

Carl Zeiss MicroImaging

**PALM Protocols - RNA handling**





**We make it visible.**

レーザーマイクロダイセクションおよびプレッシャー  
カタパルティング (LMPC)  
RNA プロトコール

カールツァイスマイクロイメージング株式会社

## 内容

- 5 イントロダクション- RNAの概要
- 6 RNAを扱う上での注意点
- 7 スライド調製
  - 7 メンブレンスライド上のサンプル
  - 9 スライドガラス上のサンプル
- 9 RNase除去法
- 9 UV処理
- 9 ポリ-L-リシン処理
- 10 切片のスライド固定
  - 10 凍結切片
  - 10 パラフィン包埋切片(FFPE)
  - 11 サイトスピン
  - 11 血液と塗抹標本
- 12 染色法
  - 12 凍結切片
  - 12 クレシルバイオレット染色
  - 12 ヘマトキリン/エオシン(HE)染色
  - 13 パラフィン・包埋切片(FFPE)
- 14 レーザーマイクロダイセクションおよびプレッシャーカタパルティング (LMPC)
- 14 形態学情報を改善するための道具
  - 14 ディフューザー CM (#1210-0320)
  - 15 接着キャップ(#1440-0240; #1440-0250)
  - 15 リキッドカバーガラス N (#1440-0600)
- 16 保存
- 16 回収デバイス
  - 16 接着キャップ (#1440-0240; #1440-0250, #1440-0245;#1440-0255)
  - 16 他のマイクロチューブ
- 17 回収法
  - 17 “乾燥”回収 (接着キャップ)
  - 18 “液体”回収 (他のマイクロチューブ)
  - 18 回収確認 -キャップに飛ばしたサンプルを確認する
- 18 回収後のアプリケーション
  - 18 凍結切片からのRNA回収
  - 19 FFPE切片からのRNA回収
  - 19 QIAGEN RNeasy FFPE Kitを使用した回収法
  - 21 他の抽出法
  - 22 回収RNAの品質チェック
- 23 RNAの一般的な性質 (分布, 構造, RNase活性)
- 25 RNA取り扱いの流れ
- 25 他のプロトコール

## イントロダクション

### RNAの概要

RNAは多くの機能を持った生体高分子です。DNAから転写されたメッセンジャーRNA(mRNA)は、タンパク質合成のテンプレートとして働きます。この蛋白質合成はリボソームによって行われます(リボソームはリボソーマルRNA(rRNA)とタンパク質から構成されています)。蛋白質合成に必要なアミノ酸はトランスファーRNA(tRNA)分子上のリボソームに運ばれます。また、RNAはリボ蛋白質とリボザイムの一部です。

RNAの分析結果は生物の遺伝子発現プロファイリングの結果を良く反映します。マイクロダイセクションで分離したサンプルの遺伝子発現プロファイルは、マイクロスケールにおける分子挙動を分析するための重要なツールであり、研究および臨床で使用されています。

したがって、質の高いRNAを得ることは後の解析を行う上で重要であり、実験全体の成功の鍵をにぎっています。

## RNAを扱う上での注意点

実験失敗の第一の要因はRNA分解です。RNAはさまざまな内因性・外因性のRNaseにより消化され易い傾向にあります。RNaseは人肌および接触するほとんどすべての物に存在していて、失活させるのは難しいです。微量でもあればRNAをすぐ分解してしまいます。予め注意をすることにより、RNAの分解即ち実験の失敗を防ぐことができます。

### 注意点

- ・ RNAを扱う専用のスペースを準備する。
- ・ RNaseZap(アンピオン社、cat.No.9780)といったRNA専用クリーニング溶液で実験台をきれいにする。
- ・ ラボグローブを着用し、頻繁に交換する。
- ・ 滅菌かつディスポのプラスチック器具を使用する。
- ・ ガラス機器は使用前にジエチルピロカーボネート(DEPC)処理し、180°Cで4時間以上乾熱滅菌を行う。
- ・ フィルター付きチップを使用する。
- ・ 溶媒・水は0.1%DEPC水で調製する。
- ・ RNase-freeの試薬、チューブおよびチップを使用する。
- ・ 最善の結果を得るために、新鮮なサンプルか、ドライアイスまたは液体窒素で瞬間的に凍結した切片を準備する。全ての操作は氷上で行う。
- ・ エタノールまたはRNA溶出液で回収したRNAは-80°Cで保存する。
- ・ 切片溶解中に凝縮するのを防ぐために、スライドガラスは-80°Cで保存し、50mlのファルコンチューブの様なしっかり密封された容器で再溶解する。
- ・ 一般的な染色作業において、氷上でのインキュベーション時間は極力短くする。

### 禁止事項

- ・ サンプルに唾が飛ばないようにマスクをする。
- ・ 素手で触らない。
- ・ RNaseがコンタミするので、チップはオートクレーブしない。
- ・ 凍結した組織を溶解しない。
- ・ 溶液中に残ったDEPCは後の操作の妨害となるので、RNAをDEPC水で再溶解しない。

