

パラフィン包埋組織切片からの RNA 抽出 Kit

---

---

# ISOGEN PB Kit

## マニュアル

(第 1 版)

---

---

Code No. 315-06421

NIPPON GENE CO., LTD.



## 目次

I	製品説明	p.1
II	ご使用前に	p.1
III	キット内容	p.2
IV	保存	p.2
V	使用上の注意	p.2
VI	プロトコール	p.3
VII	実験例	p.6
VIII	関連製品	p.8

## I 製品説明

ISOGEN PB Kit は、パラフィン包埋組織切片からの RNA 抽出 Kit で、脱パラフィン → Proteinase K 処理 → 抽出 (ISOGEN-LS) という簡単な操作 (約 2 時間) で、パラフィン包埋組織から RNA を抽出することができます。

< 抽出した RNA の使用用途 >

- RT-PCR による RNA ウイルスの検出
- RT-PCR による mRNA の検出
- パラフィン包埋組織切片における RNA の保存度チェック 等

## II ご使用の前に

パラフィン包埋組織から抽出される RNA は、包埋までの過程で RNA の分解が進行しているため、新鮮組織から抽出したものと比較して、RNA の完全度が劣っています。

哺乳動物の新鮮組織から抽出した total RNA は、電気泳動において、28S rRNA と 18S rRNA の明るいバンドが検出でき、その比率は約 2:1 になりますが、パラフィン包埋組織から抽出した場合には必ずしもそのような結果にはなりません。実際に、マウスのパラフィン包埋組織を用いた抽出実験では、28S rRNA はほとんど確認できませんでした。したがって、包埋までの過程で RNA が分解されていることが示唆されます。さらに、RNA の分解の程度はパラフィン包埋ブロックの状態に大きく依存します。18S rRNA がはっきりと確認できるブロックもあれば、18S rRNA も確認できないほどに分解が進んでいるものもあります。

そこで、弊社では 18S rRNA の残存を1つの判断基準としています。In situ hybridization 等、RNA の保存度が重要な場合には、これを1つの指標とすることをお勧めします。

また、RNA が分解されていても (18S rRNA を確認できない場合でも)、RT-PCR による遺伝子の検出は可能な場合が多いので、抽出した RNA を RT-PCR に用いる場合は、RNA の完全度は通常は特に問題になりません。ただし、パラフィン包埋組織切片からの PCR は、通常のものに比べ、増幅効率が低いので、プライマーの設定は増幅サイズが大きくなりすぎないように (400 bp 以下、できれば 200 bp 以下) 注意してください。

### III キット内容

(20 回分)

Proteinase K (20 mg/ml)	100 $\mu$ l ×1
Extraction Buffer*	3 ml ×1
ISOGEN-LS	10 ml ×1
Ethachinmate	60 $\mu$ l ×1
Deoxyribonuclease (RT Grade)	20 $\mu$ l ×1
10×DNase (RT Grade) Buffer II	100 $\mu$ l ×1
Stop Solution (RT Grade)	100 $\mu$ l ×1
DEPC treated Water	500 $\mu$ l ×2

\* Extraction Buffer 中に白い結晶が現れることがありますが、品質には問題ありません。このような場合は、37～50℃でインキュベートし、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。

### IV 保 存

-20℃で保存してください。

ただし、Extraction Buffer は室温、ISOGEN-LS は 2～10℃でも保存可能です。

### V 使用上の注意

- ・ 本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないでください。
- ・ ISOGEN-LS は医薬用外劇物(フェノール製剤)ですので、お取り扱いにはご注意ください。
- ・ ご使用の際には適切な保護具(手袋、眼鏡等)を着用してください。
- ・ もし目に入ったり皮膚に付着した場合は、大量の水で少なくとも 15 分間は洗い流し、医師の診察を受けてください。
- ・ 本品のお取扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- ・ マニュアル記載内容と異なったお取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。

