

# HEK293培養細胞からのtotal RNA分離(6 cmあるいは10 cmディッシュ)

### プロトコル A

ディッシュ上溶解 (6 cm)

培養液を吸引でディッシュから取り除く

→ LRP (2-ME添加済み) \*1 を ディッシュに:350 µl

セルスクレーパーで、細胞溶解液を ホモジナイザーチューブに移す ジルコニアビーズ (5 mmø) を加える

ペレット化した細胞 (細胞数は6cm ディッシュ培養と同様)

チューブを軽く叩いて細胞ペレットをほぐす

■ LRP (2-ME 添加済み) \*1:350 µl ピペッティングでよく混ぜる

細胞溶解液全量を ホモジナイザーチューブに移す ジルコニアビーズ (5 mmø) を加える \*1 2- メルカプトエタノール(2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えて ください。 1mlの LRP 当たり 10 µlの

ホモジナイズ

■ トミー精工(株)MS-100 の場合:2,800 rpm×2 分

軽くスピンダウン

- SRP : 50 μl

ボルテックスでよく混ぜる:15秒 軽くスピンダウン

┻ > 99% エタノール:170 µl

ボルテックスでよく混ぜる:1分 軽くスピンダウン

ライセート完成

QuickGene のカートリッジへ全量添加

使用装置の分離プロトコル参照 QuickGene-Mini480\*2

Total RNA 回収(回収液量:50 μl)

\*2 本事例は旧機種で取得したデータ ・ 本事例は自機権と取得したチータ も含まれます。 その他QuickGeneシリーズでもこ のプロトコルをご参考頂けます。



### 結果

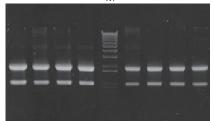
接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して、total RNA を分離した。

### 電気泳動図

非変性ゲル電気泳動(1% アガロース / 1 × TAE 緩衝液)

HEK293 (5 × 10<sup>6</sup> 個)

QuickGene スピンカラム法 (A 社)  $\underline{\text{DNase (+)}}$   $\underline{\text{DNase (-)}}$   $\underline{\text{DNase (+)}}$   $\underline{\text{DNase (+)}}$   $\underline{\text{DNase (-)}}$ 



 $M: \neg \neg \neg \neg$  (1Kb Plus DNA Ladder: Invitrogen)

### ■ Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

	細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	収量(μg)		
	和记休		QuickGene	スピンカラム法(A 社)	
	HEK293	5.0	79.1	57.5	

■ タンパク質の混入: A260/280

データなし

■ カオトロピック塩の混入: A260/230

データなし

その他

データなし

### | 共通プロトコルサンプル

細胞 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)



### プロトコル B

ディッシュ上溶解 (10 cm)

培養液を吸引でディッシュから取り除く

→ LRP (2-ME 添加済み) \*1 を ディッシュに:600µl

セルスクレーパーで、細胞溶解液を ホモジナイザーチューブへ移す ジルコニアビーズ (5 mmø) を加える

ペレット化した細胞 (細胞数は 10 cm ディッシュ培養と同様)

チューブを軽く叩いて細胞ペレットをほぐす

■ LRP (2-ME 添加済み) \*1:600 µI ピペッティングでよく混ぜる

細胞溶解液全量を ホモジナイザーチューブへ移す ジルコニアビーズ (5 mmø) を加える \*1 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用前毎に必ず LRP に加えて ください。 1 mlの LRP 当たり 10 μl の 2-ME を加える。



■ トミー精工(株)MS-100 の場合:4,300 rpm×1 分

軽くスピンダウン

- SRP : 100 µl

ボルテックスでよく混ぜる:15秒 軽くスピンダウン

→ > 99% エタノール: 300 µl

ボルテックスでよく混ぜる:1分 軽くスピンダウン



QuickGene のカートリッジへ全量添加 ライセートを二つのカートリッジに分注



使用装置の分離プロトコル参照 QuickGene-Mini480\*2



Total RNA 回収(回収液量:50 μl)

\*2 本事例は旧機種で取得したデータ ・ 本事的は自機権と取得したチータ も含まれます。 その他QuickGeneシリーズでもこ のプロトコルをご参考頂けます。





接着細胞を直接 10 cm ディシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

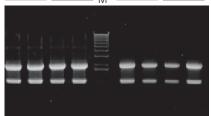
### 電気泳動図

非変性ゲル電気泳動(1% アガロース /1 × TAE 緩衝液)

HEK293 (10 cm ディッシュ)

QuickGene DNase (+) DNase (-) M DNase (+) DNase (-)