## スライド調製

### メンブレンスライド上のサンプル



メンブレンスライド 1.0(1mm 厚)⇒1  
メンブレンスライド 0.17(0.17mm 厚)⇒ドット  
フレームスライドおよびダブルメンブレンペトリディッシュ  
⇒ドットと0の間

メンブレンスライドは、一方の面がメンブレンで覆われた特別なスライドです。このメンブレンは、サンプルと共にレーザーで容易に切ることができ、サンプルを飛ばす時の台として機能します。したがって、サンプルを壊すことなく、広い領域もレーザーを当てることで飛ばすことができます。単細胞、細胞小器官、リビングセルや染色体等を分離するのに、メンブレンスライドは特に重要です。

カールツァイスではポリエチレンナフタレン(PEN)メンブレンで覆われた厚さ1mmおよび0.17mmの2種類のメンブレンスライドを提供しています。このメンブレンスライドはUVを非常に良く吸収する特性を持っています。これにより、レーザーによる切断が容易になります。すべてのアプリケーションで使用することが可能です。

5倍、10倍または20倍の低倍率の対物レンズを使用する時は、厚さ1mmおよび0.17mmのスライドガラスを使用することができます。40倍か63倍のような高倍率にも対応するために、ツァイスではLong distance用の対物レンズをお薦めしています。対物レンズの修正リングを動かすことによって、異なった厚さのカバーガラスに対応させることが可能です。100倍の対物レンズは動作距離が短いため、厚さ0.17mmのスライドガラスのみ使用することができます。

※0.17mm厚のメンブレンスライドは熱に耐性がありません。他の滅菌法でRNase除去を行ってください。

メンブレンスライド NF(ヌクレアーゼ・フリー)はDNase、RNaseおよびヒトのDNAフリーであることを保証しています。PEN-メンブレンスライドに加えて、染色体分離の様な特殊処理用のPETメンブレンスライドも準備しています。



- MembraneSlide 1.0 PEN* - Order No. 415101-4401-000 (white)
- MembraneSlide 1.0 PEN NF* - Order No. 415101-4401-600 (white)
- MembraneSlide 0.17 PEN* - Order No. 415101-4401-500 (uncolored)
- MembraneSlide 50x1.0 PEN* - Order No. 415101-4401-005 (doublewidth)
- MembraneSlide 1.0 PET* - Order No. 415101-4401-050 (blue)
- FrameSlide PET* - Order No. 415101-4401-055 (metal)



## スライド調製

### メンブレンスライド上のサンプル

大部分のサンプルはスライドガラスからレーザーで切り出して回収することができます。カバーガラスを外し、固定溶媒を除去した後の病理切片でも回収することができます。ある脳の組織切片や血管といった膜に吸着し難いものをスライドに固定させるには、回収し易くする処理をするか、“凍結かつ電荷を帯びたスライド”を使用する必要があります。

### RNase除去法

メンブレンスライドの出荷時は、滅菌処理を行っていませんので、以下の点を御注意ください。

- ・ メンブレンスライドをRNaseフリーにするために、180°Cで4時間以上乾熱滅菌を行ってください。
- ・ 上記のRNase不活化処理ができない時は、RNaseZap(アンビオン社、Cat.No.9780)を使用します。始めにメンブレンスライドをRNaseZapに数秒間浸します。次にRNaseZapを除去するためにDEPC水、続いて蒸留水で洗い、37°Cで30分から2時間乾燥させてください。
- ・ メンブレンスライド NF(ヌクレアーゼ・フリー)はDNase、RNaseおよびヒトのDNAフリーであることを保証しています。このスライドを使用すればヌクレアーゼ除去処理は必要ありません。

### UV処理

波長254nmのUVを30分間照射することでメンブレンの疎水性を上げることができます。それにより、脳細胞の様な組織切片(パラフィンや凍結切片)は、膜に付着し易くなります。また、UV照射により核酸等のコンタミを減少させることができます。

### ポリ-L-リシン処理

ポリ-L-リシン(0.1% w/v)処理は脳組織切片の様なメンブレンに付着しにくいサンプルを扱う時に行います。また、ポリ-L-リシン(0.1% w/v)処理はUV処理の後に行います。ポリ-L-リシン溶液を膜上に一滴垂らし、2,3分間室温で乾燥させます。膜とスライドガラスの間に溶液が漏洩しない様にご注意ください。

## 切片のスライド固定

### 凍結切片

#### 切片化

切片は通常ルーチンで行っているのと同じ様にメンブレンスライドに貼り付けることができます。後に切り出して回収するために、通常使用される包埋剤は使用すべきではありません。OTCコンパウンドの様な凍結組織包埋剤は使用することはできますが、使用量を最小限に抑え、サンプルをレーザーで切り出す前に取り除きます。あらかじめ冷しておいたメンブレンスライド上の切片からRNAを効率よく回収するには、ラボグローブをはめて指でスライドを短い時間温め、ルーチンで行う場所で行う様に切片を移します。クリオスタット中で2~3分スライドを置いておきます。