VI プロトコール

<Kitに含まれていない試薬>

Lemosol または Lemosol A (Xylene でも可)

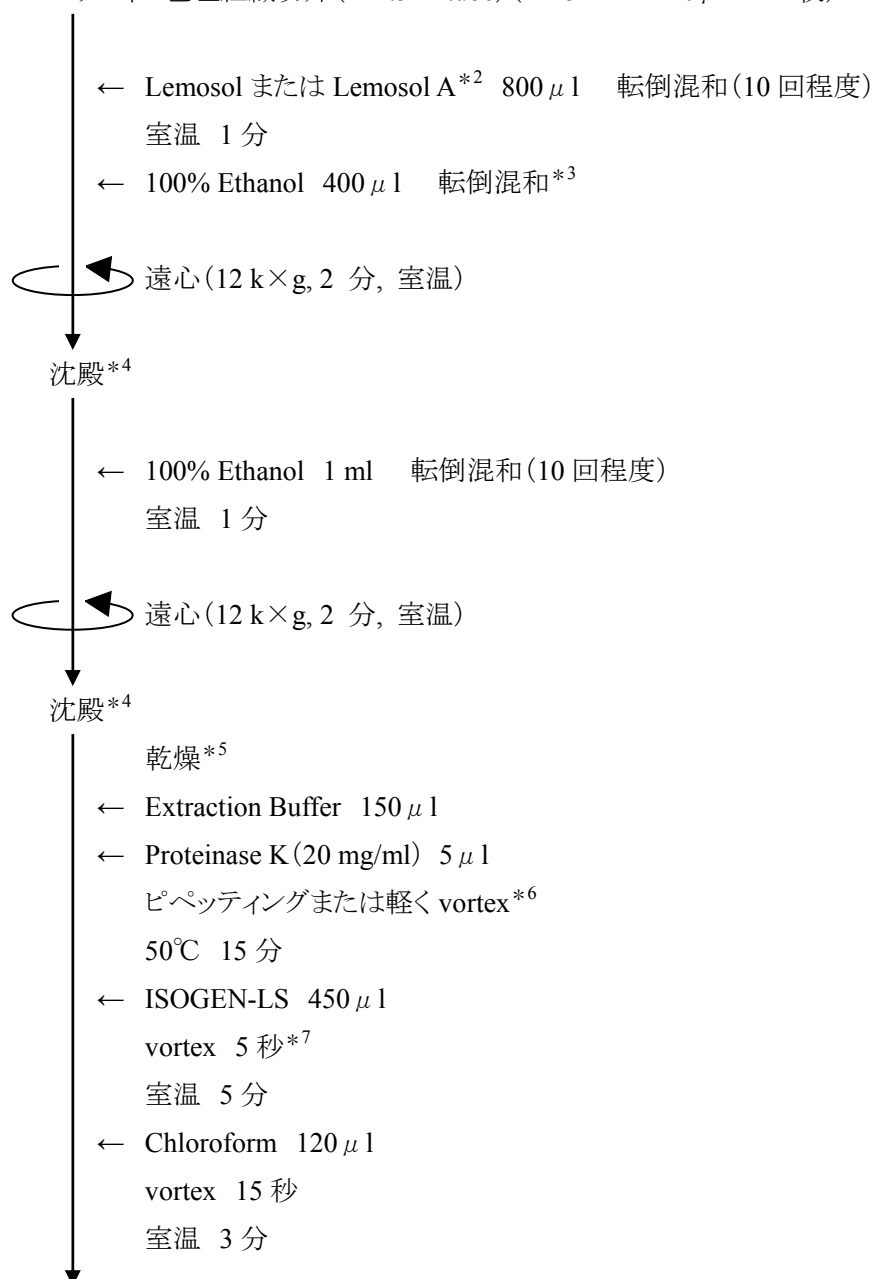
100% Ethanol

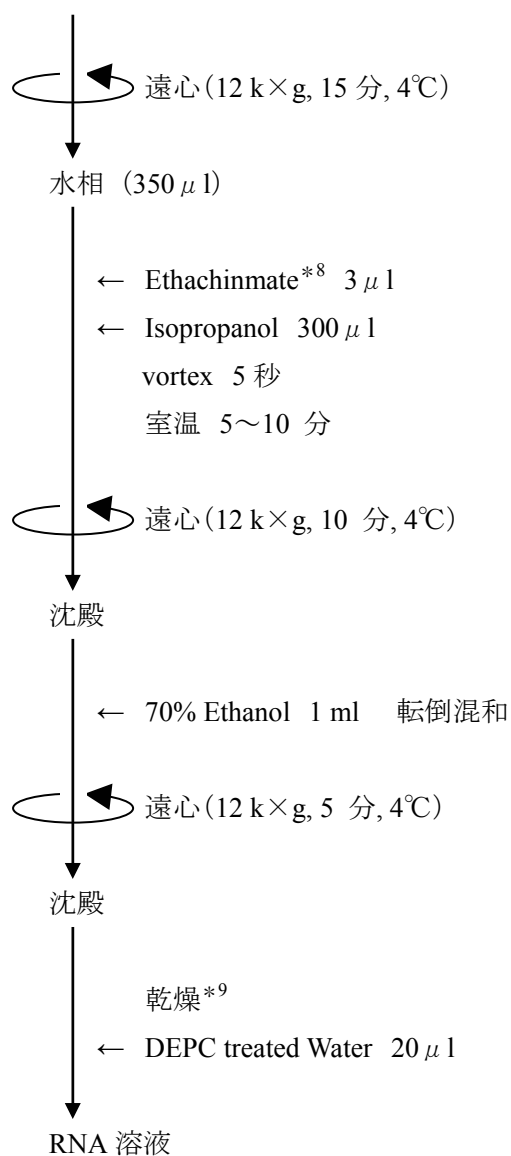
Chloroform

Isopropanol

70 % Ethanol

パラフィン包埋組織切片 (in 1.5ml tube) (<25 mm<sup>2</sup> × 10 μ m × 4 枚)<sup>\*1</sup>





\*1 組織のまわりの余分なパラフィンをカッターナイフ等で落としてから、組織をスライスしてください。パラフィンは Lemosol、Lemosol A、Xylene に溶けるので、パラフィンを完全に切り落とす必要はありません。

また、スライドガラス上の組織切片から RNA を抽出する場合は、脱パラフィン前に、マイクロスパーテル等で削って、スライドガラスから組織を剥がしてください。

\*2 Xylene でも可能ですが、安全性の高い Lemosol または Lemosol A の使用をお勧めします。

\*3 Ethanol の添加は省略してもかまいませんが、Ethanol を加えた方が、組織が沈殿しやすく、操作が容易になります。

\*4 上清はマイクロピペットにて除去します。このとき、組織が浮いてくることがあるので、吸い込まないように注意してください。

\*5 Ethanol が見えなくなるまで風乾または真空乾燥してください。

- \*6 泡立ちやすいので注意して下さい。
- \*7 Extraction Buffer と ISOGEN-LS が均一になるまで混合して下さい。
- \*8 Ethachinmate は核酸(DNA 及び RNA)をエタノール又はイソプロパノール沈殿させる際に使用するアクリルアミド系の高分子キャリアー溶液です。Ethachinmate の添加により微量核酸の回収が可能となり、沈殿を目で確認することができるようになるため、微量な核酸の場合でも大切な試料を洗い流してしまう心配がありません。また、Ethachinmate は逆転写反応や PCR 等の酵素反応を阻害しません。
- \*9 Ethanol が見えなくなるまで風乾または真空乾燥して下さい。また、沈殿を完全に乾燥してしまうと RNA が溶けにくくなる場合があります。

