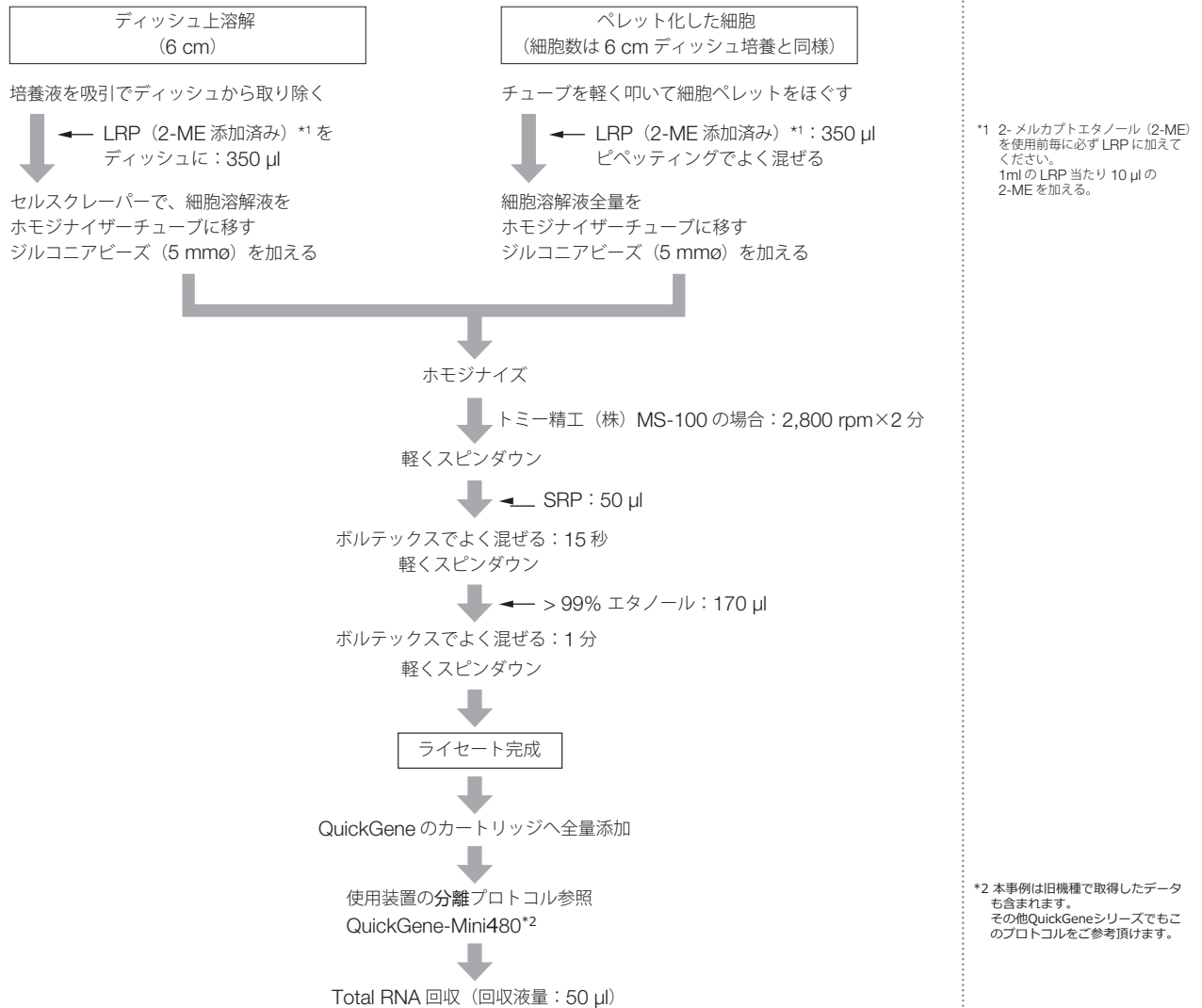


HEK293培養細胞からのtotal RNA分離(6 cmあるいは10 cmディッシュ)

| プロトコル A



結果

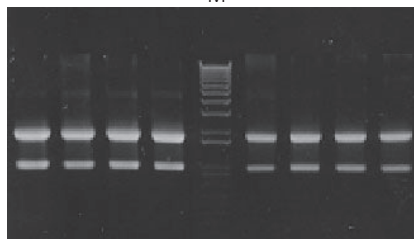
接着細胞を直接 6 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して、total RNA を分離した。

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 × 10⁶ 個)

QuickGene スピнкаラム法 (A 社)
 DNase (+) DNase (-) M DNase (+) DNase (-)



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

Total RNA の収量 (DNase 処理あり)

細胞株	細胞数 (× 10 ⁶)	収量 (μg)	
		QuickGene	スピнка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