#### 固定

切片を固定した後で、サンプルを固定する方法はいくつかあります。ツァイスでは氷冷した70%エタノールで2、3分間脱水することをお薦めしています。

#### 凍結溶媒の除去

OTCまたは他の凍結組織包埋剤を使用している場合、それがレーザー効率に影響を与える可能性があるため、レーザーマイクロダイセクションをする前に除去する必要があります。包埋剤はRNase-free水に、5、6回浸すことで、取り除くことができます。もし、切片を染色されることを考えられている場合は、染色操作時に自動的に除去されます。

### パラフィン包埋切片(FFPE)

メンブレンスライドへの切片固定は、ルーチンでスライドガラス上に固定されている様に行うことができます。ホットプレートのテクニックと同様に温水上で切片を浮かべる方法で行います。固定した後は、スライドを56°Cで一晩乾燥させます。カバーガラスと通常使用される包埋剤は切り出して飛ばすことはできませんので、御注意ください。

#### 脱パラフィン化

パラフィンはレーザーの効率を減少させ、時に切り出して飛ばす際の妨げになります。故に、サンプルを切り出して回収する際にパラフィンを取り除いておくことはとても重要です。通常、標準的な染色法を採用されている場合は、脱パラフィン化がルーチンに含まれています。

## 手順

1. キシレンに3～10分間2回浸す。
2. 100%エタノールに1分間浸す。
3. 96%エタノールに1分間浸す。
4. 70%エタノールに1分間浸す。

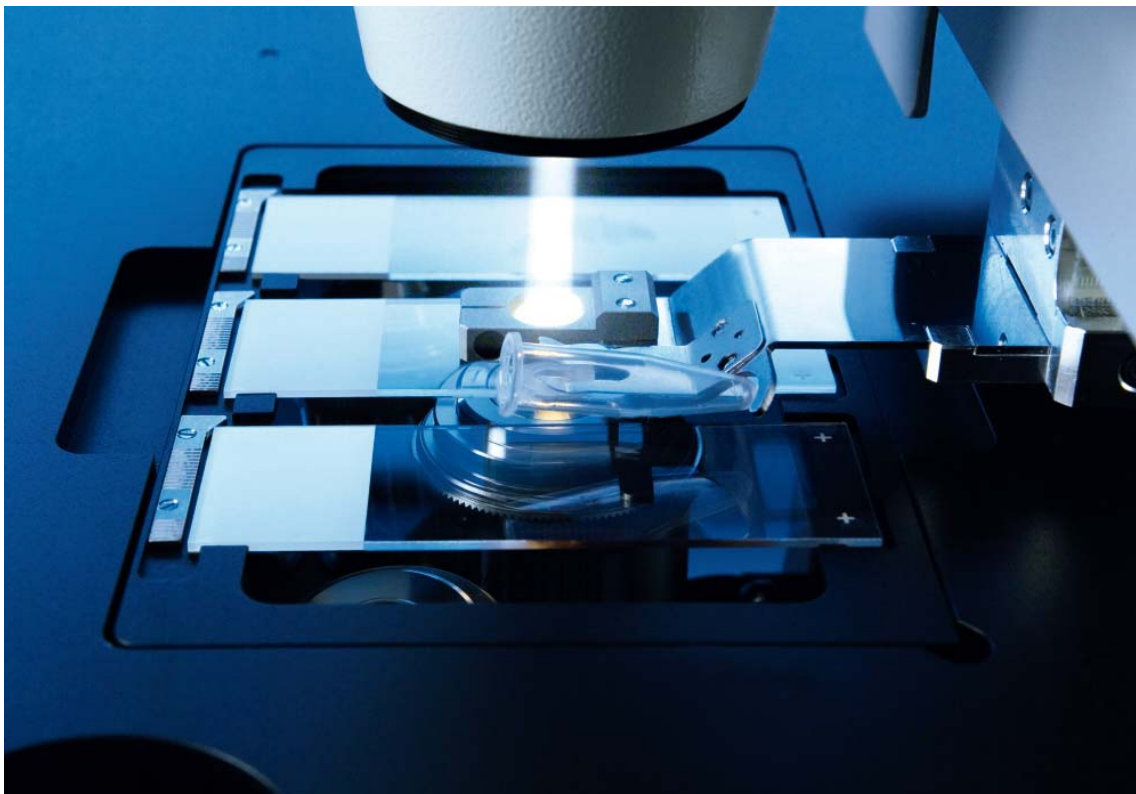
※厚さ0.17 mmのメンブレンスライドは有機溶媒に耐性がないので御注意ください。また、上述した様な最小限の除去法を採用ください。