#### <抽出した RNA の取扱いについて>

本品で抽出した RNA を RT-PCR に用いる場合には、添付の Deoxyribonuclease (RT Grade) によって処理して下さい。

電気泳動及び濃度測定を行う場合は、そのままご使用ください。

#### <Deoxyribonuclease 処理>

抽出 RNA	0.1~5 $\mu$ g
10×DNase (RT Grade) Buffer II	2.5 $\mu$ l
Deoxyribonuclease (RT Grade)	0.5 $\mu$ l
DEPC treated Water	
Total	25 $\mu$ l <sup>*1</sup>
	↓
	37°C 15分 <sup>*2</sup>
	← Stop Solution (RT Grade) 2.5 $\mu$ l
	70°C 10分 <sup>*3</sup>
	↓
	RT-PCR <sup>*4</sup>

- \*1 25  $\mu$ l 以外の反応系で行う場合、Deoxyribonuclease (RT Grade) : 10×DNase (RT Grade) Buffer II : Stop Solution (RT Grade) は、必ず 1:5:5 の量比で使用して下さい。他の比率では Stop Solution (RT Grade) の効果が十分に得られない場合があります。反応液中の  $Ca^{2+}$  をキレートすることが、DNase の反応停止にとっても重要です。
- \*2 15分以上は反応させないでください。
- \*3 RNA は高温では不安定です。熱処理は 70°Cで行ってください。この温度では、DNase は完全に失活しませんが、逆転写反応において特に問題はありません。
- \*4 逆転写反応後には、95°C 5分間の熱処理による逆転写酵素の反応停止を行ってください。

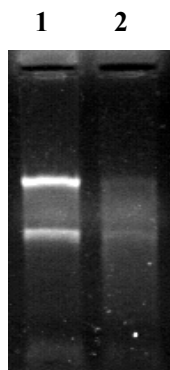
### <Deoxyribonuclease 処理に関する注意事項>

- 前記反応液による DNA の除去は、できるだけ RT-PCR の直前に行ってください。
- DNase 処理した RNA を長期間保存する場合には、フェノール/クロロホルム処理による DNase の失活と除去を行ってください。また、DNase 処理した RNA の電気泳動を行う場合も、フェノール/クロロホルム処理とエタノール沈殿による RNA の回収を行ってください。反応 Buffer 及び Stop Solution (RT Grade) の影響により移動度に異常をきたします。この場合、DNase はフェノール / クロロホルムにより失活しますので、Stop Solution (RT Grade) の添加及び 70°C、10 分の熱処理は必要ありません。

## VII 実験例

### <マウス顎下腺パラフィン包埋組織切片からの RNA 抽出>

マウス顎下腺パラフィン包埋組織切片 10 $\mu$ m $\times$ 4枚から、プロトコールに従って RNA を抽出し、1/4 量 (5  $\mu$ l) を、1% ホルマリン変性 Agarose S で電気泳動した。



- 1 新鮮組織から抽出した RNA  
(ISOGEN で抽出)
- 2 パラフィン包埋組織切片から抽出した RNA  
(ISOGEN PB Kit で抽出)

## <RT-PCR によるマウス glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapd) 遺伝子の検出>

マウス顎下腺パラフィン包埋組織切片より抽出した RNA 500ng を、プロトコールに従って DNase 処理した後、RT-PCR によりマウス Gapd 遺伝子エクソン 5 (258 bp) の検出を行った。

