棄後 溶出液を回収	
カラム結合条件の調整	 350 μL 70% エタノール ピペッティングで混合	 600 μL 70% エタノール ピペッティングで混合
カラム結合	  FastGene™ RNA binding column に 最大 700 μL までのサンプル溶液を添加 ≥ 10,000 x g (室温：20 ~ 25℃) 1 min 溶液廃棄後 カラムを元のコレクションチューブ (2.0mL) に戻す } サンプル溶液がなくなるまで繰り返す	
S1 メンブレン洗浄1 (タンパク除去と反応条件の調整)	 300 μL バッファー RW1 ≥ 10,000 x g (室温：20 ~ 25℃) 30 s カラムを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移す	
S2 DNase I 反応 (DNAの分解)	 70 μL DNase I 反応溶液* ¹ (注：メンブレンの中央に添加) インキュベート (室温：20 ~ 25℃) 10 min	
S3 メンブレン洗浄2 (分解DNAと酵素の除去)	 300 μL バッファー RW1 ≥ 10,000 x g (室温：20 ~ 25℃) 30 s カラムを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移す	
S4 メンブレン洗浄3 (塩類の除去)	 700 μL バッファー RW2* ¹ ≥ 10,000 x g (室温：20 ~ 25℃) 30 s カラムを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移す	
メンブレン乾燥	 フルスピードで遠心 (室温：20 ~ 25℃) 1 min カラムを新しいコレクションチューブ (1.5mL) に移す	
溶出	 適量* ² のバッファー RE (注：メンブレンの中央に添加) ≥ 10,000 x g (室温：20 ~ 25℃) 1 min FastGene™ RNA binding column を廃棄し、溶出液を回収	

*1：これらの試薬は事前調整が必要です。 *2：スタンダードプロトコル 20 μL (10 ~ 50 μL)、ラージインプットプロトコル 50 μL (20 ~ 50 μL)

S Safety Stopping Point. この操作後、-70℃以下での保存も可能です。

トラブルシューティング

問題	可能性のある原因	対応方法
RNAの収量が低い	初発サンプル量が少なすぎる	初発サンプル量を増やしてください。それが困難な場合はキャリアRNAの添加をご検討ください。カラム結合時のRNA濃度が低すぎると、メンブレンへの結合効率が低下します。
	初発サンプル量が多すぎる	初発サンプル量がキットの推奨範囲内で確認のうえ、必要に応じてサンプル量を減らしてください。初発サンプル量が多すぎると、過剰な不純物やDNAの混入によりカラムの結合容量が減り、収量が低下します。
	初発サンプルの破碎やホモジナイズが不十分	塊がなくなるまで、ホモジナイズを十分に実施してください。塊がなくなる場合、適宜溶解バッファー RLを追加してください。
	カラムからのRNAの溶出が不十分	溶出バッファー REを60℃に加温してから、溶出操作を再度実施してください。添加してから2～3分間インキュベートしてください。
	RNaseのコンタミネーション	操作中に、使用するプラスチック消耗品、試薬、器具などがRNaseで汚染されないよう、細心の注意を払ってください。なお、オートクレーブではRNaseは完全には不活化できませんのでご注意ください。
	結合したRNAに対して溶出バッファー量が不足している	FastGene™ mini-elute columnで濃縮のために溶出バッファー RE量を50μL以下に減らしている場合、バッファー量を50μLまでの範囲で増やしてください。特に結合しているRNA量が多いときに溶出バッファーREの量が少なすぎると、期待するRNA回収量が得られにくくなります。
	培養細胞の場合、細胞ペレットからの培地の除去が不十分	細胞ペレットに培地が残らないよう完全に除去してください。培地が残留すると、溶解が不十分になったり、メンブレンへのRNAの結合効率が低下したりすることで、RNAの収量や純度が低下する恐れがあります。
	エタノールの残留	洗浄バッファー RW2での洗浄後、プロトコルどおりにメンブレン乾燥を実施してください。特に次の点に注意してエタノールがキャリアオーバーしないようにしてください： ① カラムを取り外す際にコレクションチューブ内の廃液に接触しないようにする。 ② 溶出バッファー REをメンブレン中央に添加するようにする。 エタノールがメンブレンに残留すると、RNAの溶出効率が低下します。
メンブレンの過乾燥	メンブレンの乾燥ステップ後は、速やかにRNAを溶出してください。時間経過でメンブレンが乾燥しすぎるとRNA溶出効率が低下します。	
FastGene™ mini-elute columnが適切に保管されなかった	キットのお受け取り後、FastGene™ mini-elute columnが直ちに2～8℃で保管されたか、ご確認ください。FastGene™ mini-elute columnを室温で保管しますと、性能が低下いたします。	
分光光度分析の際、RNaseフリー水で希釈している	DEPC処理水は弱酸性となり、吸光度値を低下させる場合があります。事前に緩衝液 (TE バッファー等) で希釈することを推奨します。	
フィルターカラムやスピナカラムが詰まる	初発サンプル量が多すぎる	初発サンプル量がキットの推奨範囲内で確認のうえ、必要に応じてサンプル量を減らしてください。初発サンプル量が多すぎると、過剰な不純物やDNAの混入によりカラムの結合容量が減り、収量が低下します。
	初発サンプルの破碎やホモジナイズが不十分	塊がなくなるまで、ホモジナイズを十分に実施してください。塊がなくなる場合、適宜溶解バッファー RLを追加してください。
	遠心を冷却で実施している	遠心も含め、全ての操作は室温 (20～25℃) で実施してください。冷却した場合、サンプル溶液に沈殿が発生し、カラムの目詰まりの原因となります。