## サイトスピン

サイトスピンはスライドガラスまたはメンブレンスライド上で作製することができます。細胞を遠心操作で回収した後に室温乾燥させます。次に100%エタノールで5分間浸して固定します。染色前に室温でサイトスピンを乾性させてください。

## 血液と塗抹標本

血液かスマア状のサンプルはスライドガラス上に塗抹してください。固定および洗浄操作中に膜を破らない様に御注意ください。膜を破いてしまうと、サンプルを飛ばして回収しにくくなってしまいます。スライドガラスを短時間室温乾燥し、70%エタノールで2分間(最大5分間)固定を行います。



## 染色法

高純度のRNAを抽出するために染色直前に染色液を調製し、また、RNAを扱う時にチップの取り扱いに御注意ください。

## 凍結切片

RNAを扱う時は、HE、メチルグリーン、クレシルバイオレット、ヌクレアファストレッドのような標準的な組織染色を行うことができます。

※凍結切片を扱う時は、短時間固定を行う間に、内因性のRNaseが活性化するかもしれません。全ての操作を短時間で行うことをお勧めします。使用する全ての試薬は氷上に置きます。一般的によく使用される染色法は、クレシルバイオレットとヘマトキシリン/エオシン染色です。

## クレシルバイオレット染色

この単染色は核をオレンジ色に、細胞質を薄いオレンジ色に染めます。

手順:

1. サンプルを固定した後にスライドを1%酢酸クレシルバイオレット溶液中に60秒間浸します。
2. スライド表面上の余分な染色液を取り除きます。
3. スライドガラスを70%エタノールに浸します。
4. 100%エタノールにスライドガラスを浸します。
5. 1~2分間室温で乾燥します。

※固体の酢酸クレシルバイオレット(例:シグマアルドリッチ社、Cat.No.86,098-0)を1% (w/v) になる様に100%エタノールを加えます。その後、室温で一晩、スターラーで溶解させます。いくらか不溶性の粉末が残りますが問題ありません。使用前にフィルターにお通しください。

## ヘマトキリン/エオシン(HE)染色

HE染色は通常の病理検査室のルーチンで使用されており、RNAの実験の妨げになりません。核は青に染まり、細胞質は赤/ピンク色に染まります。

## 手順

1. 固定後に、すばやくスライドで5～6回、RNase-free水に浸します。
2. 1分間メイヤーズヘマトキシリン溶液(例:シグマ社、cat.No.MHS-32)
3. DEP処理水または洗浄溶液に1分間浸します。
4. エオシンY溶液(例:シグマ社、cat.No.ZHT110-2-32)で10秒間染色します。
5. 濃度を上げたエタノール(70%、96%、100%)に浸します。
6. 短時間室温乾燥します。

## パラフィン包埋切片(FFPE)

脱パラフィン化した後の染色法はいくつかあります。通常はFFPEと凍結切片法の2つの方法があります(上述を参照ください)。

## 保存

染色したスライドはすぐにも使用できますし、サンプルを切り出して回収するまで-80℃で保存することもできます。スライドガラスは、溶ける際の余分な水分凝縮を避けるために、50mlのファルコンチューブの様な密封された容器中で凍結し、再融解します。

## レーザーマイクロダイセクションおよびプレッシャーカタパルティング

### (LMPC)手順

詳細はMicroBeamユーザーマニュアルを御参照ください。

### 形態学情報を改善するためのツール

サンプルを切り出して回収する際は、切片を包埋してカバーガラスを乗せる必要はありません。切片または組織表面をカバーしないので、組織が壊れている様に見えることがあります。

### ディフューザー CM

ディフューザー CM は、全てのキャップムーバーのホルダーに付いています。その不透明なガラスは顕微鏡の余計な光を拡散することでコントラストを良くし、核や細胞の境界をより明確にします。ちょっとした色の違いも見える様になります。詳細はディフューザーマニュアルを御参照ください。



PALM CombiSystem



ディフューザーCM  
(注文 No.415101-2100-320)

## 接着キャップ

不透明な接着キャップは、色のバランスとコントラストを改善することで、サンプルの形態をより明確に見ることができます。不透明な接着キャップは200  $\mu$ l用と500  $\mu$ l用の2種類あります。詳細は接着キャップ商品情報を御参照ください。



接着キャップ 500不透明-500  $\mu$ l

(注文No.415101-4400-250)

接着キャップ 200不透明-200  $\mu$ l

(注文No.415101-4400-0240)

## リキッドカバーグラス N (#1440-0600)

ポリマーで粘性のあるリキッドカバーグラスNは、スライドガラス上にセットした組織の表面を滑らかにし、形態を見易くします。カバーグラスの様に表面を覆い、組織を見易くするだけでなく、水やRNase等からも切片を守ることができます。



リキッドカバーグラス

(注文No.415101-4400-600)

