

マイクロアレイ実験に用いる RNA の調製法

我々は QIAGEN 社の RNeasy Plant Mini Kit を用いてトータル RNA の分離を行っている。

実験開始前の準備

- ・マイクロ遠心機を室温（20～25℃）に設定しておく。
- ・ Buffer RLC（or Buffer RLT）1 ml に対し β -ME 10ul を添加しておく。この溶液は 1 ヶ月間安定している。
- ・ Buffer RPE に 4 倍量の 100% EtOH を添加しておく。

注意事項

- ・ サンプル組織は一度凍結したら絶対に解凍しないようにする。
- ・ サンプル組織を破壊した後の全ステップは室温（20～25℃）で行う。
- ・ サンプル組織の二次代謝物質の量やタイプ（トウモロコシの乳白色の胚乳や糸状菌類の菌糸体など）には、Buffer RLC を使用するとよい。

(1) サンプルに液体窒素を加えてミルサー等を用いてきめの細かい粉末状にする。それに液体窒素少々を加えた物を適切なチューブに移し、液体窒素を蒸発させる。この際、粉碎が完全ではないと RNA の収量が減少する。

注) サンプルを解凍させないようにすること。

(2) Buffer RLC（or Buffer RLT）を(1) 100mg に対して 450ul 加える。強めにボルテックスしてしっかり混合する。ミルサーを使用した場合はカップの中に Buffer RLC（or Buffer RLT）を加え、薬さじなどでサンプルとしっかりと混合させてもよい。

(3) 2 ml コレクションチューブに QIAshredder スピンカラム（ライラック）をセットし、(2) を加えて 12,000～15,000rpm で 2 分間遠心する。コレクションチューブの底にたまった細胞破片ペレットを吸い取らないように注意しながらフロースルーフラクションを新しいチューブに移す。

(4) (3) に 0.5 倍量の 100% EtOH（通常 225ul）を加え、よく混ぜる。

(5) 2 ml コレクションチューブに RNeasy ミニスピカラム（ピンク）をセットし、(4) の液（形成された沈殿物も全て 約 675ul）を加える。

10,000rpm で 15 秒間遠心する。コレクションチューブ内のフロースルーを捨て、ミニスピncラムを再セットする。

- (6) Buffer RW1 700ul をミニスピncラムにアプライし、10,000rpm で 15 秒間遠心する。ミニスピncラムを新しい 2 ml コレクションチューブにセットする。
- (7) Buffer RPE 500ul をミニスピncラムにアプライし、10,000rpm で 15 秒間遠心する。コレクションチューブ内のフロースルーを捨て、ミニスピncラムを再セットする。
- (8) Buffer RPE 500ul をミニスピncラムにアプライし、12,000 ~ 15,000rpm で 2 分間遠心する。そのまま (9) に進んでもよいが、Buffer RPE のキャリーオーバーを完全に除去するならば (8 a) を行う。
- (8 a) 新しい 2 ml コレクションチューブにミニスピncラムをセットし、12,000 ~ 15,000rpm で 1 分間遠心する。
- (9) 新しい 1.5ml コレクションチューブにミニスピncラムをセットし、Rnase フリー水 50ul をメンブレンにしっかりと吸い込ませるように加える。10,000rpm で 1 分間遠心し、RNA を溶出する。これを 2 回行う。
- (10) 吸光度計を用いて OD 値を測定する。

2. mRNA の精製

我々は TaKaRa 社の OligotexTM-dT30<Super> mRNA Purification kit を用いてトータル RNA から mRNA を精製している。

実験開始前の準備

- ・マイクロ遠心機を室温 (20 ~ 25) に設定しておく。
- ・ヒートブロックをあらかじめ 70 に温めておく。
- ・ OligotexTM-dT30<Super>を 37 に温めておく。
- ・溶出用の RNase フリー水を 70 に温めておく。
- ・ 2 × Binding Buffer が析出している場合は 37 で完全に溶かしておく。

- (1) 以下の表を見て、当てはまる反応液を作成する。

| RNA 水溶液 | 2 × Binding Buffer | Oligotex TM -dT30<Super> | total 量 |
|--------------------|--------------------|-------------------------------------|---------|
| 150 ~ 250ug/ 150ul | 150ul | 15ul | 315ul |
| 100 ~ 150ug/ 100ul | 100ul | 10ul | 210ul |
| ~ 100ug/ 50ul | 50ul | 10ul | 110ul |

上記の total 量になるように RNase フリー水で液量を調整する。

- (2)(1) の反応液を穏やかによく混合し、70 °C で 3 分間加熱し RNA を変性させる。
- (3) 室温 (25 °C 前後) で 10 分間インキュベートし、15,000rpm で 5 分間遠心する。その後、ピペットでペレット (OligotexTM-dT30) を吸い込まないように注意しながら上清を取り除く。
- (4) Wash Buffer 350ul を加え、ペレット (OligotexTM-dT30) をよく懸濁する。その後スピncラム用遠心チューブにセットしたスピncラムに懸濁液を移し、15,000rpm で 30 秒間遠心する。新しいスピncラム用遠心チューブにスピncラムをセットする。
- (5) スピncラムのカップ内に Wash Buffer 350ul を加えてペレットをよく懸濁し、15,000rpm で 30 秒間遠心する。新しいスピncラム用遠心チューブにスピncラムをセットする。
- (6) スピncラムのカップ内に、あらかじめ 70 °C に温めておいた RNase フリー水 50ul を加えてペレットをよく懸濁し、15,000rpm で 30 秒間遠心して mRNA を溶出する。
- (7)(6) をもう一度行う。
- (8) 吸光度計を用いて OD 値を測定する。