

1. スモールスケールでの mRNA の抽出
- Quick Prep Micro mRNA purification Kit: Amersham -

準備 : 0.5ml Elution buffer を 1.5ml チューブに分注し、65℃に加温

操作

- 1) 0.4ml Extraction Buffer をガラスホモゲナイザーに入れる
↓
- 2) 試料 (最大 0.1g) を入れ、ホモゲナイズ (tight で 20-30 回)
↓
- 3) 0.8ml Elution Buffer を加え、ホモゲナイズ
↓
- 4) ホモジネートを 1.5ml チューブに移す
↓
- 5) ホモジネートおよび 1ml oligo(dT) cellulose サスペンションを 15,000rpm, 1 分遠心
↓
- 6) oligo(dT) cellulose からバッファーを除去
ホモジネート上清を移し、攪拌
↓
- 7) 3 分間緩やかに攪拌
↓
- 8) 15,000 rpm、10 秒遠心、上清を除去
↓
- 9) 1ml High Salt buffer を添加、攪拌、10 秒遠心、上清を除去
↓
- 10) 洗浄をもう一度繰り返す
↓
- 11) 1ml Low Salt buffer を添加、攪拌、10 秒遠心、上清を除去
↓
- 12) 洗浄をもう一度繰り返す
↓
- 13) 0.3ml Low Salt buffer で oligo(dT) cellulose をサスペンド
Micro spin columnに移す
↓
- 14) 5 秒遠心、カラムを新しい 1.5ml チューブに移す
↓
- 15) 0.2ml Elution buffer (65℃) を添加し、即座に 5 秒遠心
濾液 (mRNA 溶液) をストック

2. Total RNA の抽出

- セパゾール RNA II Super : Nakalai -

試料の調製と保存 (サンプルが大量にあり、保存する必要がある場合)

組織を 1ml Buffer RLT (Qiagen: Cat. no. 79216) でホモゲナイズ
この状態で -80C で長期保存可能

抽出操作

- 1) 250ul サンプルを 1.5ml チューブに移し、750ul セパゾールを加え、ボルテックス
↓
- 2) 室温で 5 分放置
↓
- 3) 200ul クロロホルムを加え、転倒混和
↓
- 4) 室温で 10 分放置
↓
- 5) 4C, 15,000rpm, 10 分遠心
↓
- 6) 水層 (上層) を別の 1.5ml チューブに移す (中間層を吸わないように注意!)
↓
- 7) 500ul イソプロパノールを加え混和
↓
- 8) 室温で 10 分放置
↓
- 9) 4C, 15,000rpm, 10 分遠心
↓
- 10) 沈殿 (RNA) を乱さないようにして、溶液を除去
↓
- 11) 沈殿 (RNA) に 1ml 75%EtOH (DEPC DW) を加え、ボルテックス
↓
- 12) 4C, 15,000rpm, 5 分遠心
↓
- 13) 沈殿 (RNA) を乱さないようにして、溶液を除去、室温で 10 分風乾
(EtOH が蒸発する程度でよい/完全に DW まで乾燥させると溶けなくなるので注意!)

3. コンタミ genome DNA の消化 (RT-PCR 用のテンプレートの調製)

- 1) RNA/DNAase 溶液の調製 (RNA は DEPC DW で完全に溶かす)

Precipitated RNA	
DEPC DW	87ul
X10 DNase Buffer	10ul
RNase inhibitor	1ul
DNAase I	2ul
<hr/>	
Total	(100ul)

↓

- 2) 37C、30 分インキュベート

↓

- 3) 100ul Phe/Chl を加え、ボルテックス

↓

- 4) 4C, 15,000rpm, 10 分遠心

↓

- 5) 上層を別のチューブに移す
100ul クロロホルムを加え、ボルテックス

↓

- 6) 4C, 15,000rpm, 5 分遠心
上清を別のチューブに移す

↓

- 7) エタ沈
- | | |
|------------------|-------|
| 10mg/ml glycogen | 1ul |
| 3M NaOAc | 10ul |
| EtOH | 750ul |

↓

- 8) -20C で 30 分

↓

- 9) 4C, 15,000rpm, 15 分遠心、上清を除去

↓

- 10) 沈殿 (RNA) を 70% EtOH (DEPC DW) に懸濁
4C, 15,000rpm, 5 分遠心、上清を除去

↓

- 11) 沈殿 (RNA) を 26ul DEPC DW に溶かす

↓

- 12) 1ul を別のチューブに移し、99ul DEPC DW を加え、RNA 濃度を測定する

↓

- 13) 25ul RNA 溶液を再度エタ沈

↓

- 14) RNA 1ug/ul となるように沈殿 (RNA) に DEPC DW を加え、溶かす

4. RT-PCR 用 1st strand cDNA の合成

- 1) Total RNA 1ug/ul 溶液 1-10ul に、総量 37.5ul となるように DEPC DW を加える
1ul RNase inhibitor を加える

↓

- 2) 65 C, 10 分加温し、氷冷

↓

- 3)

10x 1st strand buffer	5 ul
dNTP mix	3 ul
random hexamer primer	2 ul
<u>Reverse transcriptase</u>	<u>1.5ul</u>
Total	(50 ul)

↓

- 4) 37C, 1h インキュベート

5. キットを使った 1st strand cDNA の合成
- First-Strand cDNA Synthesis Kit: Amersham -

準備

PCR に Not I-d(T)16 primer を使用する場合、DEPC DW で 1/25 希釈する

操作

- 1) エタ沈したサンプルの場合、DEPC DW (8ul or 20ul) で RNA を溶かす
(RNase free tube を使用)
Total RNA 1ug/ul 溶液の場合、1-5ul を使用し、DEPC DW で容量を調製
↓
- 2) 65 C, 10 分加温し、氷冷
↓
- 3) 1st strand cDNA reaction mixture をピペットで攪拌して均一にし、
5ul or 11ul を RNA 溶液に加える
↓
- 4) 1ul DTT を加える
↓
- 5) 1ul primer (random hexamer or 1/25 Not I-d(T)16 primer) を加える
↓
- 6) 37 C、1 時間インキュベート

混合比

1st-strand Mix	Primer	DTT	RNA	(Final volume, ul)
5	1	1	8	(15)
11	1	1	20	(33)

* RT-PCR の場合、random hexamer を primer に使用する方が良い