## 保存

## 回収デバイス

### 接着キャップ

接着キャップを使用することで、サンプルを切り出して飛ばす際に、回収するチューブに液体を充たすことなくサンプルを回収することができます。これにより、RNase による分解を最小限に抑えることができます。簡単にサンプルを回収できることに加え、回収したサンプルがどこかに行ったり、結晶を形成してしまうのを防ぐことができます。また、キャップにシリコンゴムを充たしていることで、スライドガラスと回収するキャップの距離が短くなるので、より低いレーザーエネルギーでサンプルを回収することができます。詳細は接着キャップ商品情報を御参照ください。

※ 接着キャップは全てのRNA回収操作にお奨めしています



接着キャップ 500不透明-500  $\mu$ l

(注文No.415101-4400-250)

接着キャップ 200不透明-200  $\mu$ l

(注文No.415101-4400-0240)

接着キャップ 500 -500  $\mu$ l

(注文No.415101-4400-255)

接着キャップ 200 透明-250  $\mu$ l

(注文No.415101-4400-0245)

### 他のマイクロチューブ

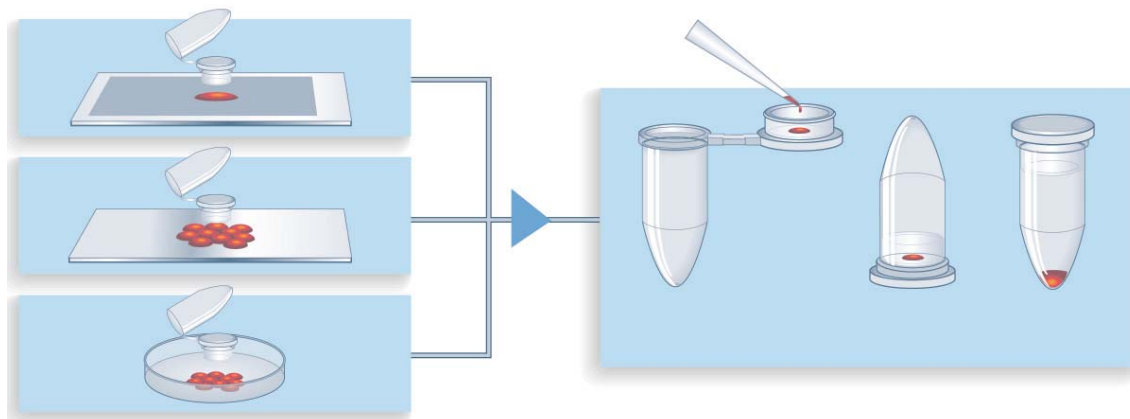
弊社で販売しているチューブを使用されない場合は、市販のRNase-freeチューブでも使用することができます。もしRNase-freeではないチューブをRNase除去されたい場合は、以下の操作を行って下さい。



## RNase除去法

1. 100ml の蒸留水に 0.1ml の DEPC を加えて、0.1%DEPC 溶液を調製しておきます。
2. DEPC を溶解するために、室温で 5~6 時間、スターラーで溶解します。
3. チューブを DEPC 溶液に完全に浸し、室温で一晩置きます。
4. チューブを入れた溶液ごとに 121°C で 20 分間オートクレーブし、DEPC を分解します。
5. 溶液を注意深くかつ完全に捨てます。チューブを 50°C~80°C で乾燥させます。
6. 乾燥したら使用可能です。

※DEPCは大変毒性が高いので、ドラフト内で操作を行ってください。



## 回収法

PALM MicroBeamユーザーマニュアルを御参照ください。

### “乾燥” 回収（接着キャップ）

接着キャップは RNA 回収操作にお奨めしています。キャップに液体を満たさないことで、RNase の活性を最小限に抑えることができます。サンプルを回収した後は各試薬メーカーが出している Lysis buffer を使って、室温で 30 分間穏やかに混合して遠心することで回収します。

## “液体”回収（他のマイクロチューブ）

20  $\mu$ l の Lysis buffer をキャップに満たします。マイクロダイセクションで回収した細胞または組織はキャップの内側でトラップしており、その後は蓋から落下しません。キャップの溶液が乾かない様に御注意ください。メンブレンスライドを使用していない通常のスライドガラスに直接サンプルを固定された場合は、サンプルを飛ばした時により細かい断片になり、キャップの中心でサンプルをトラップしづらくなるので、より多くのボリューム（最大 40  $\mu$ l）の溶液をキャップに満たすことをお勧めします。

## 回収確認 -キャップに飛ばしたサンプルを確認する

回収したことを確認するために、キャップを直接5、10、40、63倍の対物レンズで確認します。パソコン表示画面上で”go to check point”ボタンを押すとキャップが対物レンズ上に移動し、キャップ上にトラップしたサンプルを見ることができます。

## 回収後のアプリケーション

### 凍結切片からのRNA回収

凍結切片からマイクロダイセクションでサンプルを回収する際は、接着チューブの使用をお勧めします。RNeasy Micro Kit（キアゲン社、Cat.No.74004）を使用することで、より高純度のRNAを得ることができます（詳細はQIAGEN社のプロトコールを御参照ください）。