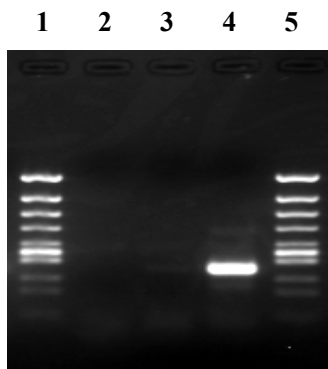
### 逆転写反応

反応液組成		逆転写反応条件
10×Reaction Buffer*	2 $\mu$ l	Total 20 $\mu$ l ↓ 25°C 10分 48°C 30分 95°C 5分 ↓ <b>1st strand cDNA</b>
25 mM MgCl <sub>2</sub> *	4 $\mu$ l	
2.5 mM dNTP*	4 $\mu$ l	
50 $\mu$ M Random Nonamer*	1 $\mu$ l	
RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)*	0.5 $\mu$ l	
EuroScript RT (50 U/ $\mu$ l)*	0.5 $\mu$ l	
DNase 処理済み RNA	8 $\mu$ l	
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	

\* 逆転写反作用の試薬は Reverse Transcriptase qPCR™ Core Kit (EUROGENTEC 社) を使用した。

### PCR

反応液組成		PCR 条件
10× Gene Taq Universal Buffer	2.5 $\mu$ l	94°C 2分 95°C 15秒 60°C 30秒 72°C 30秒 } ×35
2.5 mM dNTP Mixture	2 $\mu$ l	
3 $\mu$ M Gapd Primer Mixture	2.5 $\mu$ l	
Gene Taq NT (5 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l	
1st strand cDNA	5 $\mu$ l	
Distilled Water	12.75 $\mu$ l	
<b>Total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	



- 1 OneSTEP Marker 5 ( $\Phi$ X174 / *Hinc* II digest)
- 2 Template なし
- 3 逆転写反応を行っていない RNA
- 4 逆転写反応を行った RNA
- 5 OneSTEP Marker 5 ( $\Phi$ X174 / *Hinc* II digest)

PCR 産物の 1/2 量 (12.5  $\mu$ l) を 2% Agarose S で泳動

### <微量試料の RT-PCR について>

抽出したRNAが電気泳動で確認できない場合や10 ng以下である場合には、RTmate (Code No. 315-05941)を添加して逆転写反応を行うことをお勧めします。RTmateの添加により、RT-PCRでの検出限界感度が上昇します。

RTmateに関する詳細は弊社ホームページ (<http://www.nippongene.jp/>) をご覧ください。

## VIII 関連製品

ISOGEN-LS	Code No. 311-02621	100 ml	32,000 円
Ethachinmate	Code No. 312-01791	0.2 ml	15,000 円
Deoxyribonuclease (RT Grade) for Heat Stop	Code No. 312-05951	1,000 units	12,000 円
	Code No. 318-05953	1,000 units×2	20,000 円
RTmate	Code No. 315-05941	500 μl	16,000 円
Distilled Water, Deionized, Sterile	Code No. 318-90105	500 ml	9,000 円
DEPC treated Water	Code No. 314-90205	500 ml	9,000 円
EtBr Solution	Code No. 315-90051	10 ml	9,000 円
Loading Buffer	Code No. 313-90111	10 ml	2,000 円
Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1)	Code No. 311-90151	250 ml	15,000 円
50×TAE	Code No. 313-90035	500 ml	9,000 円
Agarose S	Code No. 312-01193	100 g	12,000 円
Agarose S <錠>	Code No. 316-06071	0.5 g×140 錠	10,000 円
Gene Taq NT	Code No. 318-03231	250 units	22,500 円
	Code No. 314-03233	250 units×4	79,000 円
Marker 5 (φX174 / HincII digest)	Code No. 312-00674	15 μg	9,000 円
	Code No. 318-00676	15 μg×5	36,000 円
OneSTEP Marker 5 (φX174 / HincII digest)	Code No. 311-05801	375 μl	9,000 円
	Code No. 317-05803	375 μl×5	32,000 円

## 株式会社ニッポンジーン

学術営業部 学術営業課

〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7

TEL (076)451-6548

FAX (076)451-6547

Email [info@nippongene.jp](mailto:info@nippongene.jp)

URL <http://www.nippongene.jp/>