問題	可能性のある原因	対応方法
RNAが分解している	初発サンプルのRNAが分解している	最初の溶解バッファー RLで処理されるまでにRNAの分解が進まないよう、十分な注意を払って初発サンプルをご準備ください。
	RNaseのコンタミネーション	操作中に、使用するプラスチック消耗品、試薬、器具などがRNaseで汚染されないよう、細心の注意を払ってください。なお、オートクレーブではRNaseは完全には不活化できませんのでご注意ください。
純度が低い (A ₂₆₀ / A ₂₈₀ の値が低い)	初発サンプル量が多すぎる	初発サンプル量がキットの推奨範囲内かご確認のうえ、必要に応じてサンプル量を減らしてください。初発サンプル量が多すぎると、過剰な不純物やDNAの混入によりカラムの結合容量が減り、収量が低下します。
	培養細胞の場合、細胞ペレットからの培地の除去が不十分	細胞ペレットに培地が残らないよう完全に除去してください。培地が残留すると、溶解が不十分になったり、メンブレンへのRNAの結合効率低下したりすることで、RNAの収量や純度が低下する恐れがあります。
	分光光度分析の際、RNaseフリー水で希釈している	DEPC処理水は弱酸性となり、吸光度値を低下させる場合があります。事前に緩衝液 (TE バッファー等) で希釈することをお奨めします。
DNAのコンタミネーション	DNase I 処理時の反応液が適切に調整されていない	取扱説明書「試薬の事前調製と準備」(9 ページ) および「プロトコル」ステップ 12 と 13 (11 ページ) をご確認ください。
	初発サンプル量が多すぎる	初発サンプル量がキットの推奨範囲内かご確認のうえ、必要に応じてサンプル量を減らしてください。初発サンプル量が多すぎると、過剰な不純物やDNAが混入します。
	DNase I 処理が不十分	DNase I の反応時間を 15 ~ 20 分間まで長くしてください。
	エタノールの残留	洗浄バッファー RW2での洗浄ステップ後、プロトコルどおりにメンブレン乾燥を実施してください。特に次の点に注意してエタノールがキャリアオーバーしないようにしてください： ① カラムを取り外す際にコレクションチューブ内の廃液に接触しないようにする。 ② 溶出バッファー RE をメンブレン中央に添加するようにする。 DNase I 処理前のステップでエタノールがキャリアオーバーすると、DNase I 反応に影響することがあります。
ダウンストリームアプリケーションが上手く行かない	塩類のコンタミネーション	メンブレンの乾燥ステップ前に、カラムを新しい2mLコレクションチューブに移してセットしたか、ご確認ください。洗浄バッファーのキャリアオーバーで塩類のコンタミネーションが生じると、ダウンストリームアプリケーションに影響することがあります。
	精製後のRNAの保管が適切ではない	精製したRNAは、保管までは常に氷上で冷却し、長期間保存する場合は-70℃以下で保管してください。
	エタノールの残留	洗浄バッファー RW2 での洗浄後、プロトコルどおりにメンブレン乾燥を実施してください。特に次の点に注意してエタノールがキャリアオーバーしないようにしてください： ① カラムを取り外す際にコレクションチューブ内の廃液に接触しないようにする。 ② 溶出バッファー RE をメンブレン中央に添加するようにする。 エタノールがダウンストリームアプリケーションに影響することがあります。
RNA 溶出時の遠心で1.5mLコレクションチューブの蓋が割れる	1.5mLコレクションチューブの蓋のつなぎ目に遠心力がかかった	遠心機の仕様や設定により、この問題が見られる場合があります。この場合、チューブの蓋を遠心方向と逆向き (写真) にセットしてください。割れてしまった場合、別のヌクレアーゼフリーのチューブに入れ替えてください。



ご注文情報

キットおよびオプション

商品名	カタログナンバー
FastGene™ RNA Premium Kit (6 preps)	FG-81006
FastGene™ RNA Premium Kit (50 preps)	FG-81050
FastGene™ RNA Premium Kit (250 preps)	FG-81250
FastGene™ RNA Lysis buffer (25 mL)	FG-80RL025
FastGene™ RNA Lysis buffer (125 mL)	FG-80RL125
FastGene™ RNA DNase I set (for 50preps)	FG-81DN050
FastGene™ RNA DNase I set (for 250preps)	FG-81DN250

関連製品

商品名	カタログナンバー
FastGene™ RNA Basic Kit (6 preps)	FG-80006
FastGene™ RNA Basic Kit (50 preps)	FG-80050
FastGene™ RNA Basic Kit (250 preps)	FG-80250

※FastGene™ RNA Basic KitおよびFastGene™ RNA Premium Kitの詳細(原理)は6ページをご覧ください。

お問い合わせ

日本ジェネティクス株式会社

〒112-0004 東京都文京区後楽1丁目4番14号 後楽森ビル18階

TEL : 03-3813-0961 FAX : 03-3813-0962

より詳しい製品情報、お問い合わせの詳細、ご質問、トラブルシューティングにつきましては、弊社ウェブサイト (www.n-genetics.com) をご確認ください。

E-mail : info@genetics-n.co.jp

FastGene™ は Nippon Genetics Co.,Ltd. の登録商標です。