最終的に抽出したRNA溶液（12  $\mu$ l）は、逆転写反応のために-20°Cで保存することができます。

Agilent Bioanalyzer（RNA 6000 Pico LabChip Kit）で直接純度を分析するには 50pg/ $\mu$ l 以上の濃度で、また、5~10  $\mu$ l 厚の凍結切片で 2mm<sup>2</sup>の位の広領域のサンプルが必要です。

弊社では、通常 5~10  $\mu$ l のRNA抽出液をRT-PCR反応液 20  $\mu$ l のテンプレートとして使用することを推奨しています（例：ロッシュ社、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit、Cat.No.04 379 012 001）。

### 手順:

1. サンプルを回収したチューブに $\beta$ -メルカプトエタノールを含む Buffer RLT を 350  $\mu$ l 加えます。ボルテックスし、チューブをひっくり返した状態で 30 分間静置します。完全に溶解することで、RNA 収量を高くすることができます。

※ $\beta$ -メルカプトエタノール( $\beta$ -ME)は使用直前に添加してください。1ml の buffer RLT に対して 10  $\mu$ l の  $\beta$ -ME を加えます。安全キャビネット内で保護服を着て調製してください。 $\beta$ -ME を加えた buffer RLT は室温で 1 ヶ月安定です。

2. 13,400 rcf で 5 分間遠心します (Eppendorf 5415D で 12,000rpm)。

※サンプルはこの時点で、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存することができます。

3. 1.5 ml チューブに溶解液を移します。
4. QIAGEN 社のプロトコール step4 (RNeasy Micro Handbook 06/2007)「Total RNA Isolation from Microdissected Cryosections」に進みます。
5. 懸濁液に 70%エタノールを 350  $\mu$ l 加え、ピペティングで混ぜます。遠心しない様御注意ください。すぐに step6 に進みます。

※6~14 の全てのステップはQIAGEN社のプロトコールに従ってください。また、「Things to do before starting」のコメントを御参照ください。

## FFPE切片からのRNA回収

サンプルをマイクロダイセクションで回収する際は、接着キャップの使用をお勧めします。

弊社では QIAGEN 社の RNeasy FFPE Kit (cat.No.74404) のプロトコールを改良したものをお勧めしております。

このプロトコールは少ない溶出量で高純度の RNA を回収することができるので、とても効果的です。ゲノム DNA のコンタミネーションは特別な DNA 除去カラム (gDNA Eliminator spin column) を使うことで、最小限に抑えることができます (20 ページを御参照ください)。

通常の手法で染色した組織切片はマイクロダイセクションにのみ使用されるので、脱パラフィン化と染色はスライドの標準プロトコールにしたがって行います。

様々なサンプルからレーザーマイクロダイセクションで回収した結果、高いRNA回収量を得るには、より長い時間処理することが明らかとなりました。そのため、PALM におけるプロテアーゼ K 処理時間は、QIAGEN 社の RNeasy FFPE Kit のプロトコールと比べて、長時間インキュベーションしています。

※FFPE 切片から回収する場合はプロテアーゼK 処理が特に重要です。プロテアーゼK 処理後に不活化処理(90°Cで10分間)を行ってください。プロテアーゼK による最適なインキュベーション時間は、細胞の種類、固定方法や回収したサンプルの大きさ等の多くの要素によって決まります。一晩インキュベーションするのは、安全な方法と言えますが、より短い時間も検討する必要があります。弊社の経験では、どの様な抽出方法や試薬を使ったとしても、少なくとも3時間インキュベーションする必要があることが明らかになっています。RNA抽出液は-20°Cで保存するか、すぐに逆転写反応を行います。Agilent Bioanalyzer(RNA 6000 Pico LabChip Kit)で直接質を分析するには、5~10  $\mu$ l 厚の切片で4mm<sup>2</sup>の様な広領域のサンプルを回収する必要があります。

弊社では通常、逆転写反応でランダムオリゴマーを使って、反応液 20  $\mu$ l あたり、5~10  $\mu$ l RNA抽出液を cDNA 合成に使用します(ROCHE社製、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, lot No. 04 379 012 001)。

※ランダムプライマーか、遺伝子特異的なプライマーのどちらかを使用することは、とても重要な問題です。ホルマリン固定-パラフィン包埋法で多くのRNA鎖が壊れ、修飾されているために、固定したRNAのoligoT-primerは少なくなっている可能性があります。

