

## RNAGEM™ Kit 簡易マニュアル

2020/09/10 作成

エムエス機器株式会社

以下は MicroGEM 社の公式 Website (<https://microgembio.com/>) からダウンロードできる Quick-Start Guide (QSG) や Ordering Information & Product Guide や公式 Website の記述など、複数の情報源から作成した簡易マニュアルです。必要に応じアレンジしていただけたら幸いです。なお、簡易マニュアルのもととなった QSG の版は “QSG\_010\_190531\_RNAGEM” です。

### <用途>

RNAGEM Kit はさまざまなサンプルから RNA を抽出するためのキットです。

### <内容物>

RNAGEM Kit の内容物は以下のとおりです。

- RNAGEM
- DNase I
- 10x BLUE Buffer
- 10x DNase Buffer
- 10x TE

### <溶解>

上記内容物のうち DNase I だけは凍結乾燥粉末で届きます。到着後は DNase I 粉末が入ったチューブを 10,000g x 1 分でスピンドウンし、10x DNase Buffer から 1x DNase Buffer を希釈調製して下記のように添加して溶解してください。

反応(回)	型番	1x DNase Buffer
50	RTP0050	110 $\mu$ L
100	RTP0100	250 $\mu$ L
500	RTP0500	1050 $\mu$ L
1000	RTP1000	2本の粉末チューブに 1050 $\mu$ L ずつ

### <保管>

RNAGEM Kit は安定ゆえ室温配送されますが、到着後の未開封キットは 4℃で保管してください。チューブ開封後の RNAGEM や溶解後の DNase I は念のため小分けにして -20℃で保管してください。10x バッファーと 10x TE は 4℃で保管できます。

## ***RNAGEM* (*RNAGEM* について)**

---

*RNAGEM* は哺乳類の組織や細胞から全核酸を抽出し、そこから RNA を得ることに最適化されたキットです。この方法では細胞は溶解され、タンパク質と RNase は消化されます。抽出された RNA は RT-PCR や RT-qPCR に用いることが可能です。

- すべての操作は RNase-free の環境下か PCR フード内で行ってください
- RNase-free のチューブ類や試薬のみを使ってください

*RNAGEM* は EDTA 等のキレート剤に影響を受けます。もし細胞が EDTA を含む溶液に懸濁されている場合は 200g の遠心で細胞をペレットにしたのち上清を取り除き 1x **BLUE** Buffer で遠心洗浄してからお使いください。

## Handling different culture types (さまざまな培養細胞の取扱)

細胞数にあわせて下記のように抽出液量を調節可能です。10x BLUE Buffer は抽出液量の 1/10 容量となるよう添加してください。

抽出液量	細胞数	RNAGEM 液量
50-100 $\mu$ L	50,000-500,000	1 $\mu$ L
20-50 $\mu$ L	5,000-50,000	1 $\mu$ L
5-20 $\mu$ L	100-5,000	0.5 $\mu$ L
1-15 $\mu$ L	1-500	0.2 $\mu$ L

### <浮遊細胞>

1. 細胞懸濁液を 200g x 5 分遠心します。
2. 上清を完全に取り除きます。
3. 細胞ペレットを RNAGEM 抽出液ミクスチャー（次ページ参照）に懸濁します。

### <接着細胞>

1. フラスコ等に接着した細胞をトリプシンやセルスクレイパーで剥がし 200g x 5 分遠心します。
2. 上清を完全に取り除きます。
3. 細胞ペレットを RNAGEM 抽出液ミクスチャーに懸濁します。

### <RNAlater 中で保存された細胞>

1. 細胞懸濁液を 3,000g x 5 分遠心します。
2. 上清を完全に取り除きます。
3. 細胞ペレットを RNAGEM 抽出液ミクスチャーに懸濁します。

### <FACS または LCM>

RNAGEM 抽出液ミクスチャーに目的細胞集団をダイレクトに集めることが可能です。あるいは LCM のキャピラリーにダイレクトに RNAGEM 抽出液ミクスチャーを添加することが可能です。もし細胞が別のバッファー中に集められた場合は 1/10 容量の 10x バッファーを添加して 1x 終濃度のバッファーとします。

## Procedure (手順)

---

以下は抽出容量 50 $\mu$ L の系の例ですが、前ページの表のとおり必要に応じてスケールを変化させることが可能です。

1. PCR チューブ中で以下のサンプル・試薬を混合します。

細胞懸濁液または細胞ペレット

5 $\mu$ L 10x BLUE Buffer

1 $\mu$ L RNAGEM

50 $\mu$ L となるまで RNase-free 水で Fill up

2. サーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

75 $^{\circ}$ C 10 分 (細胞数が 50,000 以上の場合)

または 5 分 (細胞数が 50,000 未満の場合)

95 $^{\circ}$ C 2 分

4 $^{\circ}$ C HOLD

3. (必要であれば以下のとおり DNase 処理をします)

上記の溶液に以下の試薬を混合する

5 $\mu$ L 10x DNase Buffer

2 $\mu$ L DNase I

ボルテックスミキサーにかけサーマルサイクラーで以下のように熱処理を行います。

37 $^{\circ}$ C 5 分

75 $^{\circ}$ C 5 分

4 $^{\circ}$ C HOLD

これでサンプルは解析準備が整いました。抽出された RNA を保存する場合はキットに添付されている 10x TE を 1/10 容量添加して-20 $^{\circ}$ C 以下で保存します。

## Technical tips and sample management (技術資料ならびにサンプル管理)

---

- 手順、酵素組成、バッファーは分解されていない RNA を抽出するために注意深く最適化されています。キットに付属する酵素を書かれた以外の方法で使用したり、キットに付属するバッファー以外のものを使用するのはお勧めしません。
- RNAGEM で抽出した RNA は OD<sub>260</sub> 測定での定量には適しておりません。正確に定量するには RT-qPCR か PicoGreen, iQuant, Qubit 等の蛍光色素法をお勧めします。
- RNase-free の環境下で RNase-free のチューブや試薬を用い、サンプルを氷上で扱うことで RNA 抽出は最適な結果が得られます。
- 抽出された RNA を長期保存する場合は -80℃ で保存ください。
- あるいは、TE 中に溶解された RNA は NH<sub>4</sub>OAc とエタノールで沈殿させ、-20℃ 以下で保存します。