スピンカラム法 (A 社)



M:マーカー (1Kb Plus DNA Ladder: Invitrogen)

### Total RNA の収量

		収量 (μg)				
細胞株	細胞数	DNase (+)		DNase (-)		
THE STATE OF THE S	(× 10 <sup>6</sup> )	QuickGene	スピンカラム法 (A 社)	QuickGene	スピンカラム法 (A 社)	
HEK293	5.0-8.0	175.3	92.2	160.3	101.0	

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンブロッティングなどに必要な量の total RNA が得られた。

#### ■ タンパク質の混入: A260/280

細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	DNase (+)		DNase (-)	
יישויטנארי		QuickGene	スピンカラム法 (A 社)	QuickGene	スピンカラム法 (A 社)
HEK293	5.0-8.0	2.29	2.11	2.27	2.11

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

#### ■ カオトロピック塩の混入: A260/230

	細胞数	A260/230				
細胞株		DNase (+)		DNase (-)		
	(× 10 <sup>6</sup> )	QuickGene	スピンカラム法 ( <b>A</b> 社)	QuickGene	スピンカラム法 ( <b>A</b> 社)	
HEK293	5.0-8.0	2.12	2.16	2.11	2.18	

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

### その他

データなし

### ▋共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)



## 【プロトコル B'

#### ディッシュ上で溶解(8×10<sup>6</sup> 個以上の細胞がある 10 cm ディッシュ)

培養液を吸引でディッシュから取り除く

← LRP (2-ME 添加済み) \*1 をディッシュに:800 µl

セルスクレーパーで、細胞溶解液をホモジナイズ用チューブに移す ジルコニアビーズ(5 mmø)を加える



軽くスピンダウン

♣ SRP : 100 μl

ボルテックスでよく混ぜる:15秒 軽くスピンダウン

→ > 99% エタノール: 300 µl

ボルテックスでよく混ぜる:1分 軽くスピンダウン



QuickGene のカートリッジヘライセート全量を移す ライセートを二つのカートリッジに分注



Total RNA 回収(回収液量:50 μl)

\*2 本事例は旧機種で取得したデータ も含まれます。 その他QuickGeneシリーズでもこ のプロトコルをご参考頂けます。



### 結果

QuickGene システム(QuickGene および QuickGene RNA cultured cell HC kit S) およびスピンカラム法(A社)を用いて、 培養細胞 HEK293 から total RNA を分離した。

#### 電気泳動図

データなし

### Total RNA の収量

		収量(µg)				
細胞株	細胞数	DI	Nase (+)	DNase (-)		
	(× 10 <sup>6</sup> )	QuickGene	スピンカラム法 (A 社)	()   Ck(=ana	スピンカラム法 (A company)	
HEK293	12.0	149.5	133.1	94.9	102.3	

QuickGene システムを用いて、マイクロアレイ、ノーザンブロッティングなどに必要な量の total RNA が得られた。

### ■ タンパク質の混入: A260/280

		A260/280				
細胞株	細胞数	DNase (+)		DNase (-)		
лшисих	(× 10 <sup>6</sup> )	QuickGene	スピンカラム法 (A 社)	QuickGene	スピンカラム法 (A社)	
HEK293	12.0	1.95	2.04	1.98	2.02	

QuickGene システムを用いることで、タンパク質の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

#### ■ カオトロピック塩の混入: A260/230

		A260/230			
細胞株	細胞数 (× 10 <sup>6</sup> )	DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピンカラム法 (A 社)	QuickGene	スピンカラム法 ( <b>A</b> 社)
HEK293	12.0	2.14	2.14	1.88	2.17

QuickGene システムを用いることで、カオトロピック塩の混入の少ない高純度の total RNA 分離ができた。

### その他

#### • RT-PCR (DNase 処理あり)

QuickGene システムおよびスピンカラム法(A 社)を用いて分離した total RNA(10 pg/ $\mu$ l あるいは 1pg/ $\mu$ l)中の $\beta$  -actin mRNA をテンプレートとして RT-PCR を行った。

HEK293 (12×10<sup>6</sup>個の細胞)



 $M: \neg - \neg -$  (100bp DNA Ladder: Invitrogen)

1 : QuickGene

2:スピンカラム法 (A社)

Total RNA(1pg/ $\mu$ I)で行った RT-PCR に対して、増幅産物に似た電気泳動バンドが両方のキットで検出された。

## ▋共通プロトコルサンプル

培養 HeLa 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 COS-7 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)、培養 NIH/3T3 細胞 (6 cm あるいは 10 cm ディッシュ)