#### 手順:

1. サンプルを回収した接着チューブに Buffer PKD とプロテアーゼ K を 10  $\mu$ l 加えます。チューブをひっくり返した状態でボルテックスして 30 分間静置します。
2. チューブをひっくり返した状態で、55°Cで一晩(少なくとも 3 時間以上)インキュベートします。Heat block を使用して 80°Cで 15 分間加熱します。
3. 結合条件を調節するために Buffer RBC を 320  $\mu$ l 加えます。
4. 溶解液をよく懸濁し、2ml collection tube にセットした gDNA Eliminator spin column に加えます。8,000g で 30 秒以上遠心を行います(例:エッペンドルフ 5415D で 1,000 rpm 以上)。
5. 溶出液に 100% エタノールを 720  $\mu$ l 加え、ピペティングで完全に混ぜます。遠心しない様御注意ください。すぐに次のステップに進みます。
6. サンプル 700  $\mu$ l を 2ml collection tube にセットした RNeasy MiniElute spin column に加えます。静かに蓋を閉め、8,000g(10,000rpm)以上で 15 秒以上遠心を行います。溶出液を捨てます。collection tube はステップ 7 で再利用します。
7. サンプルが完全に無くなるまで、ステップ 6 を繰り返します。collection tube はステップ 8 で再

8. Buffer RPE 500  $\mu$ l を RNeasy MiniElute spin column に加えます。静かに蓋を閉め、カラムを洗うために 8,000g (10,000rpm) 以上で 15 秒以上遠心を行います。溶出液を捨てます。collection tube はステップ 9 で再利用します。

※Buffer RPEは濃縮した状態で供給しています。使用前にエタノールを加えてください。

9. Buffer RPE 500  $\mu$ l を RNeasy MiniElute spin column に加えます。静かに蓋を閉め、カラムを洗うために 8,000g (10,000rpm) 以上で 15 秒以上遠心を行います。遠心後、カラムを溶出液に接触しない様に collection tube から外します。collection tube は溶液ごと捨てます。
10. RNeasy MiniElute spin column を 2ml の新しい collection tube に移します。蓋を開け、最大回転で 5 分間遠心します。collection tube は溶液ごと捨てます。カラムのメンブレンにエタノールが残っていると後の操作の邪魔になるので、カラムのメンブレンを乾かすことが重要です。
11. RNeasy MiniElute spin column を 1.5ml の新しい collection tube に移します。14~30  $\mu$ l の RNase-free 水を直接カラムのメンブレンにアプライします。RNA を溶出するために静かに蓋を閉め、最大回転で 1 分間遠心を行います。RNeasy MiniElute spin column の dead volume は 2  $\mu$ l です。14  $\mu$ l の RNase-free 水をアプライすると 12  $\mu$ l が溶出します。
12. 転写反応を行うまで -20°C で保存します。

※Agilent Bioanalyzer (RNA 6000 Pico LabChip Kit) で直接質を分析するには、5~10  $\mu$ l 厚の切片で 4mm<sup>2</sup> の様な広領域のサンプルを回収する必要があります。

## 他の抽出法

QIAGEN社のキットだけでなく、FFPEサンプルからRNAを抽出するキットや方法はたくさんあります。サンプルやAGTC法やトリゾール法のような簡易的な実験法もまた有効です。もしも、抽出操作にプロテアーゼK処理を行っていないければ、下記の様なシンプルな方法を用いることをお勧めします。

### 手順:

1. プロテアーゼ K を含む溶液 (150 mM NaCl, 100 mM Tris (pH 7.5)、0.5% Igepal、0.5  $\mu$ g /  $\mu$ l プロテアーゼ K) 20  $\mu$ l をダイセクションで回収したサンプルを含む接着チューブのキャップに加えます。
2. チューブをひっくり返した状態で 55°C でインキュベートします。
3. 溶解液を 8,000g でスピンドウンします (例: エッペンドルフ 5415D で 12,000 rpm)。
4. 90°C で 10 分間加熱して不活化します。

5. 適切な溶解バッファーを加え、強くボルテックスします。すぐに実験を進めない場合は、 $-20^{\circ}\text{C}$ か $-80^{\circ}\text{C}$ で保存します。
6. 続けてお好みの抽出操作を続けます。

※プロテアーゼKによる消化時間はサンプルにより最適化してください(少なくとも3時間以上行う必要があります。最大18時間まで時間を延ばすとより効果的です)。

## 回収RNAの品質チェック

totalRNA 量を測定する方法はアガアロースゲル電気泳動を行うことです。一般的に少なくとも200ng の totalRNA が必要です。50pg/ $\mu\text{l}$  以下の RNA 量を測定するには、Agilent 2100 Bioanalyzer を使用すると、RNA の質(分解、純度)と量の情報を得ることができます。

細胞におけるRNA量の予測は組織切片、細胞または組織、固定、染色、断片化、抽出方法等の多くの要因に影響を受けるので、非常に難しいです。

## RNAの一般的な性質 (分布, 構造, RNase活性)

### 通常の哺乳動物細胞におけるRNA分布

1細胞あたりのTotal RNA	10~30 pg
rRNA (28S, 18S, 5S)	80~85%
tRNA, snRNA, 低分子断片	15~20%
mRNA	1~5%
核中におけるTotal RNA	14%
核中におけるDNA: RNA比	2:1
1細胞あたりのmRNA分子	$2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$
mRNA平均サイズ	1900 nt