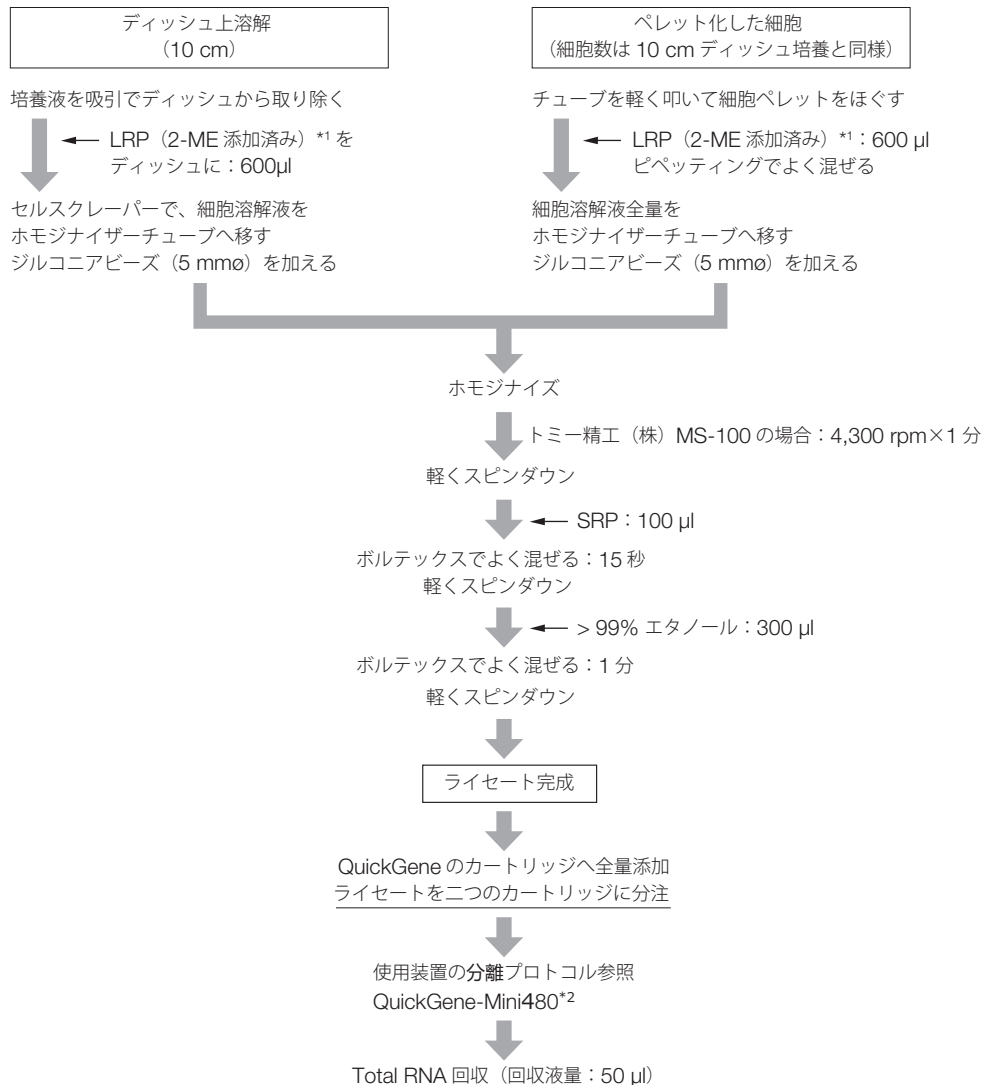
その他

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



*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。

*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

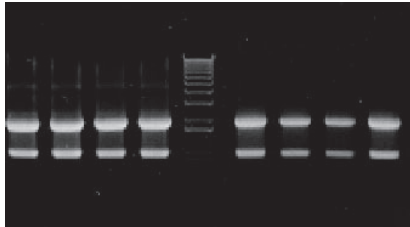
接着細胞を直接 10 cm ディッシュで溶解するか、あるいはペレット化した浮遊細胞を溶解して total RNA を分離した。

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 (10 cm ディッシュ)

QuickGene スピнкаラム法 (A社)
DNase (+) DNase (-) M DNase (+) DNase (-)



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

Total RNA の収量

細胞株	細胞数 (× 10 ⁶)	収量 (μg)			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A社)	QuickGene	スピнка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、ノーザンブロット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 ⁶)	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A社)	QuickGene	スピнка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

細胞株	細胞数 (× 10 ⁶)	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A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 (8×10⁶ 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 mmφ) を加える



ホモジナイズ



トミー精工 (株) MS-100 の場合：4,300 rpm×1 分

軽くスピンドウン



← SRP：100 μl

ボルテックスでよく混ぜる：15 秒
軽くスピンドウン



← > 99% エタノール：300 μl

ボルテックスでよく混ぜる：1 分
軽くスピンドウン



ライセート完成



QuickGene のカートリッジへライセート全量に移す
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)

*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 2-ME を加える。

*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нка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

細胞株	細胞数 ($\times 10^6$)	収量 (μg)			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнка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、ノーザンブロット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 ($\times 10^6$)	A260/280			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнка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

細胞株	細胞数 ($\times 10^6$)	A260/230			
		DNase (+)		DNase (-)	
		QuickGene	スピнкаラム法 (A 社)	QuickGene	スピнкаラム法 (A 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。

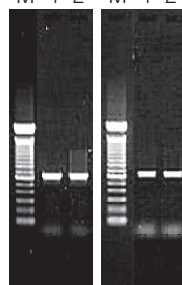
その他

• RT-PCR (DNase 処理あり)

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

HEK293 (12 $\times 10^6$ 個の細胞)

10pg/ μl 1pg/ μl
M 1 2 M 1 2



M：マーカー (100bp DNA Ladder : Invitrogen)

1：QuickGene

2：スピнкаラム法 (A 社)

Total RNA (1pg/ μl) 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)