### 様々な細胞や組織におけるRNA量

		Total RNA	mRNA
		( $\mu$ g)	( $\mu$ g)
培養細胞	NIH/3T3	120	3
	Hela	150	3
	COS7	350	5
マウス細胞 (100 mg)	NIH/3T3	120	3
	脳	120	5
	心臓	120	6
	消化官	150	2
	腎臓	350	9
	肝臓	400	14
	肺	130	6
	脾臓	350	7

### 様々な細胞・組織におけるRNA量

典型的な真核生物細胞は1細胞あたり通常 10~30pg のtotalRNA (mRNA、rRNA、tRNA) が含まれています。RNA分子の大部分はtRNAとrRNAから成り立っています。mRNAはtotalRNAの 1~5% しか含まれていません。1細胞あたり36万分子の mRNA が存在し、それは平均 2kbの長さで、1万2000 種類のRNAに相当します。いくつかのRNAは mRNA の3%にも相当する量があり、

一方で残りの大部分は0.01%以下しか存在しません。また、下表の様に、RNase活性は細胞によって著しく異なります。マウスにおける組織のRNase活性の比較を示していますが、膵臓は脳の18万1000倍ものRNase活性を持ちます。この点がRNase活性を調整する上で非常に重要です。

#### マウス細胞におけるRNase活性比 (AMBION社より)

マウス細胞における脳との比較(倍)

膵臓	181,000
脾臓	10,600
肺	5,300
肝臓	64
胸腺	16
腎臓	8
心臓	2
脳	1



## RNA取り扱いの流れ

質の良いRNA量を得るには、メンブレンスライド上で凍結切片をのせたものを使用します。凍結切片は $-80^{\circ}\text{C}$ で2~3日以上保存できません。凍結は染色または乾燥後に行います。細胞におけるRNA量の予測は多くの要因の影響を受けるので非常に難しいです。マウスの肝臓の凍結細胞からは通常1細胞あたり5~20pgのRNAを回収することができます(Agilent Bioanalyzerで1000細胞から抽出した時の値から算出)。

※ RNA Pico kit からの RNA 量はサンプル中に含まれる塩濃度に依存します。

保存されている細胞の大部分はホルマリン固定/パラフィン包埋切片です。これらの細胞からのRNA抽出は、アルデヒドがRNAとcross-linkするため、効果的ではありません。FFPE法で保存した細胞のRNAを保存する方法はVincek(*Diagn Mol Pathol*, 197:823-826)らまたはOlertら(*Pathol Res Pract*, 197:823-826)の方法を御参照ください。

## まとめ

RNAを扱う時は、注意点・禁止事項にお気を付けてください(6ページ)

すべてのRNA実験において接着キャップをご使用ください(16ページ)

内因性のRNase活性を抑えるために、組織を短い時間で染色できる方法(クレシルバイオレット)をご選択ください(12ページ)

QIAGEN社のRNA extraction kit(Cat.No.74004)を使用し、凍結切片から回収することで良い結果が得られます(18ページ)

PPFP切片からのRNA回収はQIAGEN社のFFPE kit(Cat.No.74404)を使用することで良い結果が得られます(19ページ)

## 他のプロトコール

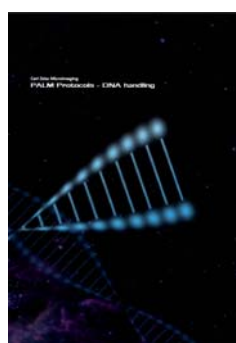
### 生細胞



### DNA



### 染色体



詳しくは、カールツァイスマイクロイメージング(株)各営業所へお電話もしくは E-mail にて、または  
弊社機製品取扱店へお問い合わせください。



**Carl Zeiss MicroImaging GmbH**  
Location Munich

Phone: +49 (0) 89 90 9000-900

Fax: +49 (0) 89 90 9000-920

E-Mail: palm-labs@zeiss.de

[www.zeiss.de/microdissection](http://www.zeiss.de/microdissection)

**カール ツァイス マイクロイメージング株式会社**

〒160-0003  
東京都新宿区本塩町22番地

Tel 03-3355-0332  
Fax 03-6745-9087

E-mail [micro@zeiss.co.jp](mailto:micro@zeiss.co.jp)  
 <http://www.microimaging.zeiss.co.jp>

大阪営業所 〒564-0062 大阪府吹田市垂水町3-35-22  
Tel 06-6337-5465 Fax 06-6337-5477

名古屋営業所 〒465-0043 名古屋市名東区宝が丘25  
Tel 052-777-1415 Fax 052-777-1417

福岡営業所 〒810-0062 福岡市中央区荒戸2-1-5  
Tel 092-713-7662 Fax 092-711-0776

仙台営業所 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-12-7  
Tel 022-224-5655 Fax 022-224